

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

GEOVANNA SOLDI MENDES CORREIA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO VIA CLAE-UV, PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DO FITOTERÁPICO, TINTURA DE ALECRIM-
PIMENTA, PRODUZIDO PELAS FARMÁCIAS VIVAS NO BRASIL**

**RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS
2021**

GEOVANNA SOLDI MENDES CORREIA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO VIA CLAE-UV, PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DO FITOTERÁPICO, TINTURA DE ALECRIM-
PIMENTA, PRODUZIDO PELAS FARMÁCIAS VIVAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Geraldo Humberto Silva

**RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS
2021**

T

C824d
2021

Correia, Geovanna Soldi Mendes, 1996-

Desenvolvimento de método cromatográfico via CLAE-UV, para controle de qualidade do fitoterápico, tintura de Alecrim-pimenta, produzido pelas Farmácias Vivas no Brasil: . / Geovanna Soldi Mendes Correia. – Rio Paranaíba, MG, 2021. 74 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Geraldo Humberto Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.68-74.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvcrp.2021.004>

1. Timol. 2. *Lippia sidoides*. 3. Método cromatográfico. 4. CLAE-UV. 5. Controle de qualidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas – IEP. Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais. II. Título.

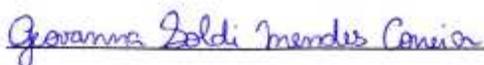
GEOVANNA SOLDI MENDES CORREIA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO VIA CLAE-UV, PARA
CONTROLE DE QUALIDADE DO FITOTERÁPICO, TINTURA DE ALECRIM-
PIMENTA, PRODUZIDO PELAS FARMÁCIAS VIVAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de julho de 2021

Assentimento:



Geovanna Soldi Mendes Correia
Autora



Geraldo Humberto Silva
Orientador

Dedico este trabalho a meu pai Carlos, à minha mãe Cristina e à minha irmã Giselle por todo apoio durante o Mestrado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a todos que contribuíram neste trabalho, de forma direta ou indireta, o desenvolvimento da pesquisa não seria possível sem vocês.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, para a realização do trabalho.

A meus pais Carlos e Cristina e à minha irmã Giselle por todo o suporte, carinho, amor e por sempre se fazerem presentes apesar da distância, esse novo passo em minha formação foi muito mais fácil e possível com vocês ao meu lado.

Aos meus amigos Brenda, Lucas, Viotti, Jess e Duds por toda parceria, amizade, por todos os conselhos e companhia durante todos os dias do meu Mestrado, sou imensamente grata e feliz por ter vocês em minha vida, em especial ao Duds pelas inúmeras vezes em que me ajudou e deu apoio com a pesquisa.

Ao meu orientador Geraldo por acreditar em meu potencial, por todo apoio e ensinamentos durante esses anos, isso contribuiu muito para minha formação acadêmica. A todos os docentes e membros do Laboratório de Desenvolvimento de Agroquímicos Naturais pela ajuda e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais e à Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba pela oportunidade de cursar e desenvolver o Mestrado.

RESUMO

CORREIA, Geovanna Soldi Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa *campus* Rio Paranaíba, julho de 2021. **Desenvolvimento de método cromatográfico via CLAE-UV, para controle de qualidade do fitoterápico, tintura de Alecrim-Pimenta, produzido pelas Farmácias Vivas no Brasil.** Orientador: Geraldo Humberto Silva.

O uso de fitoterápicos no Brasil vem sendo estimulado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através das Farmácias Vivas que produzem e distribuem estes medicamentos para população em geral. Os fitoterápicos são amplamente reconhecidos pelo seu uso tradicional, porém há poucas metodologias na literatura que garantem o seu controle de qualidade. Desta forma, com o avanço das técnicas analíticas, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade microbiológico, físico-químicos e químico. Um destes medicamentos é a tintura de Alecrim-Pimenta, um extrato hidroalcólico das folhas de *Lippia sidoides*. Este fitoterápico é utilizado como antisséptico para tratamento de machucados e feridas, sendo o seu princípio ativo o timol. O projeto foi motivado pela falta de relatos na literatura de um método validado para a padronização deste princípio ativo no fitoterápico. O método desenvolvido utiliza, para o preparo de amostra, a extração em fase sólida (SPE) com um cartucho de C18 e Metanol/Água como eluente, retendo o timol em uma fração. As condições de extração foram otimizadas via planejamento fatorial completo (2^3), e os resultados analisados via superfície de resposta determinaram que esta região ocorreria com a utilização do volume inicial máximo de 1400 μL do extrato aplicado ao cartucho e sua eluição com o solvente Metanol:Água (80:20). O timol foi quantificado via método desenvolvido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector UV/Vis. As curvas de calibração foram lineares na faixa de trabalho de 0,1-1,0 mg/mL com alto coeficiente de determinação (0,997). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram 0,02 e 0,06 mg/mL, respectivamente. Já a precisão e exatidão apresentaram recuperações percentuais na faixa de 95,8-103,8 % para os três diferentes níveis de concentrações. Por fim, o método desenvolvido se mostrou robusto frente às múltiplas variações aplicadas, além de resultados satisfatórios dentro dos parâmetros analisados, tornando sua aplicação viável em Farmácias Vivas para garantir o controle de qualidade do extrato hidroalcólico de *L. sidoides* como fitoterápico.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*. Timol. Padronização. SPE. CLAE. Validação analítica.

ABSTRACT

CORREIA, Geovanna Soldi Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Rio Paranaíba, July 2021. **Development of a chromatographic method via HPLC-UV, for quality control of the phytotherapeutic, Rosemary-Pepper tincture, produced by Living Pharmacies in Brazil.** Advisor: Geraldo Humberto Silva.

The use of phytotherapies in Brazil has been encouraged by the Unified Health System (SUS), through Living Pharmacies that produce and distribute these medicines to the general population. Phytotherapies are widely recognized for their traditional use, but there are few methodologies in the literature that guarantee their quality control. Thus, with the advancement of analytical techniques, it becomes necessary the development of analytical methods for microbiological, physicochemical and chemical quality control. One of these medicines is the Rosemary-Pepper tincture, a hydroalcoholic extract from the leaves of *Lippia sidoides*. This herbal medicine is used as an antiseptic for the treatment of injuries and wounds, and its active principle is thymol. The project was motivated by the lack of reports in the literature of a validated method for the standardizing of this active principle in the phytotherapeutic. The method developed uses, for sample preparation, solid phase extraction (SPE) with a C18 cartridge and Methanol/Water as eluent, retaining the thymol in a fraction. The extraction conditions were optimized via full factorial design (2³), and the results analyzed via the response surface determined that this region would occur with the use of the maximum initial volume of 1400 µL of extract applied to the cartridge and its elution with the solvent Methanol:Water (80:20). Thymol was quantified via the method developed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV/Vis detector. Calibration curves were linear in the working range of 0.1-1.0 mg/mL with a high coefficient of determination (0.997). The limits of detection (LD) and quantification (LQ) were 0.02 and 0.06 mg/mL, respectively. The precision and accuracy presented percentage recoveries in the range of 95.8-103.8% for the three different levels of concentrations. Finally, the developed method proved to be robust against the multiple applied variations, in addition to satisfactory results within the analyzed parameters, making its application viable in Living Pharmacies to guarantee the quality control of the hydroalcoholic extract of *L. sidoides* as a phytotherapeutic.

Keywords: *Lippia sidoides*. Thymol. Standardization. SPE. CLAE. Analytical validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Etapas da extração em fase sólida (SPE) para concentração e isolamento do analito empregada no cartucho 20
- Figura 2.** Estruturas morfológicas da *Lippia sidoides* (a) Ramo com flores (b) Folhas 30
- Figura 3.** Estrutura química do monoterpene timol, principal composto da *Lippia sidoides* . 30
- Figura 4.** Gráfico com a varredura espectral do timol realizado com padrão (0,45 mg/mL) em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida 42
- Figura 5.** Cromatograma do extrato de *L. sidoides* (a) Diluído e sem o preparo de amostra (b) Após o preparo de amostra via SPE analisados via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida... 43
- Figura 6.** (a) Curva de ruptura realizada com o extrato de *L. sidoides* aplicado em fluxo contínuo para avaliar o equilíbrio de adsorção do timol em C18 (b) Representação gráfica dos modelos de Thomas e logístico e dos dados experimentais da adsorção do timol em C18 44
- Figura 7.** Gráfico de pareto com a estimativa dos efeitos padronizados do planejamento fatorial do timol..... 47
- Figura 8.** (a) Superfície de resposta (b) Gráfico de Contorno das interações significativas do planejamento fatorial do timol e com o fator volume de eluição fixado no ponto central (C= 0) 48
- Figura 9.** Espectro de absorção na região do infravermelho do (a) Padrão de timol (b) Extrato de *L. sidoides* purificado..... 50
- Figura 10.** Cromatograma do padrão de timol (0,3 mg/mL) nas fases móveis água ultrapura, MeOH:H₂O (65:35) e MeOH:H₂O (72:28), com fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida 52
- Figura 11.** Cromatograma das amostras de extrato purificado e do extrato purificado fortificado com o padrão de timol (0,3 mg/mL) na fase móvel MeOH:H₂O (72:28), com fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida..... 54
- Figura 12.** Curva de Calibração do padrão de timol em triplicata analisadas via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida 55
- Figura 13.** Curvas de Calibração do padrão de timol e do extrato de *L. sidoides* fortificado com o padrão de timol na mesma faixa de linearidade e em triplicata, para a avaliação do efeito matriz, analisados via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida 57

Figura 14. Efeito das variações pelo planejamento *Plackett-Burman* para avaliar a robustez do método para o timol em relação **(a)** Tempo de retenção **(b)** Área 66

Quadro 1. Plantas que compõem as listas de medicamentos e produtos tradicionais fitoterápicos da Instrução Normativa n° 2 da ANVISA 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método analítico segundo a RDC n° 166 da ANVISA.....	26
Tabela 2. Hierarquia Taxonômica da <i>Lippia sidoides</i>	29
Tabela 3. Planejamento fatorial do timol com as três variáveis de interesse, em diferentes níveis, para determinar sua maior recuperação percentual.....	35
Tabela 4. Matriz experimental do planejamento fatorial 2 ³ com triplicata no ponto central do timol para análise via CLAE e determinação de sua recuperação percentual	36
Tabela 5. Critérios de aceitação dos parâmetros para a adequação ao sistema conforme a normativa da FDA	37
Tabela 6. Parâmetros e variações utilizados no planejamento <i>Plackett-Burmann</i> para avaliar a robustez do método analítico	41
Tabela 7. Matriz experimental do planejamento fatorial e recuperação experimental do timol	46
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) para o estudo do planejamento fatorial do timol..	46
Tabela 9. Avaliação estatística das médias do extrato de <i>L. sidoides</i> sem tratamento e após o tratamento via SPE	49
Tabela 10. Adequação ao sistema do método analítico via CLAE com base nos critérios de aceitação da FDA.....	53
Tabela 11. Análise de Regressão para a curva de calibração do padrão de timol	56
Tabela 12. Análise de variância para a curva de calibração do padrão de timol.....	56
Tabela 13. Análise estatística do Efeito Matriz para a curva de calibração do padrão de timol e para a curva com a adição do timol na matriz do extrato de <i>L. sidoides</i> previamente purificado	58
Tabela 14. Análise da Repetibilidade para o timol.....	59

Tabela 15. Análise da Precisão Intermediária do timol.....	60
Tabela 16. Análise da Exatidão do timol.....	62
Tabela 17. Análise da Precisão do Limite de Quantificação do timol.....	63
Tabela 18. Análise da Exatidão do Limite de Quantificação do timol.....	65
Tabela 19. Efeito das variações obtidas pelo planejamento <i>Plackett-Burman</i> e teste <i>t-Student</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS – Organização Mundial da Saúde

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

SUS – Sistema Único de Saúde

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

SQF – Substância Química de Referência

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

SPE – Extração em Fase Sólida

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector ultravioleta

FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

KBr – Brometo de Potássio

UCLAE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UP – Água ultrapura

EtOH – Etanol

MeOH – Metanol

FDA – Food and Drug Administration

k' – Fator de Retenção

TF – Fator de Cauda

N – Número de pratos teóricos

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Plantas Medicinais no Brasil	15
1.2 Plantas Medicinais na indústria	15
1.3 Padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos	16
1.3.1 Padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos no Brasil.....	17
1.4 Extração em Fase Sólida (SPE)	19
1.5 Validação do Método Analítico	20
1.5.1 Seletividade	21
1.5.2 Linearidade	21
1.5.3 Efeito Matriz	22
1.5.4 Precisão.....	22
1.5.5 Exatidão.....	23
1.5.6 Limite de Detecção.....	24
1.5.7 Limite de Quantificação	24
1.5.8 Robustez	24
1.5.9 Faixa de trabalho	27
1.6 Uso de medicamentos fitoterápicos regularizados.....	27
1.7 <i>Lippia sidoides</i>	29
2. Objetivos.....	31
2.1 Objetivos Gerais	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1 Reagentes e Materiais.....	32
3.2 Equipamentos	32
3.2.1 Validação analítica do Método Cromatográfico.....	32

3.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	32
3.2.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UCLAE)	32
3.3 Condições cromatográficas	33
3.4 Preparo da Amostra	33
3.4.1 Purificação do Extrato	33
3.4.2 Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
3.5 Otimização do Método Cromatográfico	37
3.6 Método de Validação	37
3.6.1 Especificidade e Seletividade	38
3.6.2 Linearidade	38
3.6.3 Efeito Matriz	38
3.6.4 Limites de detecção e quantificação	39
3.6.5 Precisão	39
3.6.6 Exatidão	39
3.6.7 Robustez	40
4. Resultados e Discussões	42
4.1 Condições Cromatográficas	42
4.2 Preparo da Amostra	42
4.2.1 Extração do timol em Fase Sólida (SPE)	42
4.2.2 Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	49
4.3 Otimização do método cromatográfico	52
4.4 Método de Validação	53
4.4.1 Especificidade e Seletividade	53
4.4.2 Linearidade	54
4.4.3 Efeito Matriz	56

4.4.4 Precisão.....	58
4.4.5 Exatidão.....	61
4.4.6 Limite de Detecção.....	62
4.4.7 Limite de Quantificação.....	62
4.4.8 Robustez	65
5. Conclusão	67
6. Referências Bibliográficas	68

1. Introdução

A utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos estava presente em cerca de 60 % da população mundial no ano 2000, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (GENEVA, 2000). Isso ocorreu devido à dificuldade de parte desta população não ter acesso à medicamentos essenciais.

Desta forma, os agentes terapêuticos passaram a ser o único método de tratamento para algumas doenças (MACIEL et al., 2002), o que promoveu uma busca pelo desenvolvimento de diretrizes para o uso da medicamentos à base de plantas, como forma de auxiliar na saúde pública.

A utilização dos medicamentos fitoterápicos passou a ser aceito em alguns países devido ao seu longo histórico de uso pelas comunidades, o que atribuiu a eles eficácia e segurança (GENEVA, 2000).

1.1 Plantas Medicinais no Brasil

No Brasil o uso de plantas medicinais teve sua origem disseminada com os povos indígenas e posteriormente, os africanos e europeus. O país possui uma grande diversidade de flora mundial (FORZZA et al., 2012; ZAPPI et al., 2015), o que abre a possibilidade para o estudo do potencial terapêutico destas espécies. Porém, diversas espécies desta flora não têm esse potencial estudado, uma vez que não são submetidas à análises químicas ou ainda a uma investigação de atividade farmacológica, como ocorreu em um estudo de 1949 a 1992, em que apenas 10 % das espécies cadastradas em um banco de dados tiveram seu potencial para fins terapêuticos investigados (SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993).

1.2 Plantas Medicinais na indústria

Com o objetivo de alavancar os estudos de matérias-primas para o uso farmacêutico, parcerias entre universidades e a indústria começaram a surgir. Uma delas proporcionou a descoberta do Acheflan[®], medicamento utilizado com ação anti-inflamatória desenvolvido por quatro universidades do país: Universidade Federal de Santa Catarina, Unifesp, PUC-Campinas e Unicamp, com a empresa Aché[®] (FIOCRUZ, 2005), que em 2005 teve seu uso autorizado, na forma de creme, pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2005, tornando-se um dos fitomedicamentos mais rentáveis do país desde então (ERENO, 2005; FIOCRUZ, 2005).

1.3 Padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos

Apesar deste caso de sucesso, a utilização de produtos naturais como matéria-prima para a elaboração de fitoterápicos pode se tornar um desafio, já que, muitas vezes há uma dificuldade na identificação de seu composto bioativo, responsável por determinado efeito da planta, e o seu mecanismo de ação (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Há ainda situações em que se conhece o constituinte bioativo, porém este não desempenha o seu efeito isoladamente, devido à presença de fitocomplexos, substâncias de origem dos metabólitos primários e secundários, que são responsáveis pelos efeitos biológicos da planta (ANVISA, 2014a; NÓBREGA, 2012).

Mesmo com a dificuldade de identificar e isolar estes marcadores químicos e ainda entender o seu mecanismo de ação, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel dominante na descoberta e desenvolvimento de medicamentos no âmbito global (NEWMAN; CRAGG, 2007), já que eles podem desempenhar mais de uma atividade, como é o caso do ácido betulínico, um triterpeno isolado de diversas plantas (*Tryphillum peltatum*, *Ancistrocladus heyneaus*, *Diospyros leucomelas*, entre outras), que além de possuir atividade anti-inflamatória, teve em estudos posteriores comprovada atividade antitumoral de melanomas (ZUCO et al., 2002).

Dessa forma, para o desenvolvimento dos produtos fitoterápicos é necessário desenvolver uma padronização da matéria-prima dos extratos, de forma que esta seja homogênea e abundante, garantindo o seu controle de qualidade (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007), já que fatores como clima, tempo, nutrientes e temperatura afetam a concentração de metabólitos secundários e por sua vez, podem alterar a composição final e a porcentagem do princípio ativo do fitoterápico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os estudos para a proposição do fitoterápico devem abordar a área botânica, de modo a garantir a identificação da espécie, com estudos morfológicos e anatômicos a área agrônômica, para se ter uma produção homogênea e em grande escala da matéria-prima de forma otimizada, na área química, para definir o perfil químico da espécie, de modo a identificar os marcadores químicos, suas estruturas e estabilidades dos compostos e seu mecanismo de ação e na área biológica, que tem como objetivo avaliar a atividade farmacológica e toxicológica das

substâncias bioativas isoladas previamente (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; TOLEDO et al., 2014).

Quando não é possível a identificação dos marcadores químicos na matéria-prima do fitoterápico, é possível utilizar a técnica de fitoequivalência, que corresponde a uma avaliação da invariabilidade da atividade farmacológica com o mesmo perfil químico (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004; NETTO et al., 2006), desta forma espera-se que os produtos com mesmo perfil químico apresentem a mesma atividade.

Com isso a OMS promulgou que o desenvolvimento de metodologias para a pesquisa e a avaliação de fitoterápicos devem garantir a eficácia e segurança destes medicamentos, mas ao mesmo tempo não devem se tornar obstáculos para a aplicação e o desenvolvimento da medicina tradicional (GENEVA, 2000).

1.3.1 Padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos no Brasil

No Brasil, o Ministério da Saúde, em 2008, implementou a Portaria Interministerial nº2960/2008 com o intuito de inserir de forma segura e eficaz, o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Em complemento a ela foi implementado, em 2015, um plano composto por 3 ações, dentre elas, a ação 20K5, que tratava do apoio ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a). Esta ação impulsionou o fortalecimento da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b), que por meio de parcerias com universidades, visou a criação de monografias, com procedimentos padronizados de 71 espécies de plantas presentes na RENISUS, reunindo assim informações botânicas, de controle de qualidade e segurança e eficácia, de modo que este conhecimento científico das espécies fosse voltado para o uso medicinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017b).

Outra ação do Ministério da Saúde foi a instituição da Farmácia Viva no âmbito do SUS com a Portaria nº 886 em 2010, complementando a política de inserção dos fitoterápicos na saúde de forma segura. A Farmácia Viva teve como objetivo assegurar a realização de todas as etapas, do cultivo à manipulação das plantas e fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Quanto à regulação do armazenamento e processamento destes, a Anvisa promulgou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 18 em 2013, que estabelecia boas práticas e os requisitos mínimos exigidos para a execução do preparo das plantas e fitoterápicos, de modo

que sua qualidade e segurança fossem mantidas, para que assim fosse feito o uso destes de forma racional (ANVISA, 2013).

Já o registro e a regulação dos medicamentos fitoterápicos ficou ao encargo da ANVISA, que em 2014 publicou a RDC n° 26, que dispunha sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2014a). Nesta resolução para o registro de um fitoterápico, a matéria-prima deve conter um estudo botânico, com a parte da planta utilizada, um estudo de estabilidade seguindo os parâmetros da RDC n° 318 publicada em 2019, que aborda a estabilidade de produtos farmacêuticos. Esta depende dos fatores ambientais: luz, umidade, temperatura e das propriedades físicas e químicas do composto bioativo, seus excipientes farmacêuticos utilizados e também sua forma farmacêutica e processo de fabricação, desta forma esta RDC visa determinar, com um conjunto de testes físicos, químicos, biológicos e microbiológicos, o período de utilização e sua validade em embalagem, assim como as condições de armazenamento deste fitoterápico (ANVISA, 2019).

Segundo a RDC n° 26 deve-se ter ainda, um estudo de qualidade que trata da forma farmacêutica do fitoterápico, uma descrição detalhada da fórmula, a quantidade de cada componente expressa no Sistema Internacional de unidades (SI) indicando sua função na fórmula, o uso controlado de excipientes na produção com metodologia reconhecida, que tenha o uso de referências farmacopeias reconhecidas pela Anvisa, conforme a RDC n° 37 de 2009, que trata da admissibilidade de farmacopeias estrangeiras, para o controle de qualidade dos fitoterápicos (ANVISA, 2009, 2014a). Há também um estudo de segurança e eficácia/efetividade dos medicamentos, na qual há o uso de ensaios clínicos e não clínicos seguindo as normas da RDC n° 10 de 2015, que avalia as propostas de uso do medicamento antes de sua aprovação pela ANVISA (ANVISA, 2015).

Seguindo ainda as normativas dispostas pela ANVISA para que o uso de drogas vegetais nos medicamentos possa ser aprovado, deve-se fazer uma análise indicando o método utilizado, suas especificações e os resultados obtidos devem possuir uma documentação técnico-científica, com testes de pureza e integridade, caracterização físico-química, análise quantitativa dos marcadores, detalhes da colheita e condições de cultivo e uma análise do perfil cromatográfico (ANVISA, 2014a).

A análise do perfil cromatográfico vem como forma complementar à identificação botânica, já que o uso das técnicas cromatográficas permitem a diferenciação mais específica

das espécies (SOARES, 1997). O uso das técnicas cromatográficas é empregado no âmbito quali e quantitativo, principalmente a Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE), pela rápida e eficaz quantificação das substâncias presentes em soluções extratoras (NETTO et al., 2006; SOARES, 1997). Além da CLAE, utilizam-se a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), para identificação das substâncias bioativas em cada extrato vegetal (KLEIN et al., 2009; NETTO et al., 2006).

O desenvolvimento de fitoterápicos padronizados engloba um processo multidisciplinar (TOLEDO et al., 2014) e ter o conhecimento das áreas botânicas, agrônômicas, químicas, microbiológicas, farmacológicas e toxicológicas permitem um controle de qualidade eficaz e ainda uma projeção da estabilidade deste produto a longo prazo (KLEIN et al., 2009).

1.4 Extração em Fase Sólida (SPE)

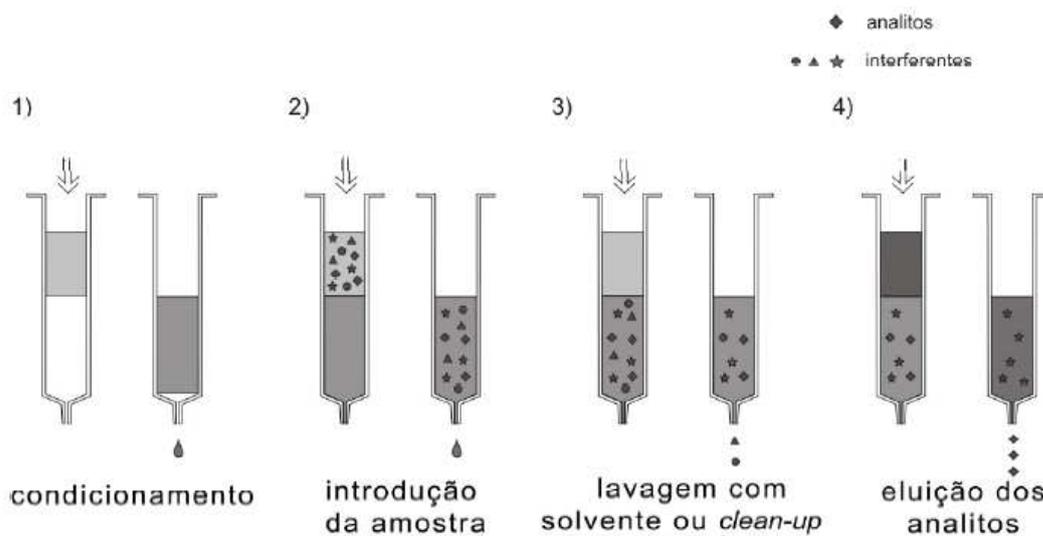
A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica amplamente utilizada no preparo de amostra em análises de rotina, de fármacos, do meio ambiente e na área de química orgânica, para amostras analisadas via cromatografia líquida ou gasosa (JARDIM, 2010). Em relação à outras técnicas, como a extração líquido-líquido, a SPE apresenta um menor consumo de solvente orgânico, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, além de aumentar seletivamente a concentração final deste (JARDIM, 2010; SIMPSON, 2000; THURMAN; MILLS, 1998).

Esta técnica tem como objetivo remover os interferentes da matriz, concentrar e isolar os analitos, por meio dos mecanismos de ação da adsorção, troca iônica, exclusão e partição (fase reversa e normal) (JARDIM, 2010; POOLE, 2020; SIMPSON, 2000; THURMAN; MILLS, 1998). Os dispositivos comumente utilizados para o emprego da SPE são os cartuchos, na forma de seringa ou barril, e os discos, esses possuem em seu interior um sorvente, que é selecionado de modo que haja boa interação com o analito, compostos em sua maioria por grupos orgânicos, como C18, C8, C2, cicloexil, fenil, aminopropil (NH₂) e cianopropil, ligados quimicamente à sílica (JARDIM, 2010; POOLE, 2020; SIMPSON, 2000; THURMAN; MILLS, 1998).

Os procedimentos para a SPE são divididos em quatro etapas (Figura 1), a primeira, o condicionamento do sorvente, na qual, com um solvente adequado, os sítios de adsorção do sorvente são ativados, permitindo máxima interação com o analito, a segunda, a introdução da

amostra, esta deve ocorrer de maneira lenta e gradual, permitindo a interação uniforme com os sítios de adsorção, nesta etapa os analitos e alguns interferentes ficam retidos. A terceira corresponde à etapa de limpeza ou *clean-up*, na qual ocorre a passagem de solventes no cartucho/disco, para a retirada dos interferentes sem eluição do analito. A última etapa corresponde à eluição do analito, desta forma, há a passagem de um pequeno volume de solvente com força de eluição suficiente para retirar o analito retido no sorvente, sem retirar os outros interferentes que não foram eliminados na etapa anterior, de modo que o analito eluído esteja em concentração apropriada para análise (JARDIM, 2010; SIMPSON, 2000; THURMAN; MILLS, 1998).

Figura 1. Etapas da extração em fase sólida (SPE) para concentração e isolamento do analito empregada no cartucho



Fonte: (JARDIM, 2010).

1.5 Validação do Método Analítico

Para assegurar a padronização é necessário a escolha de um método e o desenvolvimento da validação deste método analítico. Desta forma, no Brasil, em 2017, a ANVISA promulgou a RDC n° 166, que visa a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as fases de produção (ANVISA, 2017) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) promulgou a DOQ-CGCRE-008 que dispõe sobre a orientação da validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020).

Conforme estas diretrizes, os parâmetros para validação do método devem levar em consideração as características do analito que será identificado e quantificado. Para isto deve-se utilizar uma Substância Química de Referência Farmacopeica (SQF) reconhecida pela ANVISA (ANVISA, 2017).

A identificação do analito deverá ser composta por técnicas de caracterização aplicáveis para cada substância de interesse, podendo ser a termogravimetria, ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial, espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, análise elementar de carbono, nitrogênio e hidrogênio, difração de raio X, rotação óptica e os métodos cromatográficos, dentre outras (ANVISA, 2017).

Os resultados apresentados por este método devem trazer confiabilidade ao objetivo inicial proposto, tendo como base a SQF escolhida e os parâmetros seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez avaliados (ANVISA, 2017).

1.5.1 Seletividade

A seletividade de um método visa demonstrar a capacidade de identificar ou quantificar o analito em presença de interferentes, diluentes ou componentes da matriz (ICH, 2005). A escolha do método para medicamentos de origem vegetal, deve ser capaz de distinguir a substância de interesse em espécies vegetais semelhantes, sendo necessária a utilização de pelo menos 2 métodos analíticos de identificação (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

A resposta analítica para os métodos analíticos propostos deve ocorrer apenas para o composto de interesse, de forma que o diluente, a matriz e o analito em condições de degradação, como ampla faixa de pH e de calor, não sofra interferência (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

1.5.2 Linearidade

A linearidade de um método está relacionada com a capacidade conseguir respostas analíticas diretamente proporcionais da concentração de um analito em uma amostra (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

No desenvolvimento de um método analítico a linearidade é avaliada em toda a faixa do método, para isso utiliza-se no mínimo 5 concentrações diferentes da substância química de

referência, preparadas pelo menos em triplicata (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020).

Os resultados deste parâmetro devem estar dispostos em gráficos, na relação de resposta *versus* concentração do analito, seguido de uma avaliação estatística, na qual a equação da reta de regressão de y em obtida, seja determinada pelo método dos mínimos quadrados e o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), que atribui uma relação linear entre os dados, esteja acima de 0,990 e o valor do coeficiente angular diferente de zero. Estes testes estatísticos devem possuir um nível de significância de 5 % (ANVISA, 2017).

1.5.3 Efeito Matriz

O efeito matriz corresponde ao efeito causado pelos componentes da matriz na resposta analítica. Para o caso de matrizes complexas as diretrizes da ANVISA e INMETRO dispõem que este efeito deve ser determinado pelo comparativo das curvas de calibração construídas com o a substância de referência e com a amostra fortificada com a SQF, sendo que estas devem seguir as determinações do parâmetro de linearidade. Como resultado, as curvas devem apresentar um comportamento de paralelismo, este é um indicativo de ausência de interferência do efeito matriz, sendo analisado estatisticamente a um nível de significância de 5 % (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

1.5.4 Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a proximidade dos resultados obtidos entre as amostras preparadas durante a validação do método. Esta é determinada pela repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Para se obter a repetibilidade um mesmo analista deve preparar no mínimo 9 pontos da curva que contemplem o intervalo linear do método em 3 níveis de concentração, baixo, médio e alto, sendo realizados em triplicata cada um, na mesma instrumentação e corrida analítica (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020).

Já a precisão intermediária tem como objetivo apresentar uma proximidade de resultados de testes realizados em dias distintos, com analistas distintos, para análises de uma mesma amostra, seguindo o mesmo método. Por fim a reprodutibilidade refere-se na obtenção de resultados próximos, seguindo a mesma metodologia, em diferentes laboratórios. O resultado destes parâmetros, que constituem precisão, deverão ser demonstrados pelo cálculo

do coeficiente de variação (CV, %) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020) , conforme a seguinte equação:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Determinada}} \times 100 \quad (1)$$

1.5.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico determina o grau de proximidade entre os resultados obtidos com o valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020). A análise deste parâmetro é determinada por 9 pontos da curva, que contemplem 3 níveis de concentração, baixo, médio e alto, sendo cada ponto realizado em triplicata, em uma mesma corrida analítica.

O método analítico aplicado deve utilizar a SQF de pureza conhecida, para o preparo dos pontos da curva e o resultado deste deve ser comparado a um resultado de um método já validado. Para o caso de matrizes complexas deve-se utilizar o método de adição de padrão, na qual a quantidades da SQF conhecidas são adicionadas à amostra trabalhada (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

O resultado da exatidão deve ser apresentado de acordo com o percentual de recuperação do analito, quando se conhece a concentração adicionada à amostra, ou por um comparativo entre a concentração média experimental, com seus respectivos CV's (%) calculados, com a concentração teórica aceita (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020), conforme a equação as seguintes equações:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1-C2}{C3} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

-C1: Concentração do analito à amostra fortificada;

-C2: Concentração do analito na amostra não fortificada;

-C3: Concentração do analito adicionado à amostra não fortificada.

1.5.6 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade do analito presente na amostra, que pode ser detectado, mas não obrigatoriamente quantificado. A sua determinação pode se dar por métodos visuais, através da observação da menor concentração que causa um efeito visual esperado, ou por métodos instrumentais, que ocorrem pela razão sinal/ruído que é baseada na determinação do branco, sendo este maior ou igual a 2:1; ou ainda pela determinação dos parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020), na qual o limite de detecção pode ser obtido pela seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (4)$$

Em que IC corresponde à inclinação da curva de calibração e σ corresponde ao desvio padrão, este pode ser obtido por 3 formas distintas, através do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração, feitas com concentrações próximas ao possível limite de detecção; a partir do desvio padrão residual da linha de regressão ou pela estimativa de ruído de um número apropriado de leituras do branco (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

1.5.7 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinado com base nos parâmetros de precisão e exatidão. Este pode ser obtido por métodos instrumentais, no qual a razão sinal ruído deve ser correspondente a pelo menos 10:1; ou também com base nos parâmetros da curva analítica (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020), para isto o limite de quantificação pode ser obtido pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (5)$$

Em que IC corresponde à inclinação da curva de calibração e σ corresponde ao desvio padrão, que pode ser obtido conforme a explicação no LD.

1.5.8 Robustez

A robustez de um método analítico corresponde à sua capacidade de resistir a pequenas variações das condições analíticas. No âmbito qualitativo a análise deste parâmetro deve ser

observada na interferência na resposta analítica, já quantitativamente, as variações propostas devem seguir os critérios propostos para a exatidão (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020).

Para a validação de método analítico a RDC n° 166 da ANVISA promulgou uma avaliação de parâmetros obrigatórios em cada etapa do desenvolvimento do método, como também para as técnicas utilizadas, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros avaliados para a determinação da robustez do método analítico segundo a RDC nº 166 da ANVISA

Preparo das amostras	<p>Estabilidade das soluções analíticas</p> <p>Tempo de Extração</p> <p>Compatibilidade dos filtros</p>
Espectrofotometria	<p>Variação do pH da solução</p> <p>Diferentes lotes ou fabricantes de solventes</p>
Cromatografia Líquida	<p>Variação do pH da fase móvel</p> <p>Variação na composição da fase móvel</p> <p>Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</p> <p>Temperatura</p> <p>Fluxo da fase móvel</p>
Cromatografia Gasosa	<p>Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</p> <p>Temperatura</p> <p>Velocidade do gás de arraste</p>
Outras técnicas analíticas	<p>Variações testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados</p>

1.5.9 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho é estabelecida em conjunto com os parâmetros linearidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020), para que se possa determinar o intervalo de determinação da substância de interesse, mantendo-se dentro dos parâmetros estabelecidos pelo método analítico.

Há valores de faixa de trabalho específicos para as determinações de teor, de 80 a 120 %, para uniformidade de conteúdo, de 70 a 130 %, para teste de dissolução, de -20 % da menor concentração esperada a +20 % da maior concentração esperada conforme o perfil de dissolução; e da determinação de impurezas, sendo do limite de quantificação até 120 % da concentração no limite especificado de cada impureza (ANVISA, 2017; ICH, 2005; INMETRO, 2020).

1.6 Uso de medicamentos fitoterápicos regularizados

Com a inserção de políticas normativas que garantiram a obtenção de produtos fitoterápicos com qualidade, houve um impulsionamento do uso destes na saúde da população. Em 2014, a ANVISA publicou a Instrução Normativa nº 2, que incluíam 2 listas, a primeira de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a segunda uma de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, cada uma com 27 e 16 fitoterápicos, respectivamente (Quadro 1). Estas listas incluem a nomenclatura botânica, o nome popular, marcador, a dosagem e sua aplicação (ANVISA, 2014b).

Quadro 1. Plantas que compõem as listas de medicamentos e produtos tradicionais fitoterápicos da Instrução Normativa nº 2 da ANVISA

Nome científico		
<i>Actaea racemosa</i> L.	<i>Hamamelis virginiana</i> L.	<i>Plantago ovata</i> Forssk
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	<i>Harpagophytum procumbens</i> DC. e <i>H. zeyheri</i> Decne	<i>Polygala senega</i> L.
<i>Allium sativum</i> L.	<i>Hypericum perforatum</i> L.	<i>Salix alba</i> L., <i>S. purpurea</i> L., <i>S. daphnoides</i> Vill., <i>S. fragilis</i> L
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	<i>Matricaria recutita</i> L.	<i>Sambucus nigra</i> L.
<i>Arnica montana</i> L.	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss., <i>M. aquifolium</i> Mart.	<i>Senna alexandrina</i> Mill.
<i>Calendula officinalis</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Serenoa repens</i> (W. Bartram) Smal
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb	<i>Mentha x piperita</i> L.	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
<i>Cynara scolymus</i> L.	<i>Mikania glomerata</i> Spreng., <i>M. laevigata</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Symphytum officinale</i> L.
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey	<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	<i>Passiflora edulis</i> Sims	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) DC.
<i>Frangula purshiana</i> (DC.)	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.
<i>Ginkgo biloba</i> L.	<i>Peumus boldus</i> Molina	<i>Valeriana officinalis</i> L.
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	<i>Pimpinella anisum</i> L.	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	<i>Piper methysticum</i> G. Forst.	

Fonte: Elaborado pela autora.

Outras aplicações de fitoterápicos para saúde foram divulgados pelo Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, que publicou em 2019 uma cartilha de plantas medicinais e fitoterápicos, com dicas de uso e finalidade fitoterápica de 76 espécies autorizadas pela ANVISA (BRASIL, 2019). Dentre elas a utilização das partes áreas da Mil-folhas (*Achillea millefolium*) sob a forma de tintura 20 % para o tratamento de dispepsia, febre, falta de apetite, inflamações e cólicas (BRASIL, 2019).

Há também a menção da Babosa (*Aloe vera*), em que o gel mucilaginoso das folhas é utilizado na forma de gel 10 % e pomada 10 % em queimaduras e também como cicatrizante. Outra espécie é a Calêndula (*Calendula officinalis*), ministrada sob a forma de tintura 10 % para o tratamento de inflamações, lesões, contusões e queimaduras, ou sob a técnica de infusão

com cerca 1 a 2 g em 150 mL, para o tratamento anti-inflamatório em afecções da cavidade oral (BRASIL, 2019).

Dentre as diversas utilizações destaca-se o extrato padronizado e reconhecido pela ANVISA, o Ginkgo (*Ginkgo biloba*), amplamente vendido no mundo e no Brasil (PINTO et al., 2002), tem o extrato de suas folhas utilizadas para o tratamento de insuficiência vascular cerebral, distúrbios circulatórios periférico, vertigens e zumbidos (ANVISA, 2014b) e distúrbios psiquiátricos, este amplo uso é devido às propriedades antioxidantes do extrato (MAHADEVAN; PARK, 2008).

1.7 *Lippia sidoides*

A *Lippia sidoides* é uma espécie que pertence à Família *Verbenaceae* e tem sua hierarquia taxonômica descrita na Tabela 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Tabela 2. Hierarquia Taxonômica da *Lippia sidoides*

Hierarquia	
Classe	<i>Equisetopsida</i> C. Agardh
Subclasse	<i>Magnoliidae</i> Novák ex Takht.
Superordem	<i>Asteranae</i> Takht.
Ordem	<i>Lamiales</i> Bromhead
Família	<i>Verbenaceae</i> J. St.-Hil.
Gênero	<i>Lippia</i>

Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Esta espécie é conhecida popularmente como Alecrim-Pimenta ou Estrepa-cavalo e é encontrada no Brasil predominantemente na região Nordeste e na parte norte do estado de Minas Gerais (CARVALHO et al., 2012; DE GUIMARÃES et al., 2015; MINISTÉRIO DA

SAÚDE, 2014). É um arbusto decíduo, ereto, com caules frágeis e altamente ramificados, suas folhas são aromáticas, simples e picantes e suas flores são pequenas, esbranquiçadas reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas (Figura 2) (DE GUIMARÃES et al., 2015; OLIVEIRA, 2008).

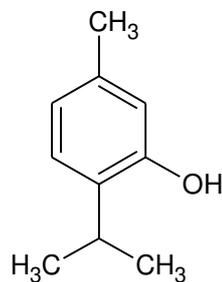
Figura 2. Estruturas morfológicas da *Lippia sidoides* (a) Ramo com flores (b) Folhas



Fonte: (CAMILLO, 2018).

A análise fitoquímica das folhas desta espécie identificou em seu óleo essencial o timol como principal composto (CRAYEIRO et al., 1981; DE GUIMARÃES et al., 2015; OLIVEIRA, 2008) sua estrutura química é apresentada na Figura 3.

Figura 3. Estrutura química do monoterpene timol, principal composto da *Lippia sidoides*



Fonte: (ACD/CHEMSKETCH, 2017)

Devido à presença do timol na *L. sidoides*, esta droga vegetal possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antissépticas, espasmolíticas, sedativas e pode ser utilizada como anestésico local (BRASIL, 2011; SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993). É utilizado

ainda para o tratamento de afecções da pele e couro cabeludo, como escabícida e antimicótico (ANVISA, 2016).

Em virtude das diversas propriedades que a *Lippia sidoides* possui, esta planta foi incluída no RENISUS, na qual uma monografia contendo informações botânicas, de controle de qualidade, segurança e eficácia foram registradas, de modo que este conhecimento científico desta droga vegetal fosse voltado para o uso medicinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014, 2015, 2017b).

Até o presente momento não existem trabalhos na literatura referentes ao desenvolvimento de método cromatográfico via CLAE-UV validado para a padronização do fitoterápico, tintura de Alecrim-Pimenta, um extrato hidroalcolólico da espécie de *Lippia sidoides*. Devido às diversas propriedades desta planta e seu registro no RENISUS, o desenvolvimento de uma metodologia que garanta a padronização deste fitoterápico se faz essencial, já que este vem sendo produzido e comercializado há anos pela Farmácia Verde de São Gotardo-MG e outras Farmácias Vivas.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O trabalho tem como objetivo o desenvolver e validar uma metodologia via CLAE-UV, para a padronização do fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta, um extrato hidroalcolólico de *Lippia sidoides*, produzido pela Farmácia Verde de São Gotardo e outras Farmácias Vivas.

2.2 Objetivos Específicos

O presente trabalho tem como objetivos:

- i) Obter uma fração enriquecida com timol, composto de interesse do extrato hidroalcolólico de *Lippia sidoides* via técnica de extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de C18 e avaliar o percentual de recuperação;
- ii) Desenvolver um método de quantificação do timol no extrato de *L. sidoides* via CLAE-UV;
- iii) Desenvolver a validação analítica do método proposto via CLAE-UV para que esta possa ser empregada nas Farmácias Vivas para garantir o controle de qualidade do princípio ativo timol, no fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e Materiais

Para o desenvolvimento do método analítico foram utilizados o padrão de timol (99,5 %) da Analítica (São Paulo, SP, Brasil), o Metanol grau CLAE (99,9 %) da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), Álcool Etílico absoluto (99,8 %) da Cromoline Química Fina (Diadema, São Paulo, Brasil) e água ultrapura, que foi purificada através do sistema *Milli-Q Plus* (Milipore). Já o fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta (1 mg/mL de timol), um extrato hidroalcoólico de *Lippia sidoides*, foi fornecido pela Farmácia Verde de São Gotardo localizada em Minas Gerais e foi utilizado o cartucho de extração em fase sólida (SPE) siliaprep C18 (17 %, 500 mg,) com 3 mL de capacidade (Silicycle; Quebec, Quebec, Canadá).

3.2 Equipamentos

3.2.1 Validação analítica do Método Cromatográfico

Foi utilizado o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Shimadzu Co (modelo LC-10), com uma coluna Luna C18 (2) (Phenomenex; Torrance, CA, EUA; 4,6 mm ID x 250 mm, 5 µm) e uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA; 4,6 mm ID x 250 mm, 5 µm). O injetor possui alça de amostragem de 20 µL e a detecção foi feita pelo detector UV/VIS (SPD-20A, Shimadzu). Já o controle do equipamento, a aquisição e análise dos dados foi feita pelo software *LC Solution*.

3.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram conduzidas no aparelho Jasco 4100 com a utilização de pastilhas de KBr (Brometo de Potássio). Os espectros foram obtidos com 256 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹ e a faixa de análise foi de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.2.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UCLAE)

O sistema de UCLAE utilizado foi o da Agilent 1260 Infinity UCLAE (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com bomba G7111B 1260 Quat, amostrador automático G7129A 1260 Vial sampler e detector G7117C 1260 DAD HS. A coluna utilizada foi a Luna C18 (2) (Phenomenex; Torrance, CA, EUA; 4,6 mm ID x 250 mm, 5 µm). E o software *OpenLab CDS ChemStation Edition* foi utilizado para as análises e aquisições dos dados e para controlar o equipamento.

3.3 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático, com a fase móvel composta por Metanol (MeOH) e água ultrapura na proporção 72:28, respectivamente. O fluxo foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi definida em 40 °C, o volume de injeção foi de 20 µL, e o tempo de análise das corridas cromatográficas foi de 12 minutos.

3.4 Preparo da Amostra

3.4.1 Purificação do Extrato

O fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta, um extrato hidroalcolólico de *Lippia sidoides* é produzido Farmácia Verde de São Gotardo-MG, um único quimiotipo desta espécie é cultivado e coletado, para que se tenha uma matéria-prima homogênea e sem variação de espécies. As folhas deste único quimiotipo são maceradas com a mistura de solvente água/etanol produzindo a tintura com o timol na concentração de 1 mg/mL. Esta tintura foi utilizada como amostra, com o objetivo de identificar e quantificar com precisão o seu componente principal, o timol.

A técnica de preparo de amostra empregada para a purificação do timol foi a adsorção em leito fixo através da extração em fase sólida (SPE) utilizando como coluna o cartucho de sílica de fase reversa C18 (500 mg). Após estudos prévios pelo grupo de pesquisa, o condicionamento pré-análise do cartucho foi definido com a seguinte sequência de solventes: 5 mL de MeOH, 3 mL de água ultrapura (UP) e 2 mL de EtOH:H₂O (Etanol e água ultrapura) na proporção 60:40. Já a etapa de limpeza e purificação do extrato foi definida com 3 mL de H₂O (UP) seguida por 7 mL H₂O:MeOH (60:40).

Para avaliar o equilíbrio de adsorção do timol em C18 e definir o volume de trabalho do extrato, quantidades sucessivas de 200 µL do extrato foram adicionadas ao cartucho, previamente condicionado, até o volume 3200 µL e coletadas, até o esgotamento do extrato, em frascos individuais para posterior análise no CLAE, todo o experimento foi feito em triplicata.

A curva de ruptura, com os dados das análises via CLAE, foi expressa na razão da concentração de saída e concentração de entrada do extrato em função do volume (mL) da solução eluída (C/Co vs. V). Para entender o comportamento de adsorção desta curva de ruptura foram utilizados o modelo de Thomas e o modelo logístico.

O modelo de Thomas é utilizado para determinar a capacidade máxima de adsorção de um adsorvente em sistemas de fluxo contínuo e é empregado para condições de adsorção

favoráveis e desfavoráveis (SRIVASTAVA et al., 2008; THOMAS, 1944, 1948; VIJAYARAGHAVAN et al., 2005). Este modelo é expresso pela seguinte equação (THOMAS, 1944, 1948):

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + e^{\frac{Kt \times (q_0 \times m_s - C_0 \times V_e)}{Fm}}} \quad (6)$$

Em que:

-C: Concentração do analito num determinado volume (mg/mL);

-C₀: Concentração inicial da solução (mg/mL);

-K_t: Constante de Thomas;

-q₀: Capacidade máxima de adsorção;

-m_s: Massa de adsorvente em gramas (g);

-F_m: Fluxo volumétrico (mL/min);

V_e: Volume da amostra na coluna.

Os parâmetros K_t e q₀ foram determinados através dos menores valores de erro pelo ajuste da razão C/C₀ dos dados experimentais da curva de ruptura, por meio da ferramenta *solver* da Microsoft.

Já o modelo logístico é representado por um sistema de equações diferenciais que permite descrever a relação entre uma variável dependente (y) e uma variável independente (x) (PEIXOTO, 2013; RATKOWSKY, 1993). Este modelo, com três parâmetros, é descrito pela seguinte equação (PINHEIRO; BATES, 2000):

$$y = \frac{\alpha}{1 + e^{(\beta - x)/\gamma}} \quad (7)$$

Em que:

-α: Um parâmetro numérico que representa a assíntota;

-β: Um parâmetro numérico que representa o valor de x no ponto de inflexão da curva;

-γ: Um vetor numérico do mesmo comprimento da entrada.

Os parâmetros α , β , e γ foram determinados estatisticamente através do método dos mínimos quadrados ordinários obtido por meio do *software* estatístico R versão 4.1.0 (R DEVELOPMENT CORE, 2021) conforme a metodologia de Pinheiro e Bates (PINHEIRO; BATES, 2000).

Todos os modelos foram expressos graficamente, para verificar em quais destes, o comportamento de adsorção da curva de ruptura do timol em C18 seria melhor representada.

A última etapa do preparo da amostra foi a análise do percentual de recuperação do timol no cartucho considerando a interação entre variáveis de interesse para atingir os níveis de ótimo, para isso foi feito um planejamento fatorial completo (2^3) com três réplicas no ponto central. Os fatores trabalhados foram Volume do Extrato (μL), MeOH (%) e o Volume de eluição (mL), ambos em 3 níveis como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Planejamento fatorial do timol com as três variáveis de interesse, em diferentes níveis, para determinar sua maior recuperação percentual

Fatores	Níveis			Resposta
	-1	0	1	Recuperação do timol (%)
(A) Volume do extrato (μL)	600	1000	1400	
(B) Metanol (%)	80	85	90	
(C) Volume da eluição (mL)	2	2,5	3	

Fonte: Elaborado pela autora.

Para cada um dos níveis, um cartucho de C18, previamente condicionado, foi utilizado, conforme o delineamento experimental da Tabela 4, para posteriormente serem analisados via CLAE.

Tabela 4. Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central do timol para análise via CLAE e determinação de sua recuperação percentual

Corridas	A	B	C	Recuperação do timol (%)
1	-1	-1	-1	
2	0	0	0	
3	1	-1	-1	
4	-1	1	-1	
5	1	1	-1	
6	-1	-1	1	
7	0	0	0	
8	1	-1	1	
9	-1	1	1	
10	0	0	0	
11	1	1	1	

Fonte: Elaborado pela autora.

Para garantir a precisão do modelo os dados experimentais foram estatisticamente analisados pela análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5 % através do software *Action* versão 3.7 para Windows (São Carlos, SP, Brasil) (EQUIPE ESTATCAMP, 2014).

3.4.2 Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para análise FTIR, 15 mL do extrato purificado foram previamente secos lentamente com o auxílio de um concentrador (TE-019 Concentrador, TECNAL) a 60 °C para a análise em comparativo com o padrão de timol e assim identificar as bandas de absorção características.

As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e os espectros foram obtidos com 256 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} , na faixa de análise de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.5 Otimização do Método Cromatográfico

A otimização do método engloba a conformidade do sistema em que o método analítico foi desenvolvido. Esta conformidade inclui testes em todos os procedimentos analíticos do processo, como equipamentos, operações analíticas e as amostras que serão analisadas de modo que estas componham um único sistema, afim de garantir resultados com precisão e exatidão aceitáveis (FDA, 1994; ICH, 2005; RIBANI et al., 2004).

A conformidade cromatográfica do sistema foi avaliada conforme as normativas da *Food and Drug Administration* (FDA), nos quais os parâmetros tempo de retenção, área do pico, o número de pratos teóricos (N), fator de retenção (k') e o fator de cauda (TF) foram avaliados (FDA, 1994). Os critérios de aceitação desta diretriz, para estes parâmetros, são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Critérios de aceitação dos parâmetros para a adequação ao sistema conforme a normativa da FDA

Parâmetro	Critérios de aceitação
Área do Pico	-
Tempo de Retenção (min)	-
Fator de retenção (k')	$k' > 2$
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$
Número de pratos teóricos (N)	$N > 2000$

Fonte: Elaborado pela autora.

Os parâmetros foram analisados com soluções do padrão de timol correspondentes ao nível médio de concentração deste na Tintura de Alecrim-Pimenta (0,45 mg/mL), em triplicata e foram determinados através do software *OpenLab CDS ChemStation Edition* do sistema de UCLAE.

3.6 Método de Validação

O método de validação analítica proposto foi desenvolvido via CLAE de acordo com as diretrizes nacionais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2017) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (INMETRO,

2020) para os parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

3.6.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método analítico proposto foi utilizada para determinar com precisão as concentrações do timol presente no extrato de *L. sidoides*, sem que o analito sofresse interferências de outras substâncias presentes na amostra (ICH, 2005; INMETRO, 2020).

Com isso a especificidade e seletividade foram avaliadas pela comparação das áreas dos picos e seus respectivos tempos de retenção nos cromatogramas correspondentes ao padrão de timol e ao extrato purificado fortificado com o padrão, de modo a avaliar se os interferentes presentes irão interferir nas análises. Estes foram submetidos às mesmas condições cromatográficas já descritas.

3.6.2 Linearidade

A linearidade foi definida pelo cálculo da linha regressão do gráfico da área do pico cromatográfico *versus* as concentrações de soluções padrão do timol, estas foram trabalhadas em 9 níveis de concentrações (0,1-1,0 mg/mL) uniformemente distribuídos e preparados em triplicata a partir da solução padrão de 20 mg/mL de timol.

Com os diferentes níveis de concentrações foram obtidas as curvas analíticas e posteriormente foi feito um estudo estatístico de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, análise de variância (ANOVA) por meio do teste F, e o teste *t-Student*, todos com nível de significância de 5 %, obteve-se também o valor do coeficiente de determinação (r^2).

3.6.3 Efeito Matriz

Em complemento ao parâmetro da seletividade o efeito matriz foi analisado para verificar se os componentes da amostra interferem no desempenho da medição do analito (INMETRO, 2020).

Assim o efeito matriz foi estimado pela construção de duas curvas analíticas, na mesma faixa de trabalho da linearidade (0,1-1,0 mg/ mL), em triplicata, uma contendo o padrão de timol e outra com a adição do padrão de timol à matriz do extrato purificado.

Posteriormente um estudo estatístico foi feito para avaliar o paralelismo das retas, igualdade do intercepto e dos coeficientes angulares por meio do teste T e teste F, ambos com 5 % de nível de significância.

3.6.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados pelos parâmetros da curva analítica, que foi construída a partir de uma matriz contendo o padrão de timol em diferentes concentrações. Os valores de LD e LQ foram obtidos com as equações (4) e (5), descritas anteriormente, na qual σ , correspondente ao desvio padrão da resposta, foi obtido pelo desvio padrão do menor nível da curva analítica.

Posteriormente, para a concentração correspondente ao limite de quantificação, foram testados os parâmetros de precisão e exatidão, para aferir condições aceitáveis a este valor de LQ (ANVISA, 2017; ICH, 2005) e estes foram analisados conformes as diretrizes do INMETRO (INMETRO, 2020).

3.6.5 Precisão

Para a análise da precisão esta foi avaliada em dois parâmetros distintos, a repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias), ambos foram analisados conforme os critérios de aceitação do INMETRO (INMETRO, 2020).

A repetibilidade foi determinada pela análise de soluções padrões do timol em três níveis de concentração dentro do intervalo linear trabalhado, baixo (0,12 mg/mL), médio (0,5 mg/mL) e alto (0,9 mg/mL), todos foram feitos em triplicata no mesmo dia e pelo mesmo analista.

A precisão intermediária também foi determinada pelo mesmo processo descrito na repetibilidade, porém após um intervalo de 3 dias de uma análise para a outra. Como boa prática metrológica, para este parâmetro foi feito uma análise estatística, por meio do teste F a 5 % de significância, para determinar se as condições testadas influenciavam significativamente (INMETRO, 2020).

Todas as análises foram feitas via CLAE e a precisão foi determinada pela dispersão dos resultados via o cálculo do coeficiente de variação (CV, %), definido pela equação (1), descrita anteriormente.

3.6.6 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela adição de padrão, nos três níveis de concentração do intervalo linear, baixo (0,2 mg/mL), médio (0,5 mg/mL) e alto (0,9 mg/mL), conforme recomendação do INMETRO (INMETRO, 2020).

Desta forma foram preparadas as soluções padrão de timol nas concentrações 0,1; 0,4; e 0,8 mg/mL e estas foram adicionadas ao extrato previamente purificado de *L. sidoides*, de concentração 0,1 mg/mL, para todos os níveis os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A avaliação da exatidão foi então determinada pela recuperação percentual média em cada nível, conforme a equação (3) descrita anteriormente.

Os critérios de aceitação para a recuperação, assim como o coeficiente de variação destes, foram avaliados conforme a normativa estabelecida pelo INMETRO (INMETRO, 2020).

3.6.7 Robustez

A robustez do método cromatográfico via CLAE-UV foi analisada pelo planejamento *Plackett-Burmann*, utilizado quando o objetivo é determinar se as múltiplas variações no método causam efeitos significativos na resposta final (BURMAN; PLACKETT, 1946; NASCIMENTO et al., 2014).

Para avaliação sete fatores influentes foram trabalhados na condição nominal e na variação em nível superior (Tabela 6), para determinar através de um arranjo experimental com a combinação dos efeitos em 8 ensaios, quais efeitos ou combinações destes podem apresentar variações respostas de interesse (INMETRO, 2020; NASCIMENTO et al., 2014).

Tabela 6. Parâmetros e variações utilizados no planejamento *Plackett-Burmann* para avaliar a robustez do método analítico

Parâmetros	Condições		Combinação dos fatores							
	Nominal (-1)	Variação (1)	1	2	3	4	5	6	7	8
(F1) Concentração de Metanol na fase móvel (%)	72	75	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
(F2) Temperatura da coluna (°C)	40	42	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
(F3) Vazão da fase móvel (mL/min)	1	1,1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
(F4) Fornecedor da coluna	Phenomenex Luna C18	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1
(F5) Comprimento de onda (nm)	278	280	-1	1	-1	1	-1	-1	1	1
(F6) Marca do Metanol	Dinâmica	J. T. Baker	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1
(F7) Concentração do ácido acético na fase móvel (%)	0	0,1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
			Respostas				T. de Retenção (min)			
							Área			

Fonte: Elaborado pela autora.

O arranjo experimental apresentado na Tabela 6 foi conduzido com o extrato já purificado e as variações das influências dos efeitos foram analisadas em relação ao tempo de

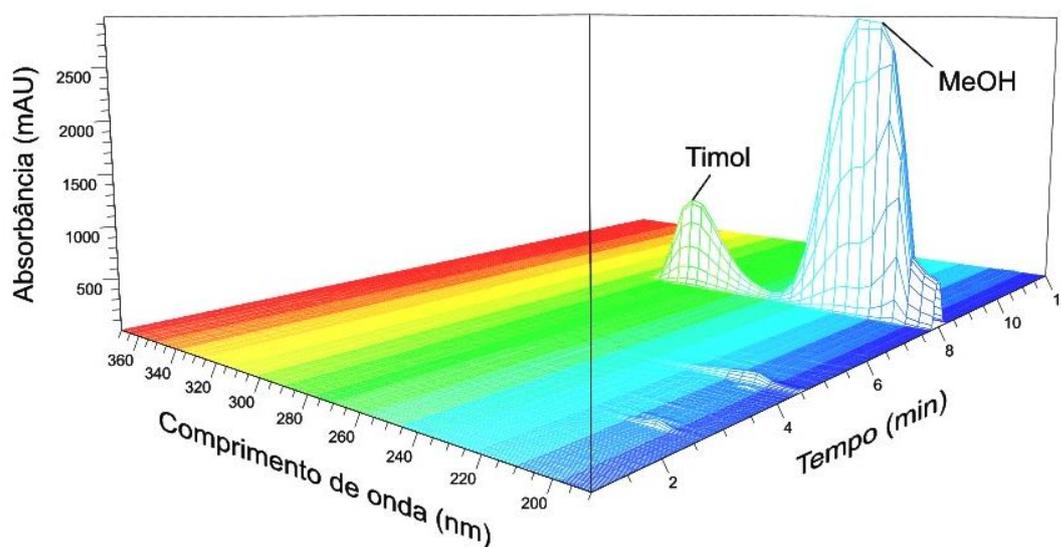
retenção (min) e à área do timol no extrato. Todos os efeitos foram submetidos à análise estatística por meio do teste *t-Student* com significância de 5 %, para determinar com precisão a robustez do método.

4. Resultados e Discussões

4.1 Condições Cromatográficas

Para determinar o comprimento de onda de detecção do timol no método foi realizado uma varredura espectral na faixa de 190 a 370 nm com uma solução padrão do timol de 0,45 mg/mL, com a condição cromatográfica no modo isocrático, fase móvel MeOH:H₂O na proporção 72:28, fluxo foi de 1,0 mL/min e temperatura da coluna em 40 °C, com tempo de análise de 12 minutos. O comprimento de onda de 278 nm apresentou a maior banda de absorção para o timol (Figura 4) e foi escolhido para o desenvolvimento do método cromatográfico.

Figura 4. Gráfico com a varredura espectral do timol realizado com padrão (0,45 mg/mL) em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Preparo da Amostra

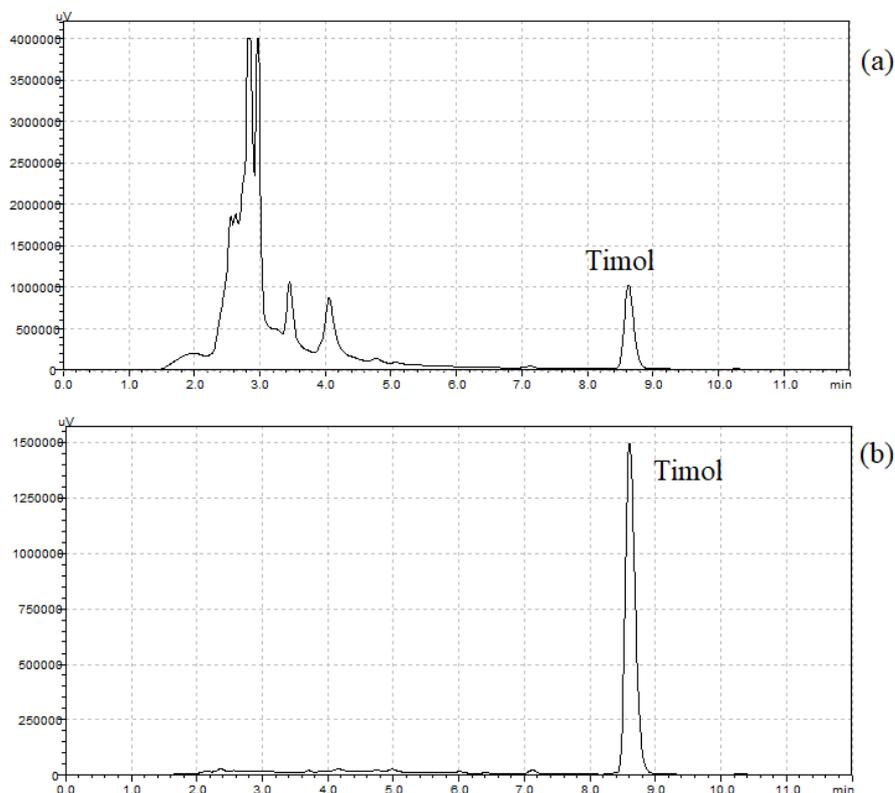
4.2.1 Extração do timol em Fase Sólida (SPE)

O processo de preparo de amostra via extração em Fase Sólida (SPE) foi aplicado, para que a quantificação do timol fosse obtida de modo rápido, preciso e dentro do limite de detecção

do método cromatográfico (MOLDOVEANU; DAVID, 2002). A maior parte dos interferentes polares presentes na amostra foram eluídos da coluna com a passagem da solução de limpeza composta pela mistura de solvente, 60:40 Água:Metanol, ficando o timol retido no sorvente C18. Para retirada deste composto do sorvente foi utilizado o eluente 80:20 de Metanol:Água, obtendo um cromatograma com sinal característico do timol, simplificando a matriz, como pode ser observado na Figura 5.

O uso de SPE no preparo da amostra para retirada dos interferentes polares e apolares leva a uma prorrogação da vida útil da coluna cromatográfica e permite a análise cromatográfica via modo isocrático, para uma amostra com uma matriz complexa. Desta forma, o tempo de análise do método é reduzido, visto que não se faz necessário a etapa de condicionamento da coluna com a fase móvel para realização da próxima análise.

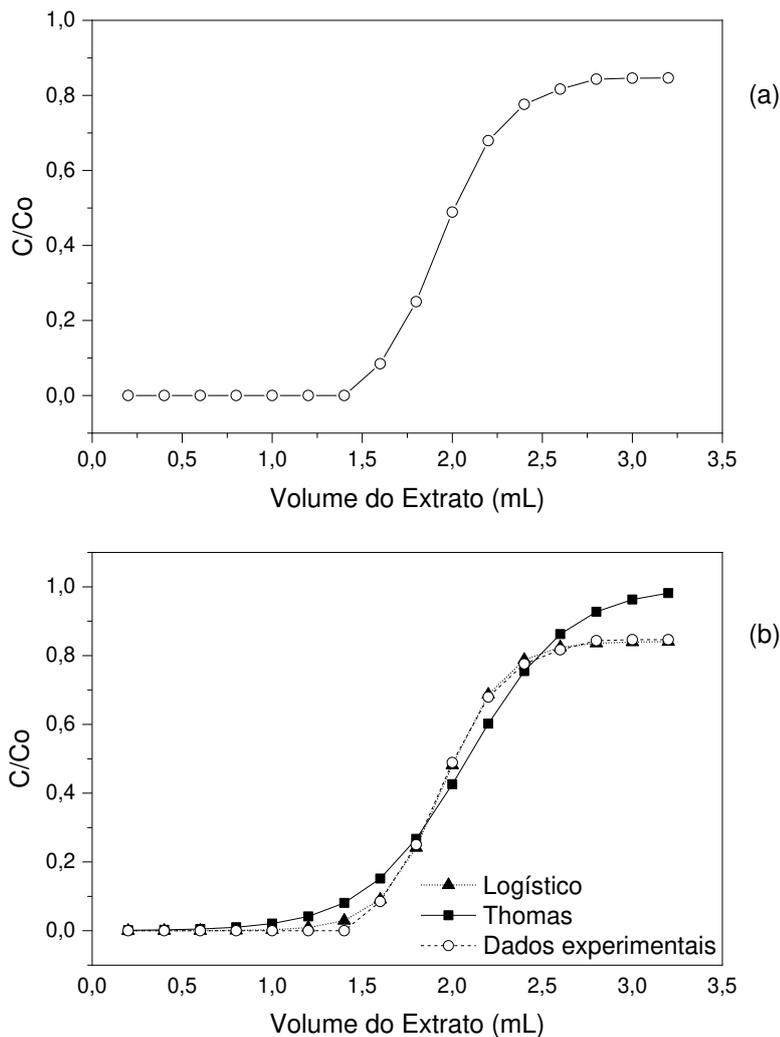
Figura 5. Cromatograma do extrato de *L. sidoides* (a) Diluído e sem o preparo de amostra (b) Após o preparo de amostra via SPE analisados via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



Fonte: Elaborado pela autora.

Para otimizar as condições de emprego da coluna de SPE, foi realizada a avaliação do equilíbrio de adsorção do timol, presente no extrato de *L. sidoides*, no sorvente C18, pela passagem, até o esgotamento, coleta e análise de 200 μL da amostra por vez, sendo o resultado apresentado na curva de ruptura (Figura 6a). O comportamento da quantidade de timol adsorvida da solução foi expresso na razão da concentração de saída e concentração de entrada em função do volume (mL) da solução eluída (C/C_0 vs. V). Constatou-se pela curva que o timol ficou retido na fase estacionária C18 até o volume de 1,4 mL do extrato e saturou todos os sítios de adsorção com 2,2 mL da amostra.

Figura 6. (a) Curva de ruptura realizada com o extrato de *L. sidoides* aplicado em fluxo contínuo para avaliar o equilíbrio de adsorção do timol em C18 (b) Representação gráfica dos modelos de Thomas e logístico e dos dados experimentais da adsorção do timol em C18



Fonte: Elaborado pela autora.

Para entender o comportamento de adsorção em fluxo contínuo do timol em C18 foram empregados o modelo de Thomas e o modelo logístico, estes também foram expressos graficamente na razão (C/C_0 vs. V) (Figura 6b).

Os valores de K_t e q_0 calculados via *solver* para o modelo de Thomas foram de 3,41 mL/min*mg e 4,33 mg/g, respectivamente, e a equação para o modelo de Thomas (8) foi calculada para o cartucho com 0,5 g de adsorvente, a curva de ruptura deste modelo é apresentada na Figura 6b.

$$\text{Concentração} = \frac{1}{1 + e^{(3,41(2,16 - 1,04 * \text{Volume}))}} \quad (8) \text{ Modelo de Thomas}$$

Já modelo logístico calculado via *software* estatístico R, apresentou resultados significativos para os parâmetros calculados α , β e γ , resultando na equação (9) e sua curva de ruptura calculada é apresenta na Figura 6b.

Conforme, pode-se observar na Figura 6b, a equação calculada pelo modelo logístico apresenta melhor ajuste aos dados experimentais, expressando melhor adsorção do timol em cartucho de C18 em função do volume de extrato aplicado.

$$\text{Concentração} = \frac{0,841}{1 + e^{\frac{1,95 - \text{Volume}}{0,166 \text{ mL}}}} \quad (9) \text{ Modelo logístico}$$

As condições analíticas da extração via SPE, foram otimizadas empregando um planejamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central. Os resultados da recuperação percentual são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz experimental do planejamento fatorial e recuperação experimental do timol

Corridas	A	B	C*	Recuperação do timol (%)
1	-1	-1	-1	105,87
2	0	0	0	103,06
3	1	-1	-1	110,77
4	-1	1	-1	20,81
5	1	1	-1	92,89
6	-1	-1	1	105,14
7	0	0	0	104,93
8	1	-1	1	106,93
9	-1	1	1	46,51
10	0	0	0	102,96
11	1	1	1	111,24

*(A) corresponde ao Volume do extrato (μL), (B) Metanol (%) e (C) Volume de eluição (mL).

Fonte: Elaborado pela autora.

No modelo estatístico acima foi empregado a análise de variância (ANOVA), para avaliar sua significância (Tabela 8).

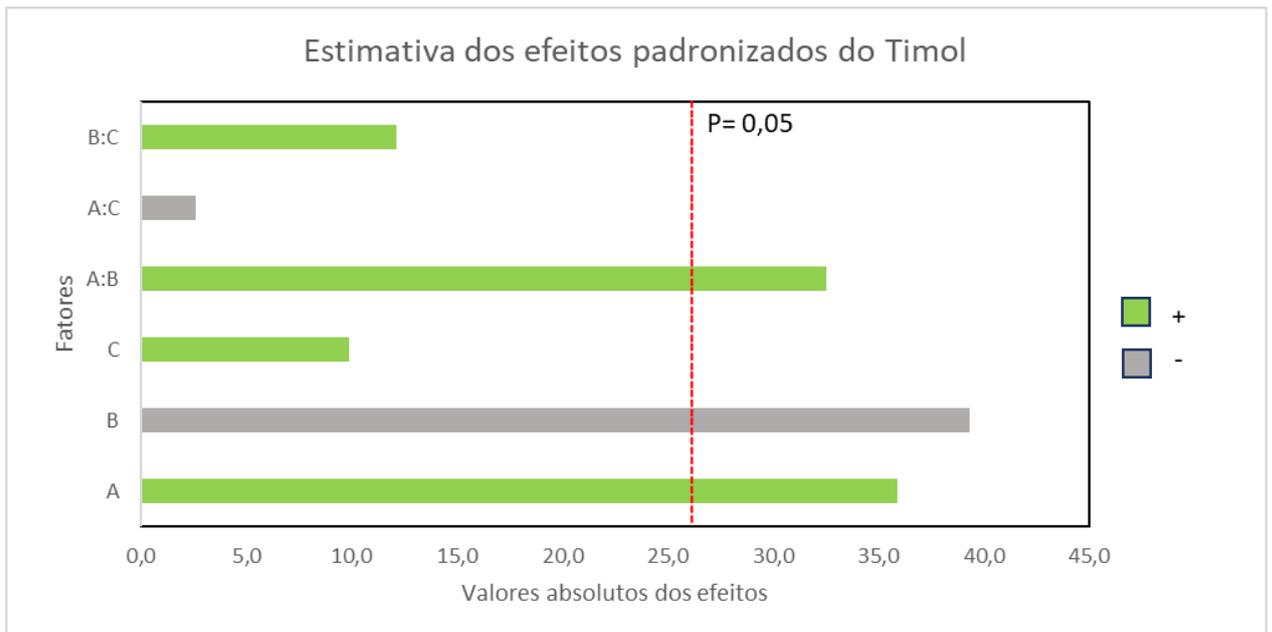
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) para o estudo do planejamento fatorial do timol

Fatores	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F-estatística	P-valor
A	1	2574	2574	18	0,013
B	1	3091	3091	22	0,010
C	1	195	195	1	0,308
A:B	1	2116	2116	15	0,018
A:C	1	14	14	0	0,773
B:C	1	295	295	2	0,224
Resíduos	4	572	143		
Falta de Ajuste	2	570	285	231	0,004
Erro Puro	2	2,46	1,23		

Fonte: Elaborado pela autora.

O nível de significância trabalhado foi de 5 %, portanto os efeitos com P-valor $<0,05$ são estatisticamente significativos. A Figura 7 apresenta gráfico de pareto com a estimativa dos efeitos padronizados do timol com base nos dados da Tabela 8.

Figura 7. Gráfico de pareto com a estimativa dos efeitos padronizados do planejamento fatorial do timol

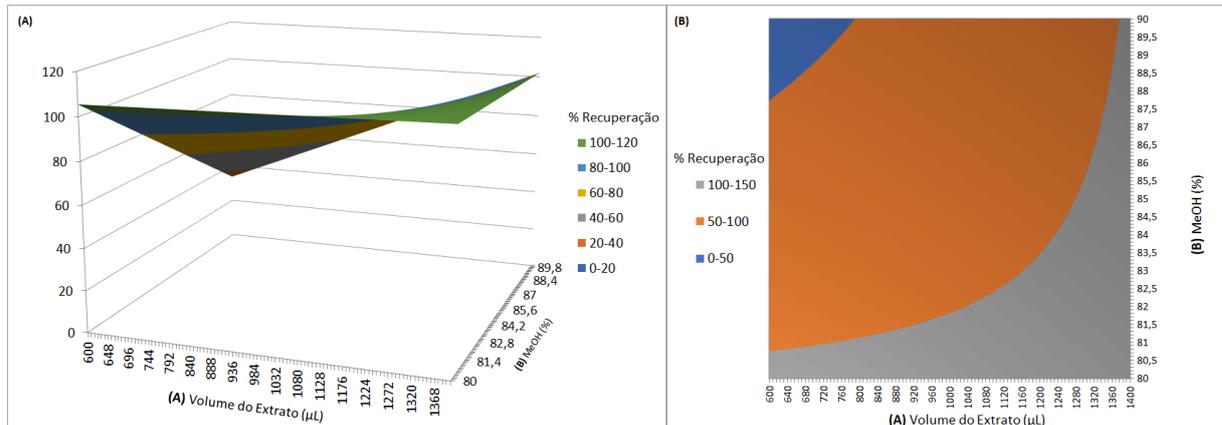


Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme os dados apresentados na Tabela 8 e na Figura 7, os efeitos volume do extrato (A), porcentagem de MeOH (B) e a interação entre volume do extrato e porcentagem do MeOH (A:B) apresentaram efeitos estatísticos significativos, sendo A e A:B efeitos positivos e B efeito negativo na porcentagem de recuperação do timol.

A região de ótimo para os fatores significativos (A e B) foi estimada através da superfície de resposta, na qual o fator C, por não ser significativo, foi fixado no ponto central (C= 0) (Figura 8).

Figura 8. (a) Superfície de resposta (b) Gráfico de Contorno das interações significativas do planejamento fatorial do timol e com o fator volume de eluição fixado no ponto central (C= 0)



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 8, mostra que para maximizar a porcentagem de recuperação do timol o volume do extrato (A) deve ser utilizado no maior nível (1400 μL), enquanto a porcentagem de MeOH (B) deve ser utilizada no menor nível (80 %).

Desta forma a condição ideal no processo de extração em fase sólida foi definida com os níveis A e B trabalhados em níveis opostos, evidenciado anteriormente com a interação A:B dos efeitos sendo negativa, e como C não se mostrou influente na resposta, optou-se por trabalhar com o menor nível de volume de extração (2 mL). Esta condição de ótimo para a purificação do timol foi utilizada em todo o processo de validação analítica.

Visando avaliar a importância deste procedimento de preparo de amostra foi realizado um teste T para avaliar se as médias das concentrações do extrato de *L. sidoides* sem o tratamento via SPE e das concentrações do extrato já tratadas diferiam estatisticamente entre si, para isso o delineamento experimental foi conduzido em quadruplicata com nível de 5 % de significância (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação estatística das médias do extrato de *L. sidoides* sem tratamento e após o tratamento via SPE

Amostra	Concentração média real (mg/mL) *	t-estatística	P-valor
Extrato sem tratamento	1,04 ± 0,08	1,44	0,200
Extrato após tratamento na SPE	0,96 ± 0,07		

* ± equivale ao Desvio Padrão (n=4).

Fonte: Elaborado pela autora.

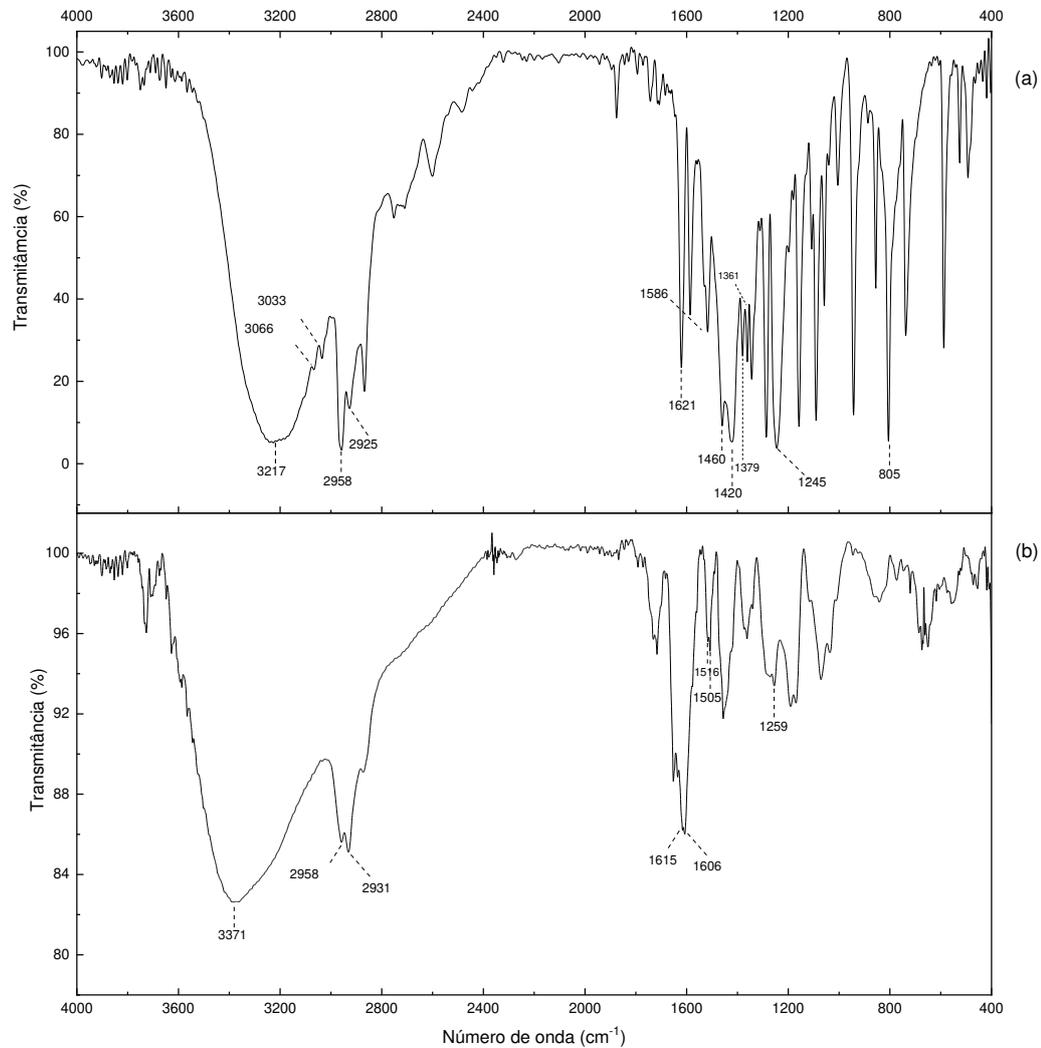
Conforme os dados da Tabela 9, o P-valor obtido após a análise estatística foi de 0,200; este por ser maior que o nível de significância atribuído (0,05), implica que as médias dos extratos não são diferentes estatisticamente entre si.

Desta forma, a concentração obtida do extrato após o tratamento por SPE é estatisticamente igual, o que ressalta a importância da utilização desta técnica como preparo de amostra, já que houve uma retirada de interferentes polares e apolares da matriz da amostra, permitindo análises sequenciais e sem o entupimento da coluna na CLAE. E nestas análises não houve a coeluição dos interferentes da matriz complexa do extrato com o timol, o que satisfaz assim as necessidades analíticas para um bom procedimento cromatográfico (MOLDOVEANU; DAVID, 2002; SIMPSON, 2000), já que há uma prorrogação da vida útil na coluna.

4.2.2 Análise de Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foram obtidos os espectros de infravermelho do padrão de timol e do extrato purificado de *L. sidoides* (Figura 9), para confirmar a presença ou a ausência de grupos funcionais através da identificação de suas bandas de absorção características (MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017).

Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho do (a) Padrão de timol (b) Extrato de *L. sidoides* purificado



Fonte: Elaborado pela autora.

O espectro de absorção na região do infravermelho do timol apresenta bandas características em 3217 cm⁻¹ que representa o estiramento da ligação -OH (CASTRO, 2004; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; OLIVEIRA, 2020; RAJKUMAR et al., 2018; SHEORAIN et al., 2019; TRIVEDI et al., 2015; WU et al., 2021), em 3066 e 3033 cm⁻¹, que representam o estiramento das ligações -CH do anel aromático (OLIVEIRA, 2020; TRIVEDI et al., 2015). Já as bandas 2958 e 2925 cm⁻¹ representam o estiramento do grupo metil (-CH₃) (CASTRO, 2004; MARKOVIC et al., 2015; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; OLIVEIRA, 2020; RAJKUMAR et al.,

2018; TRIVEDI et al., 2015; WU et al., 2021) e as bandas em 1621, 1586, 1460 e 1420 cm^{-1} representam o estiramento vibracional da ligação C=C presentes no anel aromático do timol (CASTRO, 2004; CELEBIOGLU; YILDIZ; UYAR, 2018; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; OLIVEIRA, 2020; SHEORAIN et al., 2019; TRIVEDI et al., 2015; WU et al., 2021). Por fim as bandas em 1379 e 1361 cm^{-1} representam a deformação angular do grupo isopropil (CELINO, 2016; OLIVEIRA, 2020) e as bandas em 1245 e 805 cm^{-1} representam o estiramento da ligação C-O e a deformação angular fora do plano da ligação -CH do anel respectivamente (CASTRO, 2004; CELEBIOGLU; YILDIZ; UYAR, 2018; HU et al., 2018; MARKOVIC et al., 2015; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; OLIVEIRA, 2020; WU et al., 2021).

Para o espectro de absorção na região do infravermelho da fração obtida via SPE do extrato as bandas características identificadas foram as bandas em 3371, 2958 e 2931 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação -OH e ao estiramento do grupo metil respectivamente (MARKOVIC et al., 2015; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; OLIVEIRA, 2020; RAJKUMAR et al., 2018; SANCHEZ-REXACH et al., 2016; TRIVEDI et al., 2015), devido à forte intensidade da banda de ligação do grupo -OH as bandas correspondentes ao estiramento -CH do anel aromático nesta faixa foram sobrepostas.

As 4 bandas características referentes ao estiramento da ligação vibracional C=C do anel aromático foram identificadas em 1615, 1606, 1516 e 1505 cm^{-1} (CASTRO, 2004; SHEORAIN et al., 2019; TRIVEDI et al., 2015; WU et al., 2021), sendo estas duas últimas detectadas em baixa intensidade, quando comparadas ao espectro do padrão, isto é justificado devido à presença de impurezas na fração do extrato.

Já a banda correspondente à deformação axial da ligação C-O foi identificada com intensidade reduzida em 1259 cm^{-1} (CASTRO, 2004; CELEBIOGLU; YILDIZ; UYAR, 2018; HU et al., 2018; MARKOVIC et al., 2015; MICHALSKA-SIONKOWSKA; WALCZAK; SIONKOWSKA, 2017; WU et al., 2021), o que indica que o processo de extração via SPE do extrato de *L. sidoides* foi efetivo, pois apesar da presença de impurezas na amostra, as principais bandas características do timol foram identificadas, mas faz-se uma ressalva quanto ao seu grau de pureza, que não é de 100 %, já que há uma diminuição das intensidades e também há sobreposições das demais bandas presentes no padrão de timol.

4.3 Otimização do método cromatográfico

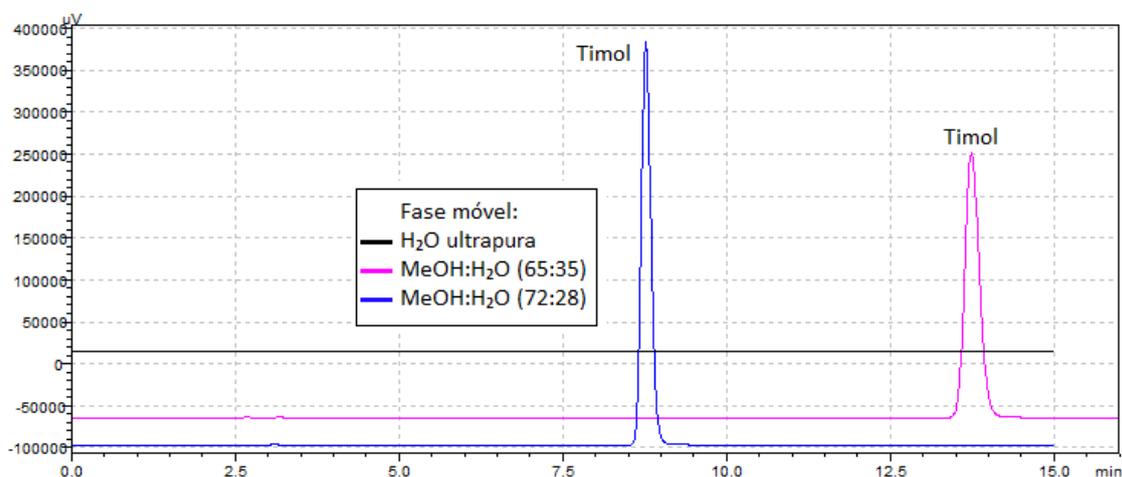
O método analítico proposto foi desenvolvido com o objetivo de se ter uma avaliação via CLAE do timol, no extrato de *Lippia sidoides*, simples e otimizada. Os parâmetros e as condições cromatográficas foram ajustados e analisados seguindo as diretrizes da FDA (FDA, 1994), para assim obter resultados confiáveis.

As análises foram conduzidas com bases em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, desta forma foi utilizado um método isocrático buscando otimizar o solvente e sua porcentagem na fase móvel, para que fosse obtido um cromatograma com boa resolução de pico, com o menor tempo de execução, buscando assim reduzir também o custo da análise.

Para a fase móvel foram testadas soluções de água ultrapura 100 %, Metanol e água ultrapura na proporção 65:35 e na proporção 72:28 (Figura 10). Destas três fases móveis trabalhadas a que se obteve melhor resolução com o menor tempo de análise foi a fase de metanol e água ultrapura na proporção 72:28, com um tempo de análise de 12 minutos.

A adequação e otimização cromatográfica, para a validação do método, foram analisadas com soluções padrão de timol (0,45 mg/mL) em triplicata e determinadas pelo software *OpenLab CDS ChemStation Edition*, do sistema de UCLAE, os resultados são apresentados na Tabela 10.

Figura 10. Cromatograma do padrão de timol (0,3 mg/mL) nas fases móveis água ultrapura, MeOH:H₂O (65:35) e MeOH:H₂O (72:28), com fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10. Adequação ao sistema do método analítico via CLAE com base nos critérios de aceitação da FDA

Parâmetro	timol*	Critérios de aceitação
Área do Pico	7988634 ± 3,481	-
Tempo de Retenção (min)	8,799 ± 0,076	-
Fator de retenção (k')	2,742 ± 0,885	k' > 2
Fator de cauda (TF)	1,216 ± 0,126	TF ≤ 2
Número de pratos teóricos (N)	15256 ± 0,232	N > 2000

* Cada valor denota a média ± % CV (n = 3).

Fonte:(FDA, 1994).

Conforme os dados apresentados na Tabela 10 todos os parâmetros analisados ficaram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pela FDA, sendo assim o método analítico proposto apresenta adequação ao sistema.

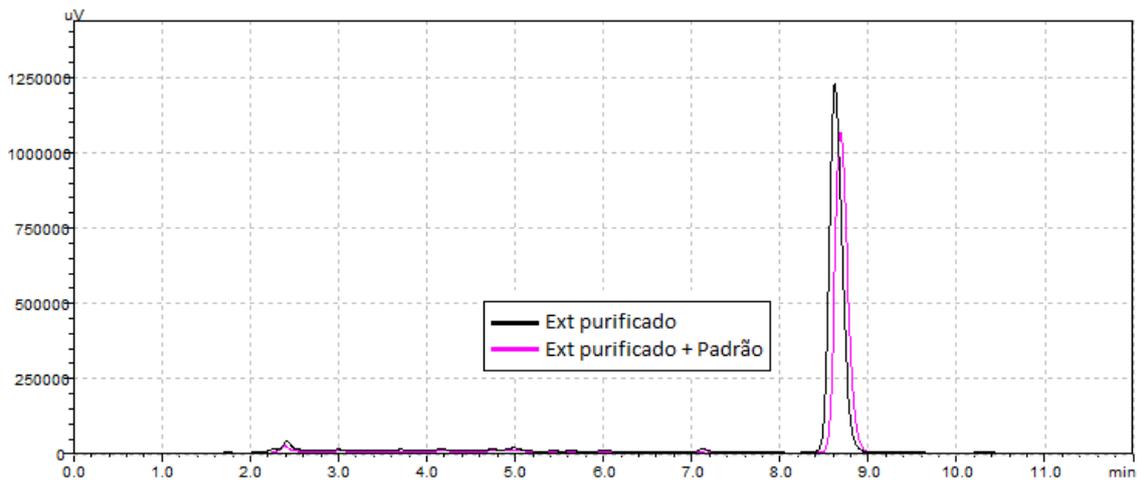
4.4 Método de Validação

4.4.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade foram avaliadas com as soluções padrão do timol correspondentes ao nível baixo de concentração deste no extrato (0,3 mg/mL) e com o extrato purificado de *L. sidoides* fortificado com esta solução padrão de timol (0,3 mg/mL), todas em quadruplicata.

O extrato purificado e o extrato purificado fortificado com a solução padrão foram injetados nas mesmas condições e foi feito um comparativo entre os tempos de retenção dos picos obtidos nos cromatogramas (Figura 11).

Figura 11. Cromatograma das amostras de extrato purificado e do extrato purificado fortificado com o padrão de timol (0,3 mg/mL) na fase móvel MeOH:H₂O (72:28), com fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



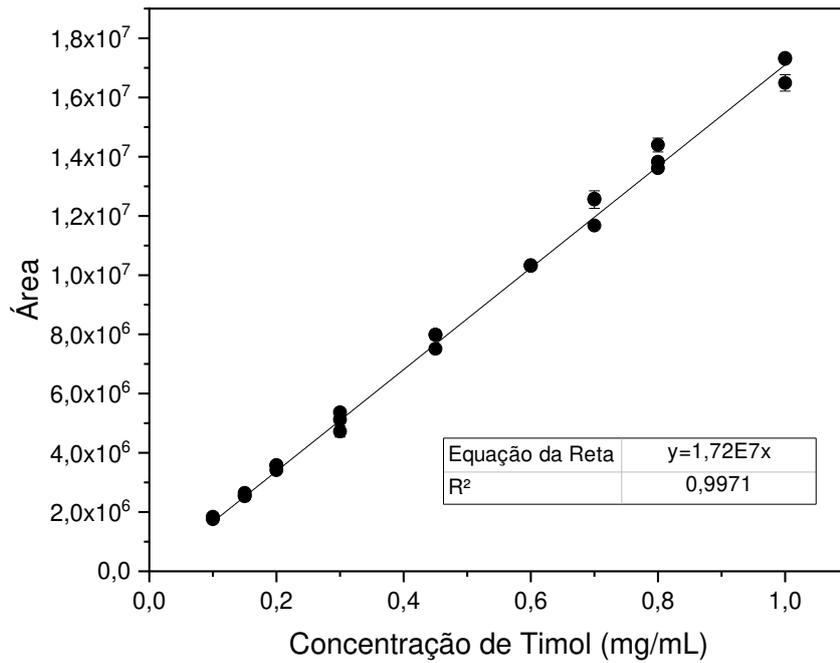
Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme apresentado na figura acima não houve interferência na resposta analítica do método, sendo esta exclusiva do analito, sendo, portanto, o método proposto seletivo.

4.4.2 Linearidade

O parâmetro linearidade foi avaliado através da construção de uma curva analítica preparada em triplicata na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mg/mL essas soluções foram injetadas nas mesmas condições cromatográficas via CLAE, e após a coleta das suas respectivas áreas foi elaborada uma representação gráfica destes dados (Figura 12).

Figura 12. Curva de Calibração do padrão de timol em triplicata analisadas via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados também foram submetidos à análise de regressão linear, Tabela 11, e à análise de variância ANOVA, Tabela 12, com o nível de significância de 5 %.

Tabela 11. Análise de Regressão para a curva de calibração do padrão de timol

	Estimativa	t-estatística	P-valor
Coefficiente angular	171812226±185593	92,57	0
Intercepto	56188±104530	0,5375	0,5957
Coefficiente de Correlação (r)	0,9985		
Coefficiente de determinação (r ²)	0,9971		

Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise de regressão com a estatística t-*Student* o intercepto foi avaliado, como o seu P-valor foi de 0,5957 este é maior que 0,05; logo a hipótese de intercepto igual a zero não é rejeitada ao nível de significância de 5 %.

O coeficiente de correlação (r) foi de 0,9985 o valor maior que o especificado nas diretrizes da ANVISA (0,990) (ANVISA, 2017), logo podemos concluir que há uma relação linear adequada.

Tabela 12. Análise de variância para a curva de calibração do padrão de timol

Parâmetro	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F- estatística	P-valor
Regressão	708958834197490	1	708958834197490	8570	0
Resíduos	2068115292740	25	82724611710		

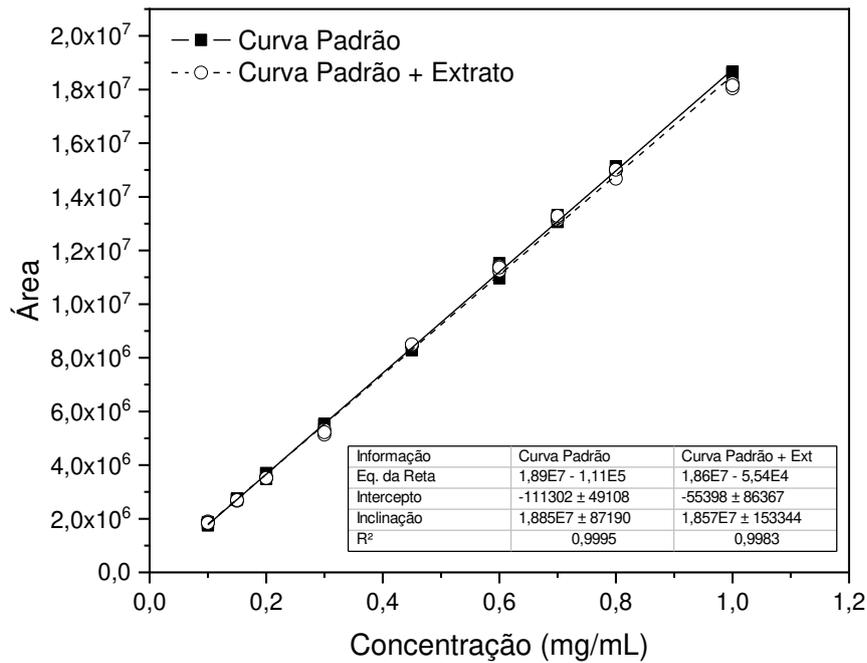
Fonte: Elaborado pela autora.

O coeficiente angular foi avaliado pelo teste F da ANOVA, no qual seu P-valor foi 0, logo a hipótese de coeficiente angular igual a zero foi rejeitada ao nível de significância de 5 %, condição esta dentro do exigido na normativa da ANVISA (ANVISA, 2017), desta forma, o método proposto apresenta linearidade.

4.4.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado com elaboração de duas curvas analíticas (Figura 13), uma apenas do padrão de timol e outra com a adição do padrão de timol na matriz do extrato de *L. sidoides* previamente purificado, no mesmo intervalo da linearidade e em triplicata.

Figura 13. Curvas de Calibração do padrão de timol e do extrato de *L. sidoides* fortificado com o padrão de timol na mesma faixa de linearidade e em triplicata, para a avaliação do efeito matriz, analisados via CLAE em fase móvel MeOH:H₂O (72:28), fluxo de 1 mL/min e temperatura da coluna ajustada para 40 °C em 12 minutos de corrida



Fonte: Elaborado pela autora.

O paralelismo das retas e o comparativo entre os coeficientes angulares das curvas analíticas foi avaliado estatisticamente por meio do teste T com significância de 5 % e o teste de coincidência, para avaliar a igualdade do intercepto e dos coeficientes angulares, foi avaliado por meio do teste F com 5 % de significância (Tabela 13).

Tabela 13. Análise estatística do Efeito Matriz para a curva de calibração do padrão de timol e para a curva com a adição do timol na matriz do extrato de *L. sidoides* previamente purificado

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Estimativa	t-estatística	F-estatística	P-valor
Igualdade do Intercepto	1	11830275736	-55903 ± 99352	-0,5627	0,317	0,576
Paralelismo	1	92960879063	278233 ± 176399	1,5773	2,488	0,121
Coincidência	2	173065223394	-	-	2,316	0,109

Fonte: Elaborado pela autora.

Na análise estatística da igualdade do intercepto por meio do teste *t-Student*, o P-valor obtido foi de 0,576; este por ser maior que 0,05; não foi rejeitada a hipótese de interceptos iguais ao nível de significância 5 %. Já para a avaliação do paralelismo o P-valor foi de 0,121; não rejeitando também a hipótese de retas com coeficientes angulares iguais, sendo, portanto, paralelas.

No teste de coincidência o P-valor foi de 0,109; sendo maior que 0,05; assim a hipótese de interceptos e coeficientes angulares iguais não foi rejeitada ao nível de significância de 5 %, sendo então as retas coincidentes. Deste modo, como as retas das curvas analíticas possuem coeficientes angulares estatisticamente iguais e paralelismo entre si, além de possuir também interceptos estatisticamente iguais, pode-se afirmar que não há efeito matriz no método proposto e a avaliação dos demais parâmetros analíticos do método podem ser avaliadas sem a matriz, já que este parâmetro ficou nos conformes das diretrizes da ANVISA e INMETRO (ANVISA, 2017; INMETRO, 2020).

4.4.4 Precisão

A precisão foi analisada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dias).

Os resultados da avaliação repetibilidade feito com as soluções padrão do timol nos três diferentes níveis de concentração, baixo, médio e alto do intervalo linear são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Análise da Repetibilidade para o timol

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração experimental (mg/mL)	Concentração experimental média (mg/mL) *	Coefficiente de Variação (%)
0,12	0,12	0,13 ± 0,004	3,18
	0,13		
	0,13		
0,5	0,48	0,51 ± 0,025	4,97
	0,52		
	0,52		
0,9	0,95	0,92 ± 0,031	3,41
	0,92		
	0,89		

* ± equivale ao Desvio Padrão (n = 3).

Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme os dados acima, o coeficiente de variação (CV) das 3 concentrações avaliadas neste parâmetro, estão dentro do valor recomendado para a validação do método conforme as diretrizes do INMETRO ($CV \leq 5,3\%$) (INMETRO, 2020).

Já a precisão intermediária tem seus dados inter-dias, que foram elaborados com soluções padrão do timol nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade, apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Análise da Precisão Intermediária do timol

Concentração teórica (mg/mL)	Dia de Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Coefficiente de Variação (%)
0,12		0,12	
	1	0,13	
	1	0,13	
	1	0,12	
	2	0,12	4,13
	2	0,13	
	2	<u>Média ± DP (n = 6)</u> 0,13 ± 0,005	
0,5		0,48	
	1	0,52	
	1	0,52	
	1	0,51	
	2	0,51	4,37
	2	0,50	
	2	<u>Média ± DP (n = 6)</u> 0,50 ± 0,022	
0,9		0,95	
	1	0,92	
	1	0,89	
	1	0,92	
	2	0,90	2,71
	2	0,89	
	2	<u>Média ± DP (n = 6)</u> 0,91 ± 0,025	

Fonte: Elaborado pela autora.

Seguindo os dados acima, os coeficientes de variação, dos três níveis de concentrações testados, ficaram dentro do valor recomendado da diretriz do INMETRO ($CV \leq 5,3 \%$) (INMETRO, 2020).

Foi avaliado também se as condições testadas influenciavam significativamente no valor do desvio padrão da precisão intermediária através do teste F com nível de significância de 5 %, conforme recomendado pelo INMETRO (INMETRO, 2020).

O primeiro nível de concentração (0,12 mg/mL) obteve um P-valor de 0,606; já o segundo nível (0,5 mg/mL) teve um P-valor de 0,646; enquanto o nível 0,9 mg/mL teve um P-valor de 0,461; todos esses valores estão acima de 0,05; sendo assim o fator dia não foi influente no DP deste parâmetro, logo o método proposto apresenta precisão.

4.4.5 Exatidão

A determinação da exatidão foi definida pela média de recuperação percentual nos 3 níveis de concentração do intervalo linear do método das soluções padrão de timol que foram adicionadas ao extrato de *Lippia sidoides*.

O percentual de recuperação do timol no extrato fortificado com concentração de 0,2 mg/mL ficou entre 100,2 % a 101,8 %, faixa está dentro dos valores de recuperação aceitos pelo INMETRO (90-107 %), já o coeficiente de variação desta concentração foi de 0,91 %, valor este também aceito conforme a diretriz do INMETRO ($CV \leq 5,3 \%$) (INMETRO, 2020).

O extrato fortificado com concentração de 0,5 mg/mL obteve um percentual de recuperação do timol entre 101,4 % a 103,8 %, sendo esta faixa aceita dentro dos valores de recuperação do INMETRO (90-107 %). O coeficiente de variação deste nível foi de 1,15 %, valor aceito pela diretriz analítica do INMETRO ($CV \leq 5,3 \%$) (INMETRO, 2020). Por fim, a faixa percentual de recuperação do extrato fortificado na concentração de 0,9 mg/mL foi de 95,8 % a 98,1 %, e o seu coeficiente de variação foi de 1,33 %, ambos os resultados obtidos ficaram dentro dos valores aceitos pela diretriz do INMETRO, recuperação entre 90 a 107 % e $CV \leq 5,3 \%$ (INMETRO, 2020), conforme apresentado na Tabela 16. Desta forma, o método proposto apresenta exatidão.

Tabela 16. Análise da Exatidão do timol

Amostra	Concentração do extrato (mg/mL)	Concentração de timol adicionada (mg/mL)	Concentração do extrato fortificado (mg/mL)	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação (%)		
	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,21 ± 0,0004	101,8	0,91		
	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,21 ± 0,0004	100,2			
	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,21 ± 0,0004	101,7			
				Média			
				101,2 ± 0,93			
	Extrato de <i>L. sidoides</i>	0,09 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,52 ± 0,0089		103,8	1,15
		0,09 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,53 ± 0,0089		102,5	
		0,10 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,53 ± 0,0089		101,4	
						Média	
						102,6 ± 1,17	
0,10 ± 0,00		0,84 ± 0,01	0,92 ± 0,0015	98,1	1,33		
0,10 ± 0,00		0,86 ± 0,01	0,92 ± 0,0015	95,8			
0,10 ± 0,00		0,85 ± 0,01	0,92 ± 0,0015	95,9			
				Média			
				96,6 ± 1,28			

* ± equivale ao Desvio Padrão (n = 3).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.6 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) foi determinado pelos parâmetros da curva analítica de padrão do timol e o desvio padrão da resposta foi obtido pelo desvio padrão do menor nível da curva analítica (0,1 mg/mL), uma vez que o branco não gerou sinal, assim o LD obtido para o método foi de 0,02 mg/mL.

4.4.7 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) também foi obtido pela curva analítica do padrão do timol, o desvio padrão foi obtido da mesma maneira que no LD, desta forma o LQ obtido foi de 0,06 mg/mL.

Para esta concentração corresponde ao LQ foram testados os parâmetros precisão e exatidão. A precisão foi avaliada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), na qual foram preparadas 6 soluções padrão de timol na concentração de 0,06 mg/mL, conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Análise da Precisão do Limite de Quantificação do timol

Concentração teórica (mg/mL)	Dia de Análise	Concentração experimental (mg/mL)	Coefficiente de Variação (%)	
0,06		0,060 ± 0,0006	Intra-dia (n= 6)	
	1	0,060 ± 0,0006	1,001	
	1	0,061 ± 0,0006		
	1	0,061 ± 0,0006		
	1	0,061 ± 0,0006		
	1	0,060 ± 0,0006		
	1	0,055 ± 0,0020		
	2	0,061 ± 0,0020		
	2	0,062 ± 0,0020		
	2	0,061 ± 0,0020		
	2	0,062 ± 0,0020		
	2	0,062 ± 0,0020		
		2	Média ± DP (n=6x2)	Inter-dias (n= 6x2)
			0,061 ± 0,0020	3,32

Fonte Elaborado pela autora.

No estudo de repetibilidade para o LQ o coeficiente de variação obtido foi de 1,001 %, sendo este um valor dentro do recomendado pela diretriz de validação de método analítico do INMETRO ($CV \leq 7,3 \%$) (INMETRO, 2020).

Já na avaliação da precisão intermediária do LQ, o coeficiente de variação obtido foi de 3,32 %, também um valor dentro do recomendado pelas diretrizes do INMETRO ($CV \leq 7,3 \%$) (INMETRO, 2020).

Neste parâmetro ainda foi avaliado se as condições testadas influenciavam significativamente no valor do desvio padrão por meio do teste F com nível de significância de 5 %, conforme recomendado pelo INMETRO (INMETRO, 2020).

Para o nível de concentração do LQ (0,06 mg/mL) o P-valor foi de 0,729; como este está acima de 0,05; o fator dia não se mostrou influente no DP deste parâmetro, sendo, portanto, o valor de LQ preciso.

Já a exatidão da concentração correspondente ao LQ (0,06 mg/mL) foi avaliada através do método de adição de padrão, no qual foram preparadas 6 soluções padrão de 0,03 mg/mL de timol, estas foram adicionadas ao extrato de *Lippia sidoides*, já purificado, também com concentração 0,03 mg/mL e com 6 réplicas.

A determinação da exatidão foi definida pela média da porcentagem de recuperação da solução preparada com o padrão de timol que foi adicionada ao extrato de *Lippia sidoides*. O percentual de recuperação do timol no extrato fortificado de *L. sidoides* ficou entre 92,9 % a 108 % (Tabela 18), faixa esta dentro do intervalo de recuperação aceito conforme as diretrizes do INMETRO (80 a 110 %) (INMETRO, 2020), já o coeficiente de variação foi de 6,28 %, valor este também aceito seguindo as normas do INMETRO ($CV \leq 7,3$ %) (INMETRO, 2020), logo o limite de quantificação de 0,06 mg/mL é exato para o método analítico.

Tabela 18. Análise da Exatidão do Limite de Quantificação do timol

Amostra	Concentração do extrato (mg/mL)	Concentração de timol adicionada (mg/mL)	Concentração do extrato fortificado (mg/mL)	Recuperação (%)	Coefficiente de Variação (%)
	0,030 ± 0,0006	0,034 ± 0,0017	0,062 ± 0,0016	92,9	6,28
	0,030 ± 0,0006	0,031 ± 0,0017	0,062 ± 0,0016	104,9	
Extrato de <i>L. sidoides</i>	0,030 ± 0,0006	0,032 ± 0,0017	0,059 ± 0,0016	93,1	
	0,031 ± 0,0006	0,031 ± 0,0017	0,062 ± 0,0016	101,3	
	0,030 ± 0,0006	0,031 ± 0,0017	0,063 ± 0,0016	108	
				103,8	
	0,029 ± 0,0006	0,029 ± 0,0017	0,060 ± 0,0016	Média	
				100,7 ± 6,32	

* ± equivale ao Desvio Padrão (n = 6).

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.8 Robustez

A robustez do método cromatográfico via CLAE-UV foi analisada utilizando o planejamento *Plackett-Burman*, e o valor mínimo de significância para a análise destes efeitos foi estabelecido em $p < 0,05$.

Para as análises do timol não foram encontrados efeitos significativos no tempo de retenção em relação a nenhum dos sete fatores, já que o valor dos efeitos de todos os fatores foi menor em relação à margem de erro (ME), que foi de 1,90 e também à margem de erro simultânea (SME), que foi de 4,55 (Figura 14a). Com esses efeitos foi feito também o teste de hipóteses *t-Student*, com nível de significância de 5 %, no qual todos dos P-valores dos fatores ficaram acima de 0,05 (Tabela 19), portanto nenhum deles interferiu no método e para esta resposta o método analítico é robusto.

Figura 14. Efeito das variações pelo planejamento *Plackett-Burman* para avaliar a robustez do método para o timol em relação **(a)** Tempo de retenção **(b)** Área

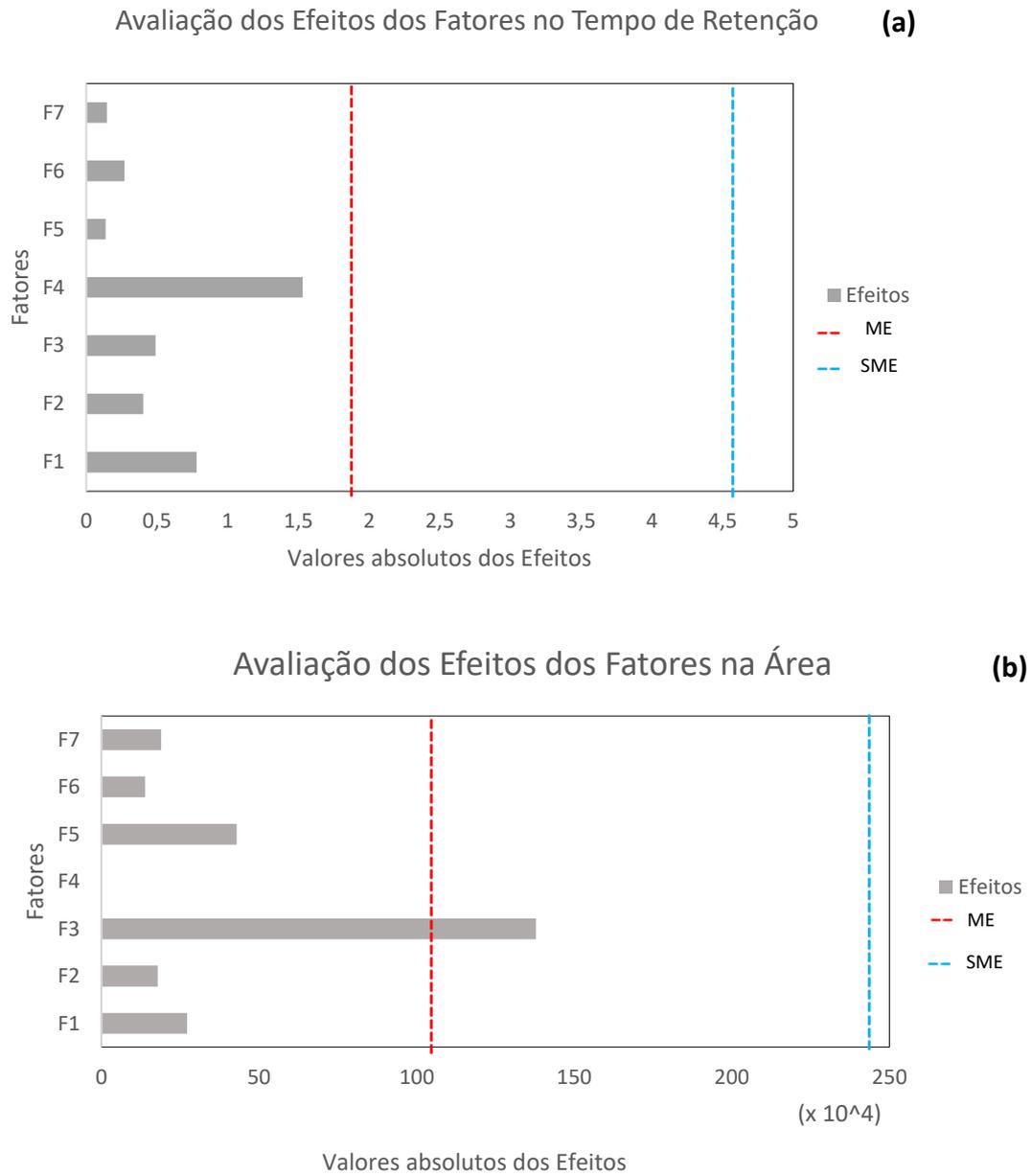


Foto: Elaborado pela autora.

Tabela 19. Efeito das variações obtidas pelo planejamento *Plackett-Burman* e teste *t-Student*

Parâmetros	Tempo de retenção (min)	P- valor	Área	P- valor
(F1) Concentração de metanol na fase móvel (%)	-0,781	0,244	-270883	0,416
(F2) Temperatura da coluna (°C)	-0,403	0,498	177996	0,575
(F3) Vazão da fase móvel (mL/min)	-0,491	0,421	-1378465	0,027
(F4) Fornecedor da coluna	-1,530	0,078	1489	0,996
(F5) Comprimento de onda (nm)	-0,136	0,809	-428407	0,242
(F6) Marca do metanol	0,270	0,640	-138720	0,658
(F7) Concentração do ácido acético na fase móvel (%)	0,145	0,798	188753	0,554

Foto: Elaborado pela autora.

Já para análise do timol em relação à área, apenas o efeito vazão da fase móvel se mostrou significativo (-1378465), por ter ficado acima do valor de ME ($\pm 1035363,5$), conforme a Figura 14b. No teste *t-Student* o P-valor (0,027) deste efeito ficou abaixo de 5 %, nível de significância aceito (Tabela 20), sendo, portanto, também um indicativo de efeito influente. Assim em relação à área, o método analítico para o timol é robusto com exceção ao parâmetro vazão da fase móvel, que deve ser mantido com fluxo de 1mL/min no método proposto.

5. Conclusão

A metodologia desenvolvida para o preparo da amostra do fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta, um extrato hidroalcolólico da *L. sidoides*, utilizando a adsorção em leito fixo, através da técnica de SPE, se mostrou eficaz e viável para simplificar a matriz, já que concentrou o timol em uma fração com recuperações percentuais de 100 %, e retirou, quase em sua totalidade, os interferentes da matriz do extrato, conforme analisado pelas bandas características no Infravermelho.

O método desenvolvido e validado via CLAE-UV para a quantificação do timol no extrato de *L. sidoides* apresentou precisão, exatidão e robustez aceitáveis nas concentrações trabalhadas do padrão de timol e do extrato purificado, o que mostra confiabilidade nos resultados encontrados, já que todos os parâmetros exigidos pelas diretrizes da ANVISA e INMETRO ficaram dentro dos valores recomendados por estas agências.

Assim, devido à eficiência do método de preparo de amostra, que prolonga a vida útil da coluna cromatográfica, além recuperações percentuais efetivas do timol, em conjunto com o método cromatográfico desenvolvido, que apresentou resultados satisfatórios em todos os parâmetros analisados, o emprego destes métodos tornam-se viáveis e de grande importância nas Farmácias Vivas, já que conseguem promover o controle de qualidade do fitoterápico Tintura de Alecrim-Pimenta com 1 mg/mL do timol em sua composição.

6. Referências Bibliográficas

ACD/CHEMSKETCH. **Advanced Chemistry Development, I. ACD/ChemSketch 2017.2.** Canadá, Toronto, Advanced Chemistry Development Inc., , 2017.

ANVISA. **Memento Fitoterápico Farmacopeia Brasileira.** Disponível em: <http://www.farmacacia.pe.gov.br/sites/farmacacia.saude.pe.gov.br/files/memento_fitoterapico.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2021.

ANVISA, A. DE V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 37, de 6 de julho de 2009. Atualiza a Resolução - RDC nº 79, de 11 de abril de 2003, que dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_37_2009_.pdf/062d13c9267341f1b4342519549065d6>. Acesso em: 11 maio. 2020.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução - RDC Nº 18, de 3 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29022>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29200>>. Acesso em: 30 abr. 2020a.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Instrução Normativa nº 2, de 13 de Maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295949/IN_02_2014_COMP.pdf/173d7c28f9854976b8b5268d911e9>

97a>. Acesso em: 12 maio. 2020b.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 10, de fevereiro de 2015. Dispõe sobre o regulamento para a realização de ensaios clínicos com dispositivos médicos no Brasil.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3503972/%281%29RDC_10_2015_.pdf/0437d155-8bf8-4a8d-8e9410ec1203a8b1>. Acesso em: 12 maio. 2020.

ANVISA, A. N. DE V. S. **RDC Nº 166, de 25 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/353660>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº318, de 6 de Novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/409542>>. Acesso em: 30 abr. 2020.

BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 01, p. 14–17, 2005.

BRASIL, A. N. DE V. S. **Formulários de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira.** Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 28 jan. 2021.

BRASIL, C. R. DE F. DO E. DE S. P. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** 4. ed. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019.

BURMAN, J. P.; PLACKETT, R. L. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–321, 1946.

CAMILLO, J. **Alecrim-pimenta (Lippia origanoides) | A planta da vez.** Disponível em: <<https://www.aplantadavez.com.br/2018/05/alecrim-pimenta-lippiaoriganoides.html>>. Acesso em: 17 ago. 2021.

CARVALHO, C. O. et al. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 183, n. 3–4, p. 260–268, 2012.

CASTRO, D. P. DE. **Atividade inseticida de óleos essenciais de *Achillea millefolium* e *Thymus vulgaris* sobre *Spodoptera frugiperda* e *Schizaphis graminum*.** [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2004.

CELEBIOGLU, A.; YILDIZ, Z. I.; UYAR, T. Thymol/cyclodextrin inclusion complex nanofibrous webs: Enhanced water solubility, high thermal stability and antioxidant property of thymol. **Food Research International**, v. 106, p. 280–290, 2018.

CELINO, K. N. **Síntese e caracterização de copolímeros Poli (N-Isopropilacrilamida-Co-6-O-Viniladipoil-D-Glicose)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

CRAYEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus Lippia. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 598–601, 1981.

DAVID, J. P. DE L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria , um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9, p. 71–76, 2004.

DE GUIMARÃES, L. G. L. et al. General characteristics, phytochemistry and pharmacognosy of Lippia sidoides. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 11, p. 1861–1867, 2015.

EQUIPE ESTATCAMP. **Software Action**. São Carlos-SP, Brasil. Estatcamp-Consultoria em estatística e qualidade, , 2014. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>

ERENO, D. Da natureza para a farmácia: Antiinflamatório feito com extrato de planta da Mata Atlântica está pronto para entrar no mercado. **Pesquisa Fapesp**, p. 78–81, 2005.

FDA, F. AND D. A. **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. Disponível em: <<https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/fda-reviewer-guidance-validation-of-chromatographic-methods-1994>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

FIOCRUZ, C. V. **Um caso de sucesso**. Disponível em: <https://mooc.campusvirtual.fiocruz.br/rea/medicamentosdabiodiversidade/um_caso_de_sucesso.html>. Acesso em: 17 abr. 2020.

FORZZA, R. C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39–45, 2012.

GENEVA, W. H. O. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. **World Health Organization**, p. 1–74, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

HU, J. et al. Preparation and properties of cinnamon-thyme-ginger composite essential oil nanocapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 85–92, 2018.

ICH, I. C. FOR H. OF T. R. FOR P. FOR H. U. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/70858/download>>. Acesso em: 2 jun. 2021.

INMETRO, C. G. DE A. **DOQ-CGCRE-008- Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios>. Acesso em: 25 fev. 2021.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAHADEVAN, S.; PARK, Y. Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, efficacy, safety, and uses. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 1, p. 14–19, 2008.

MARKOVIC, D. et al. Impregnation of corona modified polypropylene non-woven material with thymol in supercritical carbon dioxide for antimicrobial application. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 101, p. 215–221, 2015.

MICHALSKA-SIONKOWSKA, M.; WALCZAK, M.; SIONKOWSKA, A. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. **Polymer Testing**, v. 63, p. 360–366, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html>. Acesso em: 22 maio. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt0886_20_04_2010.html>. Acesso em: 20 abr. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie Lippia sidoides (Alecrim- Pimenta)**. [s.l.] Ministério da Saúde e Anvisa, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Prorrogada a consulta pública sobre espécies medicinais da**

Renisus. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/sas/1334-fitoterapicos-noticias/16353-prorrogada-a-consulta-publica-sobre-especies-medicinais-da-renisus>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Financiamento da Assistência Farmacêutica em Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/acoeseprogramas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/financiamento-da-assistencia-farmacutica>>. Acesso em: 22 maio. 2020a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Renisus.** Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 22 maio. 2020b.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Sample preparation in chromatography.** 1. ed. Amsterdã: Elsevier, 2002.

NASCIMENTO, R. F. DO et al. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais.** Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014.

NETTO, E. M. et al. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 9–17, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NÓBREGA, A. B. DA. **Padronização de extratos de Eugenia florida DC. e seu estudo toxicológico para o desenvolvimento de um fitoterápico ou fitofármaco.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2012.

OLIVEIRA, T. C. **CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO DE ACESSOS DE ALECRIM-PIMENTA (Lippia sidoides Cham .) MANTIDOS EM BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA EM SÃO CRISTÓVÃO – SE.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 2008.

OLIVEIRA, T. S. **Estudo teórico das propriedades estruturais, eletrônicas e espectroscópicas da molécula timol em fase gasosa e solvente.** [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2020.

PEIXOTO, A. P. B. **Análise da dinâmica do potássio e nitrato em colunas de solo não saturado por meio de modelos não lineares e multiresposta.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

PINHEIRO, J. C.; BATES, D. M. **Mixed-Effects Models in S and S-PLUS.** 1. ed. Nova York: Springer, 2000.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. Supl. 1, p. 45–61, 2002.

POOLE, C. F. **Solid-Phase Extraction.** Detroit: Elsevier, 2020.

R DEVELOPMENT CORE. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna, 2021. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>

RAJKUMAR, P. et al. Vibrational and electronic spectral analysis of thymol an isomer of carvacrol isolated from *Trachyspermum ammi* seed: A combined experimental and theoretical study. **Chemical Data Collections**, v. 15–16, p. 10–31, 2018.

RATKOWSKY, D. A. Principles of nonlinear regression modeling. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, n. 3–5, p. 195–199, set. 1993.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SANCHEZ-REXACH, E. et al. Antimicrobial poly(ϵ -caprolactone)/thymol blends: Phase behavior, interactions and drug release kinetics. **European Polymer Journal**, v. 83, p. 288–299, 2016.

SHEORAIN, J. et al. In vitro anti-inflammatory and antioxidant potential of thymol loaded bipolymeric (tragacanth gum/chitosan) nanocarrier. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 1069–1074, 2019.

SIMPSON, N. J. K. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications.** 1. ed. Nova York: Marcel Dekker, 2000.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (Quebra-Pedra).** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

SOUZA BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant

research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 53–67, 1993.

SRIVASTAVA, V. C. et al. Prediction of Breakthrough Curves for Sorptive Removal of Phenol by Bagasse Fly Ash Packed Bed. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, n. 5, p. 1603–1613, 2008.

THOMAS, H. C. Heterogeneous Ion Exchange in a Flowing System. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, n. 10, p. 1664–1666, 1944.

THOMAS, H. C. Chromatography: A Problem in Kinetics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 49, n. 2, p. 161–182, 1948.

THURMAN, E. M.; MILLS, M. S. **Solid-Phase Extraction: Principles and Practice**. Nova York: Wiley, 1998.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos : uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1, p. 7–13, 2014.

TRIVEDI, M. K. et al. Structural and Physical Properties of Biofield Treated Thymol and Menthol. **Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research**, v. 03, n. 02, p. 0–10, 2015.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, K. et al. Continuous Sorption of Copper and Cobalt by Crab Shell Particles in a Packed Column. **Environmental Technology**, v. 26, n. 3, p. 267–276, 2005.

WU, H. et al. Development and characterization of antimicrobial protein films based on soybean protein isolate incorporating diatomite/thymol complex. **Food Hydrocolloids**, v. 110, p. 106138, 2021.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZUCO, V. et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Letters**, v. 175, n. 1, p. 17–25, 2002.