



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS (CCMF)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA O ÁCIDO NORDIHIDROGUAIARÉTICO

FERNANDA CAROLINA RIBEIRO DOS SANTOS

CASCABEL

2020

FERNANDA CAROLINA RIBEIRO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA O ÁCIDO NORDIHIDROGUAIARÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de pesquisa Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos

Coorientador: Dr. Osmar dos Reis Antunes Junior

CASCABEL

2020

Santos, Fernanda Carolina Ribeiro dos
Desenvolvimento e validação de um método analítico
indicativo de estabilidade para o ácido
nordihidroguaiarétilico / Fernanda Carolina Ribeiro dos
Santos; orientador(a), Helder Lopes Vasconcelos;
coorientador(a), Osmar Reis Antunes Junior, 2020.
83 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas
e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, 2020.

1. Ácido Nordihidroguaiarétilico. 2. Larrea Tridentata.
3. Estudo de Degradação Forçada. 4. Cromatografia Líquida de
Alta Eficiência. I. Vasconcelos, Helder Lopes. II. Junior,
Osmar Reis Antunes. III. Título.

FERNANDA CAROLINA RIBEIRO DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O ÁCIDO
NORDIHIDROGUAIARÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos

Co-orientador: Dr. Osmar Reis Antunes Junior

BANCA EXAMINADORA:

Helder d. Vasconcelos

Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos
Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE
Orientador

Fernanda Bueno

Profa. Dra. Fernanda Giacomini Bueno
Universidade Estadual do Oeste do Paraná-UNIOESTE
membro

Marcos Donizete Peliçon Pereira
Dr. Marcos Donizete Peliçon Pereira
Prati Donaduzzi
membro

Cascavel - PR
2020

BIOGRAFIA RESUMIDA

Fernanda Carolina Ribeiro dos Santos, natural de Assis Chateaubriand, Paraná, Brasil, nasceu em 11 de maio de 1995, graduada em Farmácia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUC, campus Toledo (2016). Possui vínculo empregatício com a empresa Prati Donaduzzi & Cia Ltda desde 2015. Atualmente, é mestrandona Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa de Fármacos e Medicamentos, e é orientada pelo Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcelos e coorientada pelo Dr. Osmar dos Reis Antunes Junior.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.
(Arthur Schopenhauer)

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, meus maiores exemplos,
Genésio e Eliana, e às minhas irmãs, Isabela e
Giovana, por serem minhas principais
motivadoras de seguir em frente. Ao meu noivo
Fábio, por todo o apoio e amor. E agradeço a
Deus por iluminar meu caminho.
Sem vocês não seria possível realizar este
sonho...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ser meu guia. Obrigada por me proporcionar força e sabedoria durante esta caminhada.

Aos meus pais, Genésio e Eliana, e às minhas irmãs, Isabela e Giovana, agradeço todos os ensinamentos, apoio, incentivo e principalmente ao amor. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por tudo o que enfrentaram para garantir minhas vitórias, com certeza, elas são também conquistas de vocês. Amo vocês.

Ao meu noivo, Fábio, por ter me apoiado desde o início desta caminhada. Pela confiança, paciência, amor e por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desanimar. Eu te amo.

Aos meus amigos de trabalho, por toda ajuda, pelo apoio, companheirismo, parceria e pelas risadas durante este período tão importante da minha formação acadêmica.

Ao meu Orientador, Prof Dr. Helder Lopes Vasconcelos, agradeço por ter me acolhido nessa etapa acadêmica tão importante. Obrigada por ter confiado em mim e pelo apoio de sempre.

Ao meu Coorientador, Dr Osmar dos Reis Antunes Junior, pelas revisões, correções e sugestões.

Ao Prof Dr. Gilberto Costa Braga, por gentilmente disponibilizar o cromatógrafo líquido do laboratório de pesquisa de tecnologia de alimentos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) Campus de Marechal Cândido Rondon para a presente pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE, pela oportunidade.

E a todos que, direta ou indiretamente, participaram na execução deste trabalho, expresso aqui meus sinceros agradecimentos.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O ÁCIDO NORDIHIDROGUAIARÉTICO

RESUMO

O ácido nordihidroguaiarético (NDGA) é um dos principais metabólitos gerados pela planta *Larrea tridentata*, cujos estudos clínicos comprovam sua segurança e eficácia em efeitos terapêuticos, como anti-inflamatório e antineoplásico. É atribuído elevado potencial antioxidante a esta molécula, devido à estrutura química ser composta por grupamentos catecós. Atualmente, órgãos de regulamentação, tais como ANVISA e FDA, delimitam diretrizes para os processos de registro e pós-registro de medicamentos. Dentro desta esfera, metodologias analíticas são exigidas para cumprimento de normas, como as resoluções da diretoria colegiada – RDC nº 166, 2017 e RDC nº 53, 2015. Assim, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para a matéria-prima do NDGA por cromatografia líquida de alta eficiência. O desenvolvimento foi realizado a partir de testes iniciais, que envolveram otimizações da fase móvel, coluna, concentração das soluções entre outros, até que a metodologia apresentou-se como apta para ser validada. Em seguida, o perfil de degradação do ativo foi definido por estudo de degradação forçada que tende a avaliar a aplicabilidade do método analítico na separação das impurezas geradas após condições de estresse. As condições foram definidas a partir de recomendações contidas em guias nacionais e internacionais que contemplam estresses químicos e físicos. Os estresses químicos consistiram da exposição das amostras a condições de: hidrólise em ampla faixa de pH, além da oxidação por íons metálicos e reagente oxidante. Já as condições de degradação física consistiram da exposição das amostras para aquecimento, umidade e fotodegradação. Após concluir o desenvolvimento do método, seguiu-se com os parâmetros da validação: seletividade, linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão e robustez. O sistema cromatográfico definido no desenvolvimento foi em modo gradiente utilizando como fase móvel água e metanol com fluxo de 1,0 mL/min, em um volume de injeção de 3 µL, coluna Agilent Eclipse XDB-C18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm em temperatura ambiente e a detecção foi realizada em 283 nm. O método proposto demonstrou ser seletivo, pois os produtos de degradações gerados não interferiram na detecção nem na quantificação do NDGA, preciso, linear e robusto dentro da faixa de trabalho. Após a exitosa realização de todas as análises pertencentes à validação da metodologia analítica, conclui-se que o método proposto é indicativo de estabilidade para dosar a matéria-prima do NDGA.

Palavras-chave: *Larrea tridentata*. Estudo de degradação forçada. Cromatografia líquida de Alta Eficiência.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD AS AN INDICATIVE OF STABILITY FOR NORDIHIDROGUAIARETIC ACID

ABSTRACT

Nordihydroguaiaretic acid is one of the main metabolites produced by *Larrea tridentata* plant, to which clinical studies have testified its safety and efficacy in therapeutic effects, such as anti-inflammatory and antineoplastic ones. High antioxidant potential is attached to this molecule, because its chemical structure is composed of catechol sheets. Currently, regulatory agencies such as ANVISA and FDA, have determined guidelines to register processes and post-registration of drug therapies. According to such area, analytical methodologies are required to fulfill with norms, such as the resolutions of the collegial board of directors – RDC Nº 166, 2017 e RDC Nº 53, 2015. This research aimed at developing and validating an analytical method as a suggestion of stability for nordihydroguaiaretic acid raw material by high performance liquid chromatography. The development was carried out based on initial tests, with optimizations of mobile phase, column, concentration of solutions among others, until the methodology was shown to be validated. Then, the degradation profile of the active was defined according to the forced degradation study that tends to evaluate the analytical method applicability to separate impurities produced after some stress conditions. The conditions were defined based on national and international guides' recommendations that meet chemical and physical stresses demands. Chemical stresses consisted on exposing samples to the following conditions: hydrolysis in a wide pH range, besides oxidation by metal ions and oxidizing reagent. While, physical degradation conditions consisted on exposing samples to heating, humidity and photodegradation. When the method development was concluded, validation parameters were followed such as: selectivity, linearity, linear range, accuracy, precision (intra- and inter-day) and robustness. The chromatographic system, defined along the development, was in gradient mode using as mobile phase water and methanol with 1.0 mL/min flow, and 3- μ l volume injection, 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m XDB-C18-Agilent Eclipse column, at room temperature and 283-nm detection. The proposed method proved to be selective, since the products from degradation did not interfere on a precise, exact, linear and robust NDGA detection as well as quantification, within the working range. After the successful completion of all analyses concerning the analytical methodology validation, it can be concluded that the proposed method is an indicative of stability to dose NDGA raw matter.

Keywords: *Larrea tridentata*. Forced degradation study. High Performance Liquid Chromatography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	15
1.1. Objetivo Geral	15
1.2. Objetivos Específicos	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. A história dos fitoterápicos	16
2.2. A influência das agências regulamentadoras na eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos	17
2.3. <i>Larrea tridentata</i>	18
2.4. Ácido nordihidroguaiarétilo e suas aplicações farmacológicas	19
2.4.1. Características estruturais e químicas.....	21
2.5. Análise de fármacos por CLAE	22
2.5.1. Parâmetros cromatográficos.....	23
2.6. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica.....	26
2.6.1. Métodos indicativos de estabilidade.....	27
2.6.2. Estudo de estabilidade	28
2.6.3. Perfil de degradação.....	29
2.6.4. Seletividade.....	29
2.6.4.1. Estudo de degradação forçada (EDF).....	30
2.6.5. Linearidade	32
2.6.6. Intervalo Linear	33
2.6.7. Precisão	33
2.6.8. Exatidão	34
2.6.9. Robustez	34
3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO	36
4. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6. ANEXOS	56
6.1. Anexo 1 - Desenvolvimento de método analítico	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	74

7.2. CAPÍTULO 1 -ARTIGO	80
-------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos testes, segundo sua finalidade.	26
Tabela 2 Parâmetros a serem considerados na validação analítica.	27
Tabela 3 Recomendações das condições experimentais no estudo de degradação forçada.	31
Tabela 4 Limites para Notificação, Identificação e Qualificação dos produtos de degradação.	32
Tabela 5 Faixa de trabalho de acordo com a finalidade do método.	33
Tabela 6 Condições que devem ser consideradas na robustez.	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química do NDGA.....	21
Figura 2 Instrumentação CLAE.....	23
Figura 3 Parâmetros a serem considerados na adequação do sistema.....	23
Figura 4 Medidas ao cálculo da resolução.....	24
Figura 5 Medidas associadas ao cálculo de fator de cauda.....	25
Figura 6 Relação entre o perfil "potencial" e o perfil "real" de degradação.	29

LISTA DE ABREVIASÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração Média Determinada
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDF	Estudo de Degradação Forçada
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
Fc	Fator de Cauda
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
K	Fator de Retenção
N	Eficiência
NDGA	Ácido Nordihidroguaiarético
OMS	Organização Mundial da Saúde
R	Coeficiente de Correlação
R ²	Coeficiente de Determinação
RDC	Resolução da Diretoria colegiada
RE	Retículo Endoplasmático
Rs	Resolução
SQR	Substância Química de Referência
SQC	Substância Química de Referência Caracterizada
T	Fator de Simetria
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
tR	Tempo de Retenção
A	Fator de Separação

1. INTRODUÇÃO

A *Larrea tridentata* (DC) Coville é um arbusto presente em desertos e pastagens, cujas características fitoquímicas e farmacológicas ainda estão sendo exploradas. Porém, foi observado que seu composto fenólico bioativo ácido nordihidroguaiarétilico (NDGA) apresentou efeito terapêutico significativo.

Isolado pela primeira vez em 1945 por Waller e Gisvold, o NDGA desde então demonstrou apresentar propriedades antioxidantes com o interesse em desenvolver novas pesquisas. Além disso, houve estudos clínicos que comprovaram seus efeitos antineoplásicos e anti-inflamatório. Com base nos dados apresentados nos estudos clínicos, outros pesquisadores demonstraram interesse em explorar e aprimorar este metabólito, com a finalidade de diminuir a toxicidade e potencializar seu efeito terapêutico. Ao tentar o aprimoramento dos estudos, a molécula do NDGA passou a ser direcionada para gerar novos derivados, como os metabólitos secundários semissintéticos extraídos do NDGA a partir de sínteses orgânicas.

Para que um medicamento chegue ao paciente, é importante salientar que é preciso apresentar dados comprobatórios de sua matéria-prima, ou seja, insumo farmacêutico ativo (IFA). Com isso, realizam-se validações analíticas para comprovar a segurança e a eficácia deste IFA. Para garantir que o método seja indicativo de estabilidade, as indústrias farmacêuticas realizam os testes de estresses para auxiliá-los, nos quais são obtidas informações sobre a degradação gerada. As amostras referentes ao estudo de degradação forçada (EDF) são submetidas a estresses ácidos, básicos, oxidativos, fotolíticos, térmicos e úmidos. Estes requisitos são estabelecidos por diretrizes determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/ 2017 e a RDC nº 53/ 2015.

As metodologias analíticas com finalidades específicas de identificação e quantificação podem ser desenvolvidas localmente ou adequadas de farmacopeias nacionais e internacionais. Assim, o método passa a ser indicativo de estabilidade quando contém o EDF. Devido à ausência destes dados na literatura e à importância de conhecer seu IFA e seus produtos de degradação para iniciar projeções de formulações, este projeto teve como finalidade desenvolver e validar um método analítico de

doseamento do IFA de NDGA, subsequente do EDF para determinar se o método é indicativo de estabilidade.

OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método de doseamento indicativo de estabilidade do IFA do NDGA.

1.2. Objetivos Específicos

- Utilizar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por arranjo de diodos (DAD) para desenvolvimento e validação de uma metodologia indicativa de estabilidade para o NDGA.
- Expor o IFA a condições de estresses como hidrólise, fotólise, oxidação, calor e umidade para verificar a seletividade do método e a capacidade de separações dos produtos de degradação gerados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A história dos fitoterápicos

A utilização de fitoterápicos e derivados ocorre há milênios, os quais atuam como agentes terapêuticos (KINGHORN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2016). Os primeiros relatos fitoterápicos ocorreram entre 2838 e 2698 a.C, pelo imperador chinês Shen Nung, que relacionou o uso de plantas medicinais e venenos à influência taoísta de Pan Ku, que é considerado o deus da criação (VALE, 2002).

Historicamente, a erva e seus derivados são utilizados em tratamentos para diversas doenças, principalmente em práticas indígenas. Em vários países, as ervas já são reconhecidas como drogas e prescritas em associação a tratamentos médicos convencionais (LÜ et al., 2010).

A exploração de novas plantas medicinais ainda é pequena, sendo estimadas de 250.000 a 500.000 espécies de plantas, porém, a percentagem exposta à triagem farmacológica e biológica é de 1 a 10% (GHOSH et al., 2011; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Por um longo período, houve um desinteresse pelas plantas medicinais, devido à dificuldade em se identificar a origem delas bem como obter um controle de qualidade. Algumas causas são decorrentes da acessibilidade na coleta em seu habitat natural, identificação e nomenclatura, além das alterações na taxonomia vegetal que aumentam a dificuldade na identificação botânica. Outro fator relacionado ao desinteresse para estudar erva é o crescimento das indústrias farmacêuticas e pelo interesse para sínteses orgânicas para a produção dos fármacos (BUCAR; WUBE; SCHMID, 2013; DAVID; DIAS; WOLFENDER, 2015; RATES, 2001; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Logo, o desenvolvimento de moléculas, em meio a tantas descobertas na ciência, faz com que o desenvolvimento socioeconômico se depare com fontes renováveis, como a potencialidade de plantas medicinais, para assim obter maior aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas (SIMÕES et al., 2017).

Países menos desenvolvidos tecnologicamente que o Brasil apresentam maiores números de pesquisas no mercado dos fitoterápicos, apesar de o Brasil ser o detentor de um terço da flora mundial (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Para um fitoterápico ser considerado eficaz, seguro e com alto padrão de qualidade, ele deve ser analisado por análises quantitativas e qualitativas em fases preliminares do medicamento (BARA et al., 2006).

A garantia da qualidade não possui muitos critérios ainda que predispõem a qualidade do produto ofertado ao consumidor (CRUZ; ALVIM, 2013).

2.2. A influência das agências regulamentadoras na eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos

A eficácia, a segurança e a qualidade da medicina tradicional são comprometidas pela falta de controle de qualidade e fiscalização mais rigorosa nas agências nacionais (EKOR, 2014).

Muitos fitoterápicos são comercializados sem possuir o certificado de qualidade e a identificação da planta, tornando-se assim um problema público voltado aos órgãos regulamentadores. Em 2011, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em resposta às intensificações dos casos, ressaltou a necessidade de apoiar pesquisas científicas voltadas a fitoterápicos, classificando-os como alimentos e/ou suplementos dietéticos.

O desenvolvimento de farmacopeias direcionadas ao uso medicinal em vários países documenta em compêndios oficiais a identificação e o controle de qualidade do produto final (HEINRICH et al., 2018).

A legislação no Brasil vem sofrendo alterações com o retorno de interesse nos medicamentos fitoterápicos. Desde 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta e estabelece normas para garantir a eficácia e a segurança, mas ainda há empecilhos para garantir os itens de qualidade de drogas vegetais, visando à dificuldade da caracterização destes compostos e à elevada complexidade química. Além disso, são necessários recursos apreciáveis para a realização das análises (NETTO et al., 2006).

Após a publicação da RDC nº. 17 de 2000, foram elaboradas as RDC nº. 134 de 2003 e a RDC nº. 48 de 2004, as quais tratam dos fitoterápicos já pesquisados.

Em países como a Alemanha, Dinamarca, França, Suécia e Suíça são estabelecidos regulamentos específicos para a normatização de fitoterápicos. Nos Estados Unidos, os fitoterápicos podem ser inseridos como suplemento alimentar e são

exigidos testes de qualidade básicos. As análises de qualidade e segurança de todos os produtos são exigidas em países da Europa, e no Reino Unido e em Portugal, a regulamentação para fármacos fitoterápicos é a mesma para os convencionais (BUSSE, 2000).

2.3. *Larrea tridentata*

Larrea tridentata (DC) Coville, conhecida popularmente como Creosote Bush, é um arbusto presente nos desertos, predominantes em terras de pastagens (VAN AUKEN, 2000; WHITFORD; NIELSON; SOYZA, 2001). Tradicionalmente conhecida como chaparral ou graxa nos Estados Unidos, e como governadora ou hediondilla no México. Sua abundância ocorre em áreas de desertos como México e Estados Unidos (ARTEAGA; ANDRADE-CETTO; CÁRDENAS, 2005; LIA et al., 2001).

A família Zygophyllaceae possui mais de trinta gêneros e aproximadamente 250 espécies e, dentre suas propriedades medicinais, a mais preeminente é o seu efeito antioxidante (SHEAHAN; CHASE, 1996; TIERRA, 2003).

Embora estivessem presentes em sua maior parte em desertos, seus maiores contribuintes para o reconhecimento farmacológico e medicinal foram as tribos indígenas, que preparavam chás, realizavam extrações para vários tipos de distúrbios como pedras na vesícula biliar, câncer, doenças venéreas, tuberculose, resfriados e reumatismo (LIA et al., 2001).

Sabe-se que esta planta possui diversas propriedades medicinais e ao longo do tempo as pesquisas se aprimoraram e impactaram na segurança do seu uso. Os estudos apresentados por alguns autores somente relatam as determinações de atividade terapêutica em animais (LÜ et al., 2010).

A *L. tridentata* foi inserida inicialmente como suplemento dietético devido a sua capacidade antioxidante quem posteriormente, o *Food & Drug Administration* (FDA) relatou 18 casos de reações adversas, relacionados à hepatotoxicidade entre 1992 – 1994 (WASHINGTON, 2005; SHEIKH; PHILEN; LOVE, 1997). A relação dose-resposta ainda não pode ser identificada devido à dificuldade de confirmar a formulação ingerida, assim como sua dose e, consequentemente, farmacocinética. A possível caracterização

inadequada deste extrato não permite determinar a relação de hepatotoxicidade com a dose individualizada (WASHINGTON, 2005).

Heron e Yarnell (2001) realizaram um estudo no Arizona com 36 indivíduos em um acompanhamento durante 22 meses, contendo formulações individualizadas em baixas doses. Ao final do estudo, nenhum paciente apresentou sinais de hepatotoxicidade.

Em estudo realizado por Ríos, Mangione e Gianello (2008), ficou evidenciada a hipótese do NDGA ser o principal responsável pela toxicidade da *L. tridentata*, pois 40% de sua resina é composto de NDGA e 60% é composto de uma mistura complexa de flavonas.

A fitoquímica deste gênero tem sido estudada, porém, a maioria da prática quanto ao uso medicinal da *L. tridentata* não dispõe de fundamentação de estudos clínicos, mas pressupõe dados baseados em análises terapêuticas e tóxicas de seu principal metabólito, o NDGA (ARTEAGA; ANDRADE-CETTO; CÁRDENAS, 2005).

2.4. Ácido nordihidroguaiarético e suas aplicações farmacológicas

O NDGA foi originalmente isolado da *L. tridentata* por Waller e Gisvold (1945). É um metabólito fenólico antioxidante e anti-inflamatório encontrado nas resinas presentes na superfície das folhas do arbusto, com a finalidade de proteção anti-herbívoros, agentes antimicrobianos, radiação UV e perda de água. Possui amplo espectro biológico e corresponde ao maior percentual de fenóis; encontram-se catecósis em sua estrutura, que abrangem os polifenóis, por isso, é atribuído ao NDGA a atividade antioxidante (LÜ et al., 2010; SNYDER; CASTRO; DESFORGES, 1989).

Floriano-Sánchez et al. (2006) demonstraram que os átomos de hidrogênio junto aos grupos de hidroxila fenólica foram capazes de prevenir a nitração da tirosina pulmonar *in vivo*, a partir de sua capacidade antioxidante que previu a formação excessiva das espécies reativas do oxigênio (EROs).

As EROs tais como radicais superóxidos, hidroperoxila, hidroxila, alcoxila, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso têm uma relação causal com o estresse oxidativo. Estudos têm demonstrado que um desequilíbrio oxidante/antioxidante pode causar danos às proteínas, aos ácidos nucleicos e lipídeos (ARRIGO, 1999; MAALOUF et al., 2002; SIERENS et al., 2002), resultando em patologias tais como doenças

cardiovasculares (GIORDANO, 2005), diabetes (ROLO; PALMEIRA, 2006), lesão hepática (JAESCHKE, 2011) e vários processos de carcinogênese (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Segundo Röpke et al. (2002), algumas enzimas e compostos secundários de plantas superiores apresentaram efeitos protetores contra danos oxidativos e inibem ou sequestram radicais livres.

Essa EROS são produzidas durante o metabolismo celular, cujas atividades funcional são a sinalização da célula, apoptose, expressão gênica e transporte de íons. Porém, quando é produzida uma quantidade de EROS em excesso, elas podem ocasionar elétrons não pareados e danificar bases nucléicas, além de ocasionar um estresse oxidativo que pode danificar o DNA e o RNA (LÜ et al., 2010).

O metabólito em estudo também possui atividades anti-inflamatórias que se devem à inibição do araquidonato 5-lipoxigenase impedindo a transformação do ácido araquidônico em leucotrieno, cujo resultado é a redução da inflamação (WEST et al., 2004).

A produção de leucotrieno B4 também pode ser bloqueada pela ação do NDGA na via secretora e em efeitos na mitocôndria inibem o NADPH oxidase e a proteína quinase C (MILAGROS; VICTOR, 2007).

Contudo, o NDGA também pode bloquear o transporte de proteínas do retículo endoplasmático (RE) para o complexo Golgi, além disso pode perturbar o endotélio e gerar a reorganização do citoesqueleto (DRECKTRAH et al., 1998; HOLLAND et al., 2001).

Alguns estudos relatam os efeitos antitumorais que o NDGA pode desempenhar induzindo a apoptose em diversas linhas de células, como mieloma múltiplo, carcinoma, câncer de mama e células HL- 60 (NISHIMURA et al., 2002; PARK et al., 2004). Lambert et al. (2001) determinaram a farmacocinética do NDGA por CLAE em ratos com potencial de anticâncer ao utilizarem metabólitos do NDGA, capazes de inibir significativamente o crescimento tumoral.

Outros estudos indicam que o NDGA bloqueia a apoptose pelo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) através do terameprocol, derivado semissintético do NDGA (EADS et al., 2009; MEYER; MCANDREW; DONOGHUE, 2009).

O desenvolvimento dos estudos envolve propriedades medicinais que exploram e realizam estudos clínicos pertinentes aos avanços na medicina, utilizando drogas

disponíveis à população (SHEIKH; PHILEN; LOVE, 1997). Ao longo do tempo, o NDGA despertou interesse para os pesquisadores em estudos clínicos após seus efeitos antineoplásico, antiviral e anti-inflamatório ser desencadeado (LÜ et al., 2010).

Gezginci e Timmermann (2001) demonstraram a rota de síntese do NDGA, importante para a síntese orgânica deste composto.

2.4.1. Características estruturais e químicas

O NDGA é uma lignana natural, classificada como dibenzilbutano que possui como características a ligação das posições 8 – 8', quimicamente composta por polifenóis que apresentam duas unidades de catecós ligados por carbono alifático (CUI et al., 2020; PARACATU et al., 2015)

A Figura 1 demonstra a estrutura química do NDGA formada por seus quatro grupos de hidroxilos fenólicas.

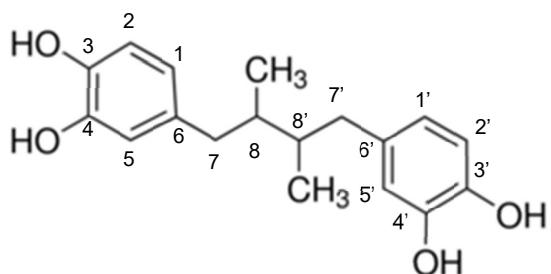


Figura 1 Estrutura química do NDGA.
Fonte: Adaptado de LÜ et al. 2010.

O NDGA possui o log P de 4,48 e a alta hidrofobicidade está ligada a sua apolaridade. A maioria dos medicamentos com ação farmacológica nas membranas biológicas e nas proteínas associadas a ela possui alta hidrofobicidade. Logo, tais moléculas tendem a ser fracamente ácidas (FARIA et al. 2012; PARACATU et al. 2015; UNITED STATES, 2016).

A potencial bioatividade desta droga tem aumentado o interesse de pesquisas associadas a seus metabólitos, com a finalidade de aumentar a gama terapêutica ou ainda obter melhor eficácia. As principais modificações estruturais ocorrem na parte central da molécula para que não ocorra alteração na bioatividade dos estereoisomeros (WUKIRSARI et al., 2014).

2.5. Análise de fármacos por CLAE

A cromatografia líquida é um dos métodos de separações mais utilizados em indústrias farmacêuticas com a finalidade de quantificar e identificar fármacos e seus produtos de degradação. É considerada uma das técnicas mais adequadas e sensíveis para a finalidade a que se propõe (SKOOG et al., 2014).

A interação de seu soluto com a fase estacionária define o tipo de fase móvel a ser utilizada, normalmente são as de fase normal e fase reversa. A condição do cromatógrafo é definida a partir das propriedades da molécula de interesse. As de fase reversa são realizadas com solventes polares e estruturas químicas menos polares, já as de fase normal é contrário as de fase reversa (LANÇAS, 2009).

Esta técnica tem como vantagem o menor tempo de análise, alta resolução, a capacidade de resultados quantitativos com boa sensibilidade e versatilidade. As desvantagens são decorrentes do elevado custo de operação, instrumentação e a necessidade de experiência em seu manuseio (LANÇAS, 2009; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Sua instrumentação, conforme mostrado na Figura 2, é composta de: a) Reservatório – local de armazenamento da fase móvel utilizada na análise; b) Sistema de bombeamento – tem como finalidade bombear a fase móvel até a fase estacionária em fluxo constante; c) Injetor - realiza a injeção na amostra com uma válvula de amostragem substituível em vários tamanhos de volume fixo; d) Coluna cromatográfica - local onde fica armazenada a fase estacionária. A fase estacionária é determinada pela polaridade de seu soluto; e) Detector – Emite um sinal elétrico proporcional à propriedade da fase móvel e/ou soluto com a capacidade de absorver (UV).

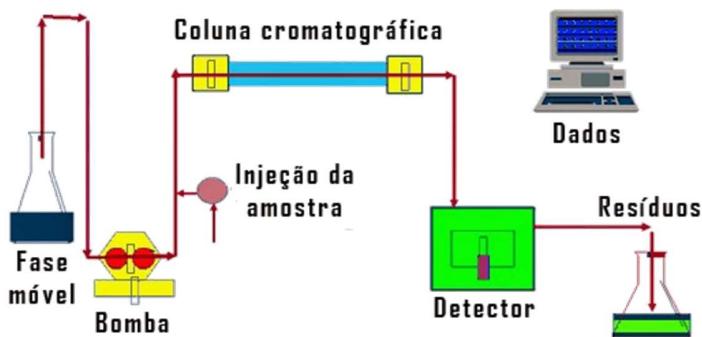
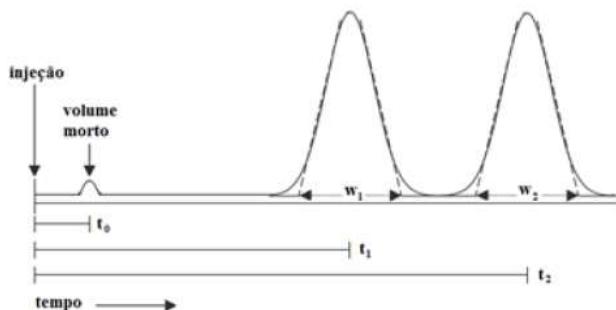


Figura 2 Instrumentação CLAE.
Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006.

2.5.1. Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos avaliam o desempenho e otimizam o processo de separação, e são aplicados para estimar a adequação do sistema (Figura 3).



t_0 = tempo de retenção da substância não retida.

t_1 = tempo de retenção do primeiro pico.

t_2 = tempo de retenção do segundo pico.

w_1 = largura do primeiro pico na base.

w_2 = largura do segundo pico na base.

Figura 3 Parâmetros a serem considerados na adequação do sistema.

Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006.

Tempo de Retenção (t_R) – é o tempo que uma substância decorre do momento em que foi introduzida até a resposta máxima do pico.

A eficiência (N) é denominada de pratos teóricos. Quanto maior o número de pratos teóricos, melhor será a separação. A Equação 1 demonstra como é realizado o cálculo de pratos teóricos.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que t_R é o tempo de retenção do pico de interesse;

w_b é a largura da base do pico e

w_h é a largura à meia altura do pico.

A eficiência entre colunas diferentes é dada pela razão, conforme Equação 2.

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Eq. 2})$$

em que H é a altura de um prato, L é comprimento da coluna e N é o número de pratos teóricos.

Resolução (R_s) é o parâmetro que mede a separação de dois componentes, calculado pelos pontos máximos dos picos e da largura da meio altura ou das médias de suas bases, como demonstrado na Equação 3 e na Figura 4.

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} = \frac{1,177(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h2} + w_{h1})} \quad (\text{Eq. 3})$$

em que t_{R1} é o tempo de retenção relacionado ao primeiro pico;

t_{R2} é o tempo de retenção relacionado ao segundo pico;

w_{b1} é a largura da base do pico 1;

w_{b2} é a largura da base do pico 2;

w_{h1} é a largura à meia altura do pico 1 e

w_{h2} é a largura à meia altura do pico 2.

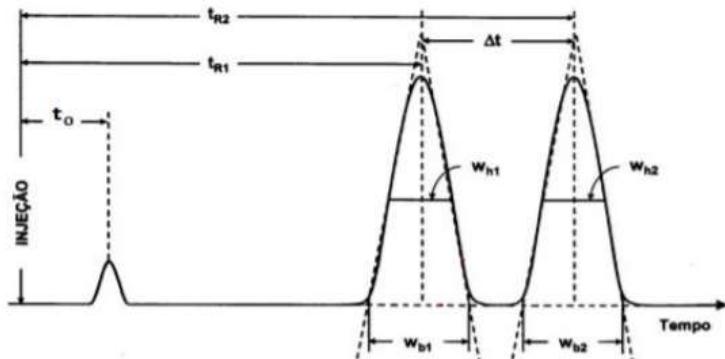


Figura 4 Medidas ao cálculo da resolução.

Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006.

O fator de retenção (k) é a razão do tempo que o analito fica retido na fase estacionária e na fase móvel, conforme Equação 4.

$$k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} = \frac{t_{R'}}{t_0} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que n_S é a razão da quantidade da molécula que fica retida na fase estacionária ou na fase móvel n_M ; t_R é o tempo de retenção do analito; t_0 é o tempo de retenção da substância não retida e, $t_{R'}$ é o tempo ajustado de retenção.

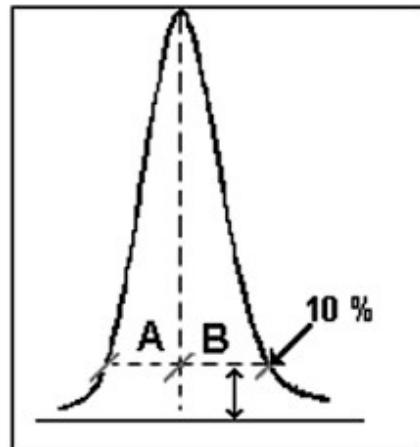
O fator de separação (α) compara o tempo de retenção de um composto frente ao segundo composto. Desta forma, é calculado o grau de separação de uma substância frente à outra, conforme apresentado na Equação 5.

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad (\text{Eq. 5})$$

onde t_{R1} é o tempo ajustado de retenção do pico 1 e t_{R2} é o tempo ajustado de retenção do pico 2.

O fator de cauda (F_c) é uma medida de simetria do pico. Assim, o cálculo do fator de cauda é realizado como apresentado na Equação 6 e na Figura 5.

$$F_c = \frac{a+b}{2.a} \quad (\text{Eq. 6})$$



A e B são as medidas das metades do pico a 10% de altura a partir da linha de base.

Figura 5 Medidas associadas ao cálculo de fator de cauda.

Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006.

A adequação do sistema garante a qualidade da análise antes, durante e depois.

O fator de simetria (T) é determinado a partir da Equação 7.

$$T = W_{0,05}/2f \quad (\text{Eq. 7})$$

em que $W_{0,05}$ é a largura do pico a 5% da altura e f é a distância do máximo do pico até o início do pico.

2.6. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica

O desenvolvimento de um método analítico é um estudo entre todas as variáveis contidas para a elaboração de um método analítico, a qual contém testes preliminares sobre a possibilidade do mesmo ser validado. Para isso existem órgãos regulamentadores como FDA e ANVISA e o guia *International Conference on Harmonization* (ICH) para a obtenção da harmonização nos requisitos técnicos.

A ANVISA atribui alguns pré-requisitos com a finalidade de normatizar e regulamentar os critérios de aceitação no ministério da saúde, para o registro do medicamento. Assim, várias legislações foram emitidas e revogadas com a finalidade de aprimorar as anteriores (BRASIL, 2017).

Atualmente, as diretrizes contidas na Resolução RDC nº. 166, 24 de julho de 2017 exigem a apresentação dos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, recuperação e limites de detecção e quantificação adequados ao método. Ainda, a validação de um método analítico tende a garantir o processo do estudo laboratorial, assegurar a conformidade com as exigências legais e que o método atenda ao objetivo pelo qual foi proposto (SKOOG et al., 2014).

Os parâmetros exigidos variam com a finalidade do teste, como classificado na Tabela 1.

Tabela 1 Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categorias	Finalidades
I	Testes quantitativos para determinar o princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impureza e produtos de degradação em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
III	Testes de performance (dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

Fonte: BRASIL, 2017.

A Tabela 2 apresenta os ensaios exigidos pela ANVISA de acordo com as categorias citadas acima.

Tabela 2 Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetros Avaliados	Categoria I e III		Categoria II		Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	Não	
Intervalo	Sim	Sim	Não	Não	
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Não
	Intermediária	**	**	Não	Não
Limite de detecção	Não	*	Sim	Não	
Limite de quantificação	*	Sim	Não	Não	
Exatidão	Sim	Sim	Não	Não	

*Pode ser necessário dependendo da natureza do teste;

**Quando comprovada a reproduzibilidade, não é necessário comprovar a precisão intermediária.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2017.

O objetivo da validação do método analítico é comprovar que: o método é capaz de separar, identificar e quantificar o ativo na presença de suas potenciais impurezas e produtos de degradação (seletividade); de que o método é linear, preciso, exato e robusto para pequenas e deliberadas alterações (robustez) que podem ocorrer na reproduzibilidade do método, conforme exigido na RDC nº 166/ 2017.

Portanto, a validação determinará a confiabilidade e a consistência dos dados analíticos, sendo claramente definido também pela diretriz do ICH-Q2 (R1) / 2005.

Os padrões a serem utilizados devem ser substâncias químicas de referências (SQR) oficializadas por compêndios oficiais ou farmacopeias. Na ausência desta substância, é permitido utilizar padrões de trabalho como as substâncias químicas de referências caracterizadas (SQC), desde que seja comprovada sua certificação (BRASIL, 2017; BRETNALL; CLARKE, 2011; KHAN et al., 2012; SHABIR, 2003; SHAH et al., 2011).

2.6.1. Métodos indicativos de estabilidade

O Guia nº 04/2015 define que método indicativo de estabilidade é capaz de mensurar que a metodologia analítica validada quantifique com exatidão as alterações em suas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas ao longo do tempo, sem haver interferentes, e garanta segurança, eficácia e qualidade do produto.

Desta forma, a ANVISA também estabelece que métodos indicativos de estabilidade dependem da finalidade pelo qual ele é proposto, ou seja, as metodologias

para doseamento são capazes de somente avaliar quantitativamente seu ativo, assim também são necessárias metodologias para produtos de degradação somente para avaliar os produtos de degradação relevantes, ou ainda podem existir casos de a metodologia ser indicativa para ambos os aspectos (BRASIL, 2015).

A preocupação crescente voltada aos estudos de estabilidade e em suas metodologias analíticas obteve aumento nas exigências da ANVISA para a concessão do registro dos medicamentos pelos órgãos regulamentadores.

2.6.2. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade de um IFA ou de um fármaco visa verificar alterações provenientes sob a ação de alguns fatores como tempo, temperatura, umidade, oxidação, pH, tamanho da partícula, fotólise, e suas interações entre fármaco e excipientes, para manter as especificações estabelecidas, assegurar a qualidade do produto e seu desempenho por um período definido (BRASIL, 2019).

Os ensaios de estabilidade, que devem ser realizados pela indústria farmacêutica, são definidos pela zona climática em que o país se encontra. O Brasil é considerado zona climática IV ($30^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ UR), em que são empregados três tipos de estudos de estabilidade:

- I. Estudo de estabilidade acelerada, que tem como fundamento estipular uma validade provisória que somente será comprovada com a estabilidade de longa duração;
- II. Estudo de estabilidade de longa duração, que avalia as características para um reteste ou verifica prazo de validade esperado, sendo indicativo para condições de armazenamento;
- III. Estudo de estabilidade de acompanhamento, que são testes realizados para confirmar os resultados obtidos no estudo de estabilidade de longa duração (BRASIL, 2019).

Atualmente, está em vigência a RDC nº 318/ 2019 que estabelece os critérios para o estudo de estabilidade de IFA's e fármacos incluindo a regulamentação para o estudo de EDF.

2.6.3. Perfil de degradação

O Guia nº 04/2015 define perfil de degradação como um conjunto de produtos de degradação relevantes em IFA ou no medicamento quando exposto a uma determinada condição.

O estudo do perfil de degradação é um conjunto de informações teóricas geradas a partir de pesquisa e do estudo prático gerado por análises.

Conforme apresentado na Figura 6, o perfil “potencial” de degradação por EDF e o perfil ‘real’ de degradação que são os resultados obtidos no estudo de estabilidade de longa duração. Vale ressaltar que o perfil ‘real’ de degradação deve estar contido no perfil ‘potencial’ (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; BRASIL, 2015).

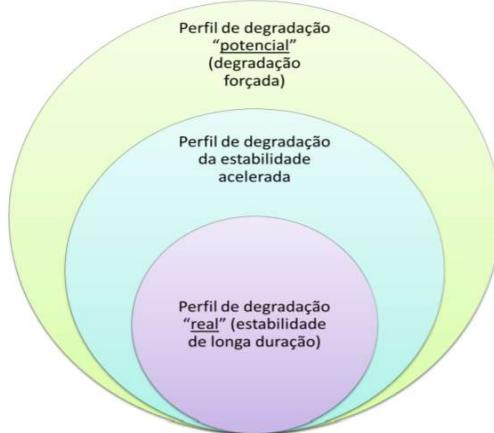


Figura 6 Relação entre o perfil "potencial" e o perfil "real" de degradação.
Fonte: BRASIL, 2015.

2.6.4. Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar o analito de interesse sem que tenha qualquer tipo de interferente tais como impurezas, produtos de degradação, diluentes ou componentes da matriz (BRASIL, 2017).

A forma de confirmar se o método é seletivo é pela avaliação da homogeneidade espectral do pico do ativo em espectrofotômetros, pela comparação entre espectros (BRASIL, 2015).

2.6.4.1. Estudo de degradação forçada (EDF)

O EDF é testado em condições superiores aos da estabilidade acelerada, ou seja, são realizadas degradações químicas e/ou físicas a fim de avaliar a estocagem superabundante (ICH, 2003). Assim, a finalidade deste estudo é demonstrar a tendência intrínseca do método ser indicativo de estabilidade, item explorado pelas indústrias farmacêuticas (SINHA et al., 2007).

O EDF assim como a seletividade visam diferenciar o princípio ativo de suas impurezas e produtos de degradação. No entanto, o EDF tende a fornecer informações evidentes dos mecanismos de degradação que podem ser gerados no período de estocagem, e assim obter um valor significante em termos de tempo e custos (ALSANTE et al., 2011; RAMAN et al., 2009).

A escolha dos agentes degradantes e as condições do estudo dependem da natureza química da substância, formulação, embalagem, entre outros (BRASIL, 2015; ICH, 2003). De acordo com o ICH (2003), a degradação pode ocorrer ao longo do tempo ou ser ocasionada por condições externas tais como em presença de luz, temperatura e umidade.

Hidrólise e oxidação são as reações mais observadas, as quais ocorrem na presença de umidade e oxigênio. A degradação fotoquímica pode ser gerada pela incompatibilidade do ativo com seus excipientes ou por incompatibilidade da embalagem primária (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

As condições experimentais são determinadas pelos pesquisadores responsáveis pelo projeto e baseadas no estudo do produto. Isto ocorre devido à falta de padronização nas condições experimentais. No entanto, alguns autores recomendam alguns critérios, tais como os apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Recomendações das condições experimentais no estudo de degradação forçada.

Estresse ácido	HCl
Estresse básico	NaOH ou KOH
Estresse oxidativo	0,3 - 3% H ₂ O ₂
Ions metálicos	Fe ^{+2,+3} ou Cu ^{+2,+3}
Temperatura	60 °C
Umidade	75% UR
Fotólise	1,2 milhões lux/horas

Fonte: BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011.

O estudo de degradação tem como critério a queda do teor do ativo entre 10 e 30%; e, caso a degradação seja inferior a 10%, devem-se aumentar as condições de estresse. Após 10 dias, se a degradação for inferior a 10%, o mesmo é considerado estável (BRASIL, 2015).

De acordo com o limite de dose máxima diária do medicamento, a RDC nº 53/2015 preconiza limites permitidos a cada produto de degradação, classificados em limite de notificação, identificação e qualificação. Para tanto, a Tabela 4 apresenta os limites determinados para cada classificação.

Tabela 4 Limites para Notificação, Identificação e Qualificação dos produtos de degradação.

	Dose Máxima Diária¹	Limites²
Limites de Notificação	≤ 1 g	0,10%
	> 1 g	0,05%
Limites de Identificação	< 1 mg	1,0% ou 5 µg ATD, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 µg ATD, o que for menor
Limites de Qualificação	> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,10%
Limites de Qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50 µg ATD, o que for menor
	10 mg – 2 g	0,5% ou 200 µg ATD, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,15%

¹ Quantidade máxima do IFA administrado por dia.

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a porcentagem do IFA ou como administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

Fonte: BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011.

O limite de notificação é reportado às agências reguladoras quando o produto de degradação gerado apresentar limite acima do estipulado. Para o limite de identificação, é necessária a identificação química da substância, enquanto o limite de qualificação caracteriza a substância com potencial toxicidade e requer um perfil de segurança estabelecido (BRASIL, 2015).

2.6.5. Linearidade

A linearidade de um método mede a capacidade para que se obtenham resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2017). Os resultados obtidos na linearidade devem ser apresentados em gráficos de calibração, seguido de tratamento estatístico (CASS; DEGANI, 2001).

Os coeficientes de correlação (R), de determinação (R^2), linear, angular e o desvio padrão relativo (DPR) estão entre os dados estatísticos a serem aplicados. A equação da reta deverá ser estimada pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2017).

A linearidade é comprovada a partir da média de três curvas padrão, com no mínimo cinco concentrações. As concentrações deverão contemplar uma variação em um intervalo específico compreendido entre 80 e 120% da concentração teórica da solução teste (BRASIL, 2017).

2.6.6. Intervalo Linear

O intervalo linear compreende a faixa de trabalho estabelecida pela linearidade, precisão e exatidão. A determinação deste intervalo é definida através da finalidade pelo qual a metodologia foi proposta, conforme Tabela 5 (BRASIL, 2017).

Tabela 5 Faixa de trabalho de acordo com a finalidade do método.

Aplicação	Faixa de trabalho	
	Mínimo (%)	Máximo (%)
Doseamento	80	120
Uniformidade de conteúdo	70	130
Dissolução	-20 ¹	+20 ¹
Determinação de impurezas	LQ	120
Determinação de teor e impurezas	LQ	120

¹ sobre o valor especificado para o intervalo.

Fonte: BRASIL, 2017.

2.6.7. Precisão

A precisão representa a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra (ICH, 2005). A precisão é dividida em três categorias: repetibilidade, precisão intermediária e a reproduzibilidade (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Os resultados da precisão são expressos pelo cálculo do DPR, conforme a Equação 8 (BRASIL, 2017):

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Eq. 8})$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

O valor de aceitação do DPR será adotado seguindo os critérios da tabela da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), no qual se determina que matriz a 100% deve adotar como especificação DPR a 1,3% (AOAC, 2016).

2.6.8. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao seu verdadeiro valor (BRASIL, 2017). Esse deve ser determinado após estabelecer o intervalo da linearidade, contemplando o intervalo linear, ou seja, três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada, e em preparos independentes (BRASIL, 2017; SHABIR, 2003).

Os resultados são expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme Equação 9 (BRASIL, 2017):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

2.6.9. Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade dos resultados permanecerem inalterados a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando susceptibilidade a estas variações (BRASIL, 2017).

A RDC nº 166/2017 estabelece alguns fatores que devem ser considerados na robustez, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 Condições que devem ser consideradas na robustez.

	Estabilidade das soluções
Preparo de amostras	Tempo de extração
	Filtro
	Variação do pH da solução
Espectrofotometria	Comprimento de onda
	Temperatura
	Diferentes fabricantes de solvente
	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
Cromatografia Líquida	Diferentes lotes ou fabricantes da coluna
	Temperatura
	Fluxo de fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
Cromatografia Gasosa	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste

Fonte: BRASIL, 2017.

3. CAPÍTULO 1 – ARTIGO

Desenvolvimento e validação de um método analítico indicativo de estabilidade para o ácido nordihidroguaiarétilo

Fernanda Carolina Ribeiro dos Santos

Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, Cascavel – PR, Brasil
E-mail: fernanda_carolr@hotmail.com

Fábio Augusto Gubiani

Mestre em Química pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE
Endereço: Rua da Faculdade, 645 – Jardim La Salle, Toledo – PR, Brasil
E-mail: fabiogubiani_41@hotmail.com

Osmar dos Reis Antunes Junior

Doutor em Química pela Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná
Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, Cascavel – PR, Brasil
E-mail: odra.jr@gmail.com

Helder Lopes Vasconcelos

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina
Instituição: Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE
Endereço: Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, Cascavel – PR, Brasil
E-mail: helder.vasconcelos@unioeste.br

RESUMO

O ácido nordihidroguaiarético é um dos principais metabólitos gerados pela planta *Larrea tridentata*, a qual estudos clínicos comprovam sua segurança e eficácia em efeitos terapêuticos, como anti-inflamatório e antineoplásico. Vale ressaltar que um elevado potencial antioxidante é atribuído a esta molécula devido a sua estrutura química ser composta por grupamentos catecóis. Atualmente, órgãos de regulamentação tais como ANVISA e FDA delimitam diretrizes para os processos de registro e pós-registro de medicamentos. Dentro desta esfera, metodologias analíticas são exigidas para o cumprimento de normas, tais como as resoluções da diretoria colegiada – RDC nº 166, 2017 e RDC nº 53, 2015. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para a matéria-prima do ácido nordihidroguaiarético por cromatografia líquida de alta eficiência. O desenvolvimento foi realizado a partir de testes iniciais, que envolveram otimizações da fase móvel, coluna, concentração das soluções entre outros, até a metodologia estar apta para ser validada. Em seguida, foi definido o perfil de degradação do ativo com o estudo de degradação forçada que tende a avaliar a aplicabilidade do método analítico na separação das impurezas geradas após condições de estresse. As condições foram definidas a partir de recomendações contidas em guias nacionais e internacionais que contemplam estresses químicos e físicos. Os estresses químicos consistiram da exposição das amostras a condições de: hidrólise em ampla faixa de pH, além da oxidação por íons metálicos e reagente oxidante. Já as condições de degradação física consistiram da exposição das amostras para aquecimento, umidade e fotodegradação. Após concluir o desenvolvimento do método, seguiu-se com os parâmetros da validação: seletividade, linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão e robustez. O sistema cromatográfico definido no desenvolvimento foi em modo gradiente utilizando-se como fase móvel água e metanol com fluxo de 1,0 mL/min, em um volume de injeção de 3 µL, coluna Agilent Eclipse XDB-C18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm em temperatura ambiente e a detecção foi realizada em 283 nm. O método proposto demonstrou ser seletivo, pois os produtos de degradações gerados não interferiram na detecção nem na quantificação do NDGA, preciso, linear e robusto dentro da faixa de trabalho. Após realizar com êxito todas as análises pertinentes à validação da metodologia analítica, conclui-se que o método proposto é adequado para dosar o ácido nordihidroguaiarético, matéria-prima.

Palavras-chave: *Larrea tridentata*. Estudo de degradação forçada. Cromatografia líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

Nordihydroguaiaretic acid is one of the main metabolites produced by *Larrea tridentata* plant, to which clinical studies have testified its safety and efficacy in therapeutic effects, such as anti-inflammatory and antineoplastic ones. It is important to highlight High antioxidant potential is attached to this molecule, because its chemical structure is composed of catechol sheets. Currently, regulatory agencies such as ANVISA and FDA, have determined guidelines to register processes and post-registration of drug therapies. According to such area, analytical methodologies are required to fulfill with norms, such as the resolutions of the collegial board of directors – RDC Nº 166, 2017 e RDC Nº 53, 2015. Thus, this research aimed at developing and validating an analytical method as a suggestion of stability for nordihydroguaiaretic acid raw material by high performance liquid chromatography. The development was carried out based on initial tests, with optimizations of mobile phase, column, concentration of solutions among others, until the methodology was shown to be validated. Then, the degradation profile of the active was defined according to the forced degradation study that tends to evaluate the analytical method applicability to separate impurities produced after some stress conditions. The conditions were defined based on national and international guides' recommendations that meet chemical and physical stresses demands. Chemical stresses consisted on exposing samples to the following conditions: hydrolysis in a wide pH range, as well as oxidation by metal ions and oxidizing reagent. While, physical degradation conditions consisted on exposing samples to heating, humidity and photodegradation. When the method development was concluded, validation parameters were followed such as: selectivity, linearity, linear range, accuracy, precision (intra- and inter-day) and robustness. The chromatographic system, defined along the development, was in gradient mode using as mobile phase water and methanol with 1.0 mL/min flow, and 3- μ l volume injection, 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m XDB-C18-Agilent Eclipse column, at room temperature and 283-nm detection. The proposed method proved to be selective, since the products from degradation did not interfere on a precise, exact, linear and robust NDGA detection as well as quantification, within the working range. After the successful completion of all analyses concerning the analytical methodology validation, it can be concluded that the proposed method is an indicative of stability to dose NDGA raw material. After the successful completion of all analyses concerning the analytical methodology validation, it can be concluded that the proposed method is available to dose nordihydroguaiaretic acid raw matter.

Keywords: *Larrea tridentata*. Forced degradation study. High Performance Liquid Chromatography.

1. Introdução

O ácido nordihidroguaiarético (NDGA), originalmente isolado da *Larrea tridentata* (DC.) Coville por Waller e Gisvold (1945), é considerado um metabólito antioxidante fenólico e anti-inflamatório encontrado nas resinas presentes na superfície das folhas do arbusto. O objetivo daquele é a proteção contra herbívoros, agente antimicrobiano, radiação UV e perda de água (LÜ *et al.*, 2010; SNYPER, CASTRO, DESFORGES, 1989).

O desenvolvimento de novas drogas envolve propriedades medicinais que exploram e realizam estudos clínicos pertinentes aos avanços da medicina (SHEIKH, PHILEN, LOVE, 1997). Ao longo do tempo, o NDGA despertou o interesse de pesquisadores em estudos clínicos após o efeito antineoplásico, antiviral e anti-inflamatório ser elucidado (LÜ *et al.*, 2010).

As atividades anti-inflamatórias do metabólito se devem à inibição do araquidonato 5-lipoxigenase, que impede a transformação do ácido araquidônico em leucotrieno bem como diminui a inflamação (WEST *et al.*, 2004). O NDGA é uma lignana natural que possui como característica a ligação das posições 8 – 8', quimicamente composta por polifenóis, apresentando duas metades de catecósis ligados por carbono alifático (PARACATU *et al.*, 2015).

A Figura 1 demonstra a estrutura química do NDGA formada por seus quatro grupos de hidroxilos fenólicos.

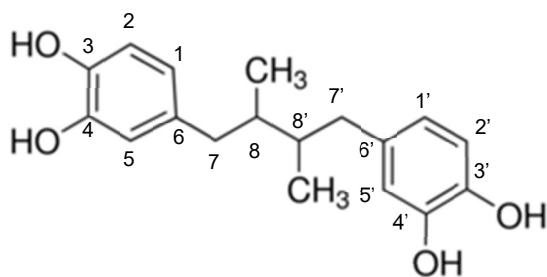


Figura 1 – Estrutura química do NDGA.

Fonte: Adaptado de LÜ *et al.*, 2010.

É importante salientar que, para que um medicamento chegue ao paciente, é preciso apresentar dados comprobatórios de sua matéria-prima, ou seja, insumo farmacêutico ativo (IFA). Com isso, realizam-se validações analíticas para comprovar a segurança e a eficácia deste IFA.

Indústrias farmacêuticas realizam experimentos de degradação forçada com o objetivo de avaliar a seletividade de um método analítico, cujas amostras de IFA são submetidas a condições de hidrólise em ampla faixa de pH, oxidação em reagente oxidante e íons metálicos, aquecimento

a seco, umidade e fotodegradação. Nesta etapa, a capacidade do método para separar e identificar os produtos de degradação é colocada à prova. São diversos os cenários nos quais o IFA pode ser exposto, são eles: transporte, armazenamento e manipulação durante a fabricação do medicamento. Caso o método analítico seja capaz de separar os produtos de degradação, formados no estudo de degradação forçada (EDF), em que seja elucidado o perfil de degradação forçada, define-se que este método analítico possui caráter indicativo de estabilidade. Desta maneira, ele pode ser utilizado para o acompanhamento de estudos de estabilidade de medicamentos e IFA, a qual tem como função a determinação do prazo de validade (ALSANTE *et al.*, 2011; RAMAN *et al.*, 2009). Os requisitos são estabelecidos por diretrizes determinadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tais como a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/ 2017 e a RDC nº 53/ 2015 (BRASIL, 2017; BRASIL, 2015).

Devido à ausência de dados na literatura em relação ao perfil de degradação forçada do IFA NDGA, além da inexistência de um método analítico seletivo para sua quantificação, este trabalho teve como finalidade desenvolver e validar um método analítico de doseamento indicativo de estabilidade do NDGA, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Produtos químicos e reagentes

O NDGA foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). Foram adquiridos acetonitrila (ACN) e metanol (JT Baker) grau CLAE, ácido clorídrico (Neon, Brasil), sulfato de cobre (II), ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), peróxido de hidrogênio, cloreto de ferro (III), hidróxido de sódio (Synth, Brasil), grau analítico e a água ultrapura (Millipore).

2.1.2. Instrumentação

O sistema CLAE consiste do modelo *Alliance Waters 2695* (Milford, MA, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) (Waters 2998). Tal sistema possui uma bomba quaternária, um amostrador automático, um desgaseificador e um compartimento de coluna com controle de temperatura. A aquisição, a análise e a geração de dados foram realizadas no software *Empower 2* (Milford, MA, EUA). A análise foi realizada usando uma coluna C18 de fase reversa

(Eclipse XDB, Agilent) com tamanho de partícula de 5 µm, diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 150 mm.

2.2. Método

2.2.1. Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade por CLAE

Foram avaliados tipos de colunas cromatográficas diferentes, composições, proporções e fluxo da fase móvel, volume de injeção da amostra e ajuste dos parâmetros relacionados à adequação do sistema para a separação dos produtos de degradação formados e o analito NDGA (Tabela 1).

Tabela 1 – Condições testadas no desenvolvimento do método

Testes N°.	Composição de fase móvel	Especificação da coluna	Fluxo (mL/min)
1	Metanol: Água (75:25, V/V)	Waters Xbridge C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
2	Metanol: Água (75:25, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
3	ACN: Água (75:25, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
4	ACN: Água (50:50, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
5	ACN: Água (50:50, V/V)	Phenomenex Luna C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
6	Metanol: Água (95:5, V/V / 5:95, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm	1,0
7	Metanol: Água (95:5, V/V / 5:95, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5 µm	1,0

O desenvolvimento para a determinação da degradação forçada foi realizado com estresse ácido, alcalino, oxidativo, íon metálico, fotolítico, térmico e de umidade (BRASIL, 2015). Além disso, a pureza do pico do NDGA foi avaliada a partir dos sinais espectrais obtidos pelo detector de fotodiodos.

2.2.2. Validação do método analítico

Os parâmetros utilizados para a validação seguiram as recomendações das diretrizes do guia *International Conference on Harmonization ICH* (2005), Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 53 (2015) e RDC nº 166 (2017). A validação do método seguiu os parâmetros de seletividade, estudo de degradação forçada, linearidade, faixa linear, exatidão, precisão e robustez.

2.2.2.1. Preparo de soluções

2.2.2.1.1. Diluente

Foi preparada uma mistura homogênea de metanol e água (1: 1) V/V.

2.2.2.1.2. Solução Estoque Amostra

A solução-estoque de NDGA $60 \mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada ao serem dissolvidos 3 mg de amostra de NDGA em 50 mL de diluente.

2.2.2.1.3. Preparo de amostras em estresse/degradação

Uma solução-estoque de NDGA foi diluída até $48 \mu\text{g L}^{-1}$ para amostra-controle.

A degradação ácida foi realizada utilizando-se uma solução-estoque de NDGA, diluída até $48 \mu\text{g L}^{-1}$, além disso, foi adicionado 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi submetida a 90 minutos de estresse e subsequentemente neutralizada com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Da mesma forma, a hidrólise alcalina da solução de NDGA foi realizada com a adição de 0,5 mL de NaOH $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ seguido de neutralização com HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Os volumes de ambas as soluções resultantes foram ajustados para 5 mL utilizando o diluente.

A degradação oxidativa foi realizada utilizando H_2O_2 (0,01% V/V) e o volume foi ajustado imediatamente para 5 mL utilizando o diluente. A solução de NDGA utilizando 0,5 mL de CuSO_4 100 mmol L^{-1} foi preparada por 24 horas para a degradação por íons metálicos. Após o período de estresse foi adicionado 0,5 mL de EDTA e o volume foi ajustado para 5 mL utilizando diluente.

Os efeitos da temperatura, da umidade e a foto no NDGA foram estudados a partir da exposição da substância em estado sólido em $60 \pm 5^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa por 10 dias, luz UV de 200 W h/m^2 e 1,2 milhões de horas luz em câmara de fotoestabilidade, respectivamente. Após o período de degradação, as amostras foram preparadas para uma concentração de $48 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

2.2.2.2. Seletividade

A avaliação da seletividade foi obtida a partir dos resultados do estudo de degradação forçada e avaliados com base no perfil de degradação e da análise de homogeneidade espectral. Além disso, também foi analisada a ‘solução-branco’ de cada agente estressante contendo o diluente e o estressante.

2.2.2.3. Linearidade, faixa linear e exatidão

Para a avaliação da linearidade, foram analisadas réplicas ($n=3$) de cinco concentrações na faixa entre 80 a 120% da concentração teórica da solução amostra e que abrangearam, desta forma, o intervalo de 38,40 a 57,60 $\mu\text{g L}^{-1}$ proveniente da solução-estoque amostra com a concentração de 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, a curva de linearidade foi preparada ao plotar a área do pico em relação à concentração da respectiva solução injetada.

A exatidão foi verificada junto com a linearidade, pois contém a mesma matriz. Os resultados foram determinados pela avaliação das nove amostras em concentrações baixa, média e alta, (80, 100 e 120%) em triplicata.

2.2.2.4. Precisão

A precisão foi determinada por repetibilidade e precisão intermediária por dois dias consecutivos. Para avaliar a repetibilidade do método, seis amostras de NDGA (48 $\mu\text{g L}^{-1}$) foram injetadas. Esses estudos foram repetidos em dois dias diferentes para determinar a precisão intermediária. Os resultados foram expressos em desvio padrão relativo (DPR).

2.2.2.5. Robustez

A robustez foi realizada mediante alterações relacionadas ao fluxo (0,9 e 1,1 mL/min), composição da fase móvel (metanol 6% (V/V) e metanol 4% (V/V)), temperatura (30°C e 25°C) e diferentes colunas cromatográficas (Phenomenex e Agilent) na solução de NDGA (48 $\mu\text{g L}^{-1}$)

utilizando condições cromatográficas otimizadas. Um planejamento experimental pelo software Action Stat, composto por quatro fatores, foi realizado para avaliar esse parâmetro (Tabela 2).

Tabela 2 – Condições empregadas no delineamento experimental.

Parâmetros	Variação 1	Variação 2
	Alto nível (1)	Baixo nível (-1)
Composição de metanol na fase móvel	6%	4%
Fabricantes de coluna diferente	Agilent	Phenomenex
Temperatura	30°C	25°C
Fluxo de fase móvel	1,1 mL/min	0,9 mL/min

O resultado deste teste foi determinado pela porcentagem de recuperação. A estabilidade da amostra e os diferentes filtros também foram avaliados conforme critério da exatidão.

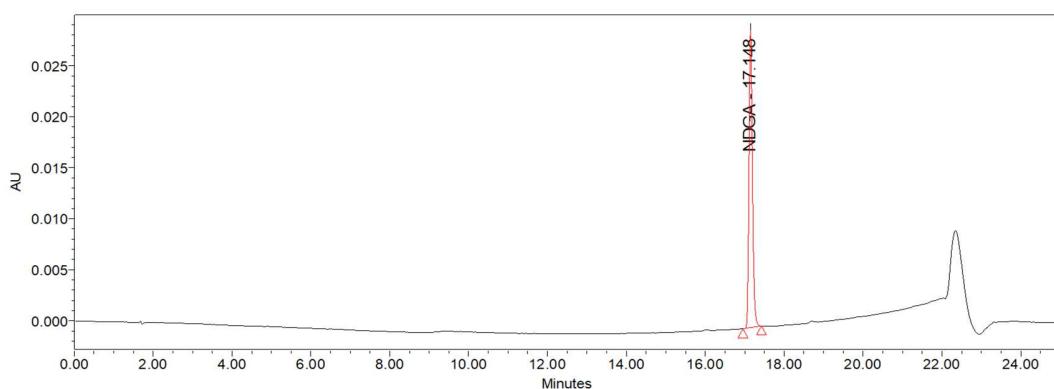
2.2.2.6. Resultados e discussões

2.2.2.6.1. Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade por CLAE

As condições da metodologia a ser validada foram determinadas a partir dos resultados preliminares obtidos durante o desenvolvimento do método analítico.

O sistema cromatográfico utilizado durante a validação por CLAE foi conduzido utilizando a fase móvel metanol: água (95: 5, V/V / 5:95, V/V) e uma coluna cromatográfica Agilent Eclipse XDB-C18 de 150 mm x 4,6 mm x 5 µm. O volume de injeção foi de 10 µL e o fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/ min. O comprimento de onda foi determinado pela avaliação da absorvidade máxima, cujo valor foi de 283 nm e o tempo de corrida com 25 minutos. O tempo de retenção (tR) do NDGA foi de 17,0 min (Figura 2).

Figura 2 – Cromatograma da solução de NDGA (100 µg/mL)



Todos os testes realizados anteriormente a essa condição não foram considerados seletivos para ser indicativo de estabilidade.

2.2.2.6.2. Adequação do sistema

A repetibilidade das injeções foi avaliada para comprovar a adequação do sistema cromatográfico com as condições determinadas. Os resultados obtidos mostraram que todos os parâmetros atendem aos requisitos de adequação do sistema. O valor de DPR da resposta do pico foi inferior a 2,0% e os pratos teóricos foram superiores a 10.000.

2.2.2.6.3. Estudo de degradação forçada

Os testes de estresse foram realizados em solução de NDGA. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos durante a exposição da amostra ao agente degradante na degradação química e física.

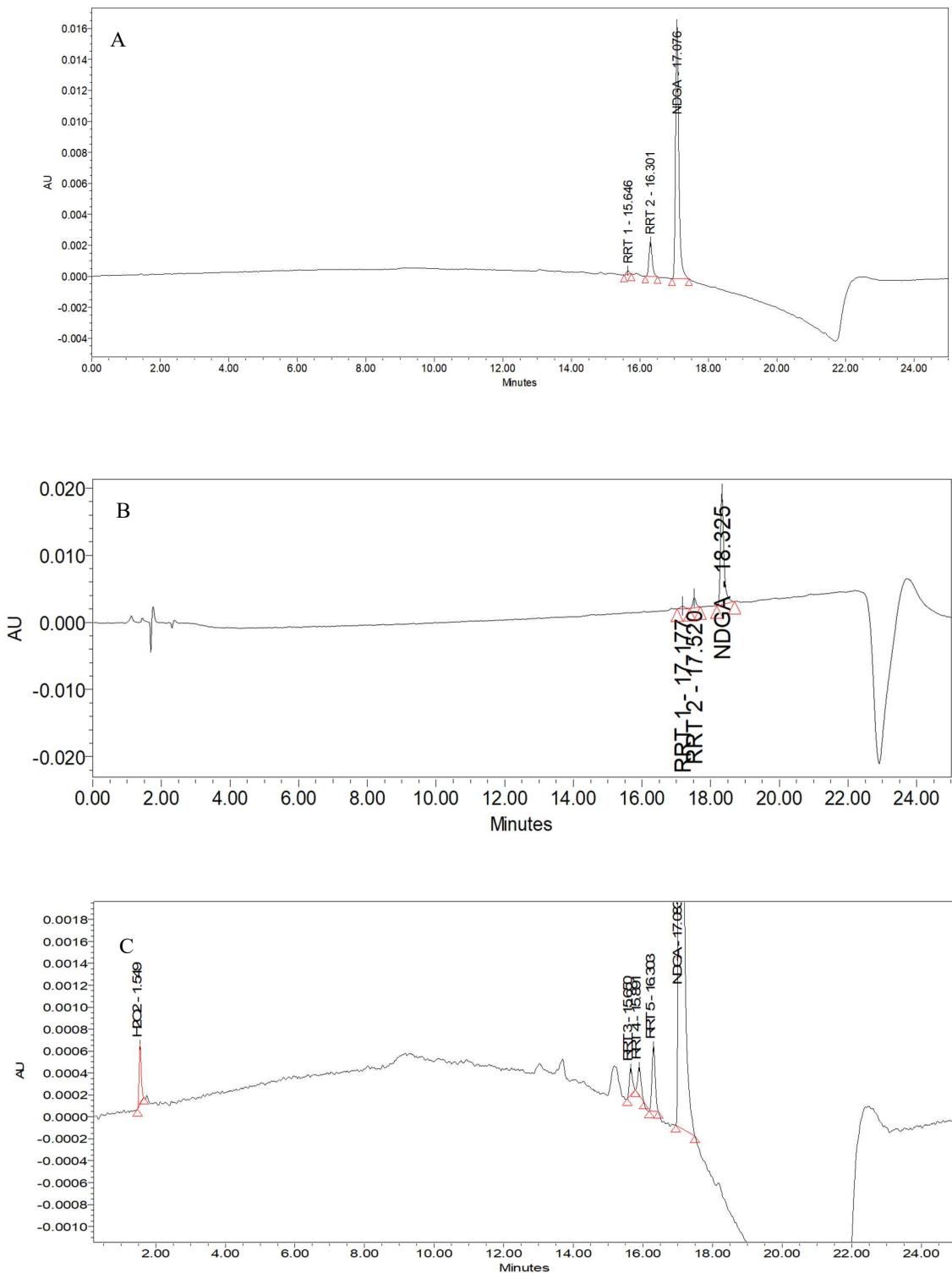
Tabela 3 – Porcentagem de degradação observada durante o estudo de degradação.

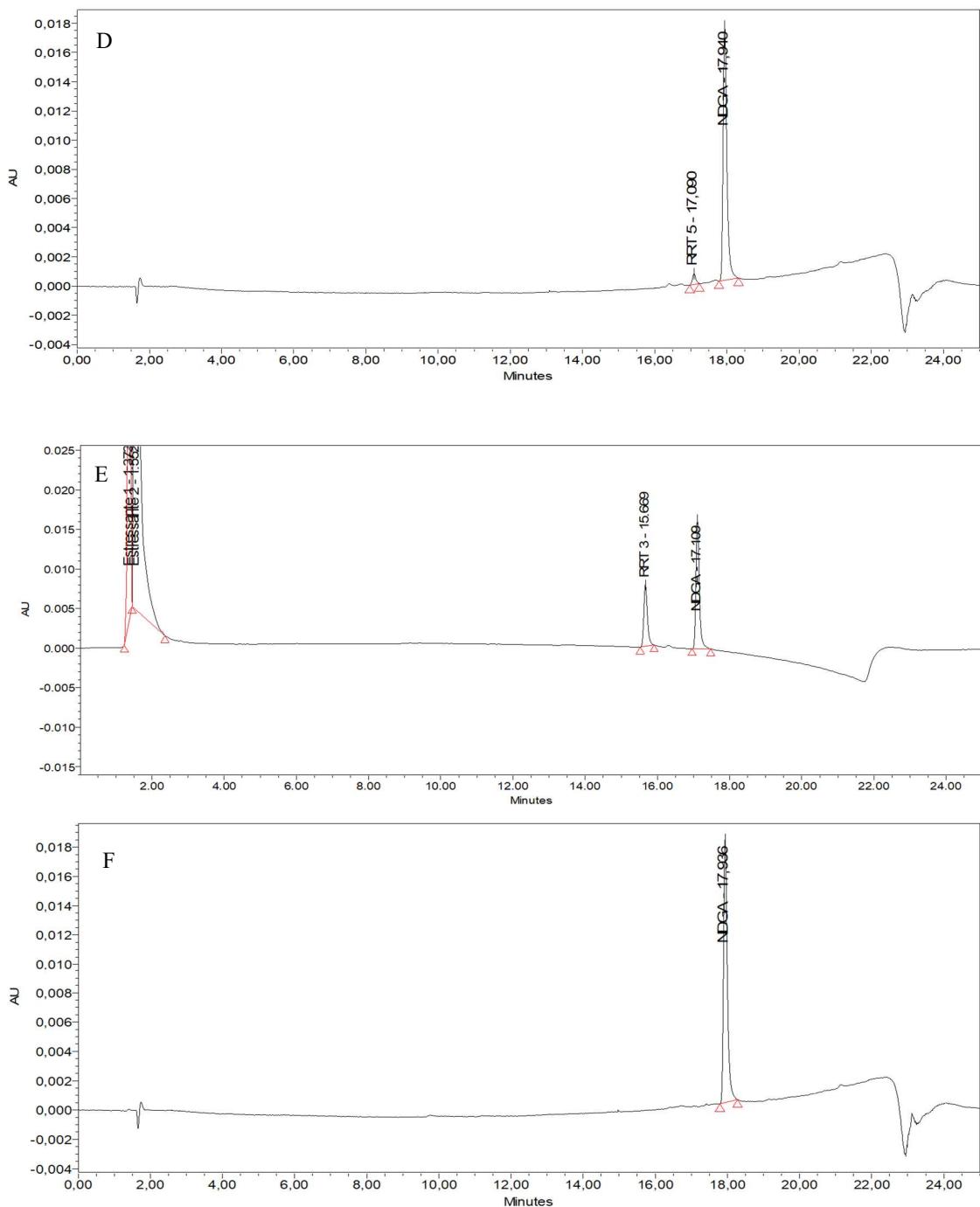
Nº.	Tipo de degradação	Recuperação (%)	Produtos de degradação (%)	Balanço de massas (%) ¹
1	Ácida	86,61	9,69	96,30
2	Alcalina	75,61	10,91	86,52
3	Oxidativa	89,87	6,72	96,59
4	Íons metálicos	94,15	3,65	97,80
5	Temperatura	97,88	3,37	101,25
6	Umidade	97,72	0	97,72
7	Fotodegradação	96,91	3,69	100,60

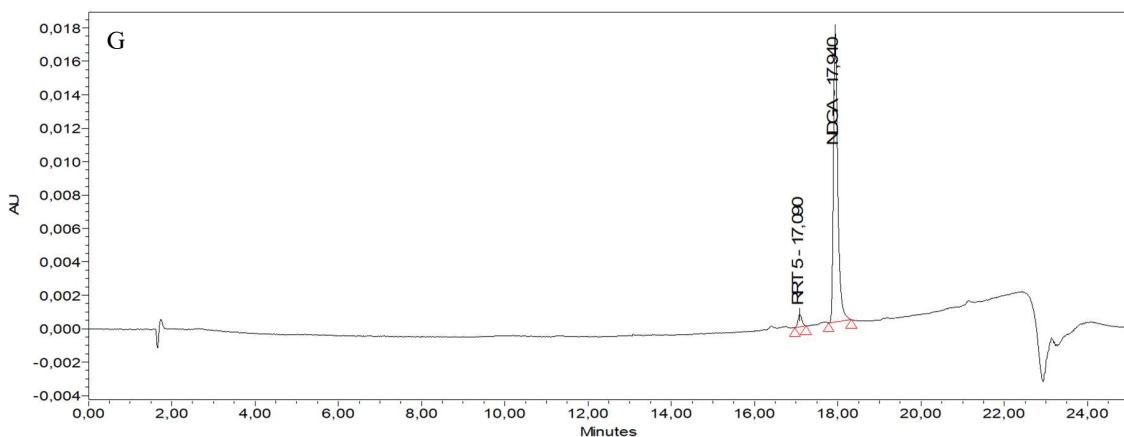
¹ Soma da recuperação (%) com a (%) dos produtos de degradação do pico do NDGA, comparada com a solução controle, considerada 100%.

Os cromatogramas obtidos nas degradações ácida, alcalina, oxidativa, íons metálicos, temperatura, umidade e degradação fotolítica são apresentados na Figura 3.

Figura 3– Cromatograma obtido na (A) Degradação ácida (B) Degradação alcalina (C) Degradação oxidativa (D) Degradação por íons metálicos (E) Degradação por temperatura (F) Degradação por umidade (G) Degradação fotolítica.



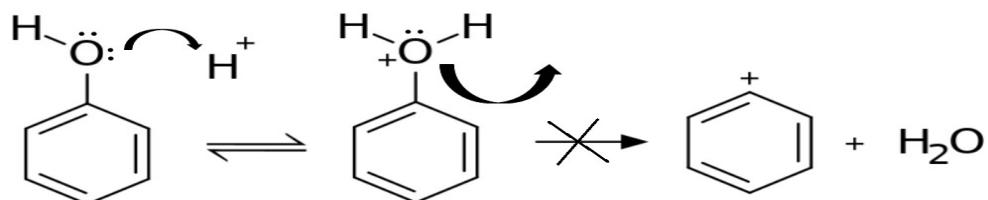




2.2.2.6.4. Degradação ácida

A exposição do fenol ao estresse ácido (grupo funcional com maior reatividade presente na molécula de NDGA) provoca a protonação do álcool fenílico. No entanto, a formação do carbocátion fenílico não é observada pela saída de água, visto que a formação de tal radical resulta em grande perda de estabilidade do anel aromático (Figura 4) (GROUTAS, 2002).

Figura 4 – Possível mecanismo de reação do fenol em condições ácidas.



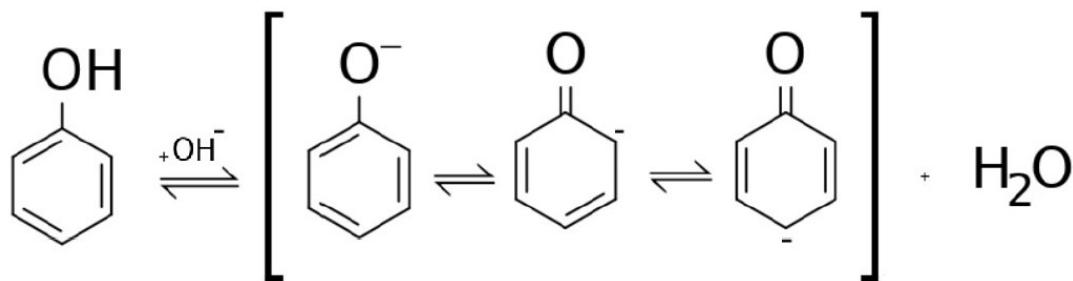
Fonte: GROUTAS, 2002.

A provável existência de grupamentos químicos susceptíveis à protonação, tais como os álcoois, quando expostos às condições de pH ácido, são protonados e deixam a molécula mais polar, deste modo, os álcoois terão menor interação com a coluna. Quando a solução foi neutralizada, tais grupos funcionais retornam a sua condição e apresentaram melhor interação com a coluna e foram identificados no método em questão.

2.2.2.6.5. Degradação alcalina

A desprotonação dos grupamentos álcoois pode ocorrer no estresse alcalino e tornar a molécula do NDGA polar (Figura 5). No entanto, a molécula se torna apolar quando a solução é neutralizada (MOUGEL *et al.*, 2019).

Figura 5 – Mecanismo do fenol em condições alcalinas.



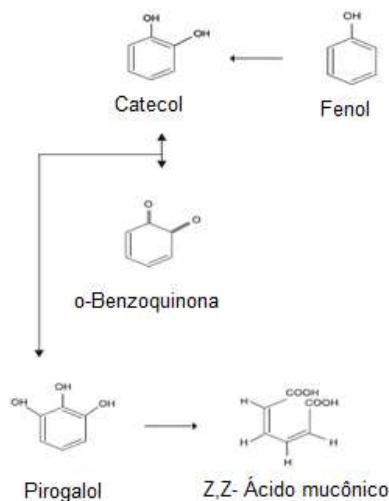
Fonte: MOUGEL *et al.*, 2019.

Portanto, conclui-se que a neutralização é fundamental para a molécula do NDGA em condições de hidrólise, visto a dependência de pH na molécula e de seus produtos de degradação.

2.2.2.6.6. Degradação oxidativa

A reação com peróxido de hidrogênio é maior do que a estimada em teoria, portanto, essas reações podem ocorrer simultaneamente ou em uma única etapa (GE, LI, LISAK, 2019). A Figura 6 demonstra que, com a utilização de um agente oxidante, o catecol presente na molécula do NDGA pode perder o grupamento cromóforo e formar o ácido mucônico (VILLOTA, LOMAS, CAMARERO, 2016).

Figura 6 – Possível mecanismo de reação para degradação intermediária do fenol.

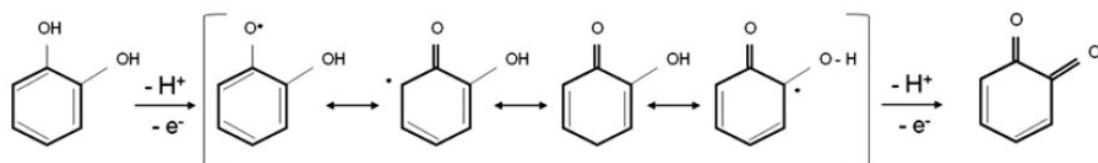


Fonte: VILLOTA, LOMAS, CAMARERO, 2016.

2.2.2.6.7. Degradação por íons metálicos

A desprotonação da hidroxila também pode ocorrer na oxidação por íons metálicos (Figura 7).

Figura 7 Possível mecanismo de reação para degradação intermediária de íons metálicos.



Fonte: VILLOTA, LOMAS, CAMARERO, 2016.

O EDTA como agente quelante evita a precipitação do analito em solução e sequestra os metais presentes. Assim, quando o EDTA é adicionado à solução, ele irá complexar com os íons metálicos e liberará as moléculas de NDGA, que poderão ser identificadas (ANTONIN et al., 2011; OVIEDO, RODRÍGUEZ, 2003).

2.2.2.6.8. *Degradação física*

De acordo com os resultados, não houve decaimento significativo na recuperação do NDGA para estas condições.

2.2.2.6.9. *Seletividade*

Os resultados apresentados na Figura 3 comprovam a seletividade do método analítico quando comparado ao tempo de retenção do NDGA frente a todos os agentes degradantes testados, às soluções-branco e às impurezas formadas durante o estudo de degradação forçada, além dos testes de pureza de pico que confirmam a homogeneidade espectral do pico de NDGA nas amostras estressadas.

2.2.2.6.10. *Linearidade, faixa linear e exatidão*

A equação da curva de calibração foi $y = 2,106x + 1777,6$ com $R^2 = 0,9943$ para NDGA. As amostras da exatidão foram analisadas em triplicata (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da exatidão para concentrações de NDGA em soluções-amostra (n = 3).		
Solução-amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
38,40	100,58	1,14
48,00	100,17	0,32
57,60	99,65	0,64

2.2.2.6.11. *Precisão*

O método desenvolvido por CLAE foi considerado preciso conforme indicado por % de DPR (menor que 1,3%) observado na Tabela 5. O valor de aceitação de DPR foi adotado conforme requisitos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

Tabela 5 - Precisão 1º, 2º dia e precisão intermediária.

Nível	Dia	Fator resposta ¹	DPR (%)	Especificação (%)	DPR (%) Precisão intermediária	Especificação (%) Precisão intermediária	
100%	1º	2383					
		2449					
		2380					
		2363	1,2				
		2401					
	2º	2390					
		2334		DPR ≤ 1,3	1,8	DPR≤ 2,0	
		2329					
		2323	1,1				
		2291					

¹Relação do sinal (área) / Concentração do sinal.

Conclui-se que o método é preciso pela proximidade dos resultados das precisões 1º e 2º dia, portanto, pode-se afirmar que o método cumpre com os critérios estabelecidos de aceitação.

2.2.2.6.12. Robustez

O método foi avaliado mediante a estabilidade da solução, filtro, fluxo, composição da fase móvel, temperatura e diferentes fabricantes de coluna. A estabilidade da amostra foi determinada a partir da injeção imediata ao seu preparo e injeções após algumas horas pré-estabelecidas conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da robustez para estabilidade e soluções.

Identificação	Recuperação (%)	Especificação (%)
Amostra 0 horas	100,00	
Amostra 3 horas	99,87	
Amostra 10 horas	99,49	98 – 102
Amostra 20 horas	98,54	

A amostra de NDGA demonstrou ser estável por um período de 20 horas após seu preparo.

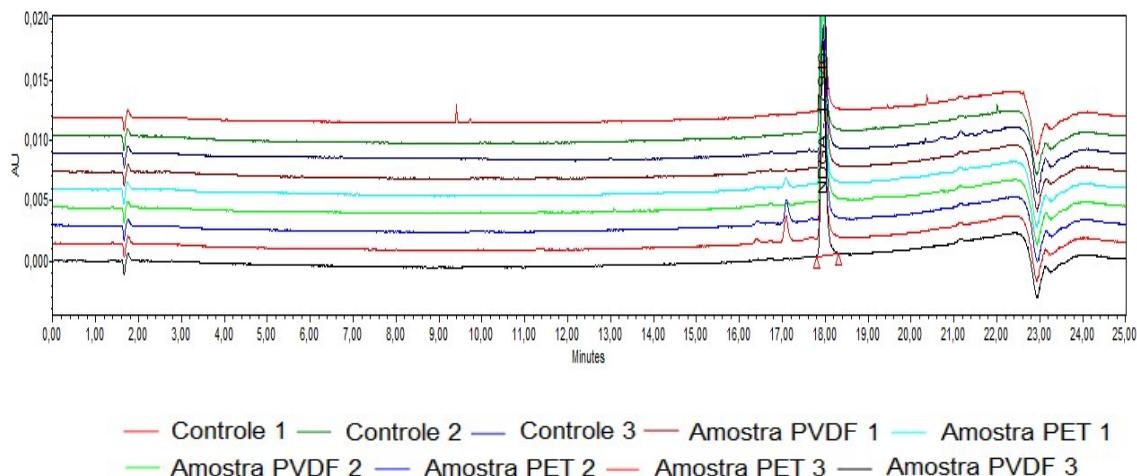
Os perfis cromatográficos e a recuperação frente à amostra controle foram avaliados para a robustez de filtro (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da robustez de filtro.

Identificação	Recuperação média (%)	Especificação (%)
Amostra controle	100,00	
PVDF ¹ 0.45 µm	99,43	98 – 102
PET ² 0.45 µm	96,73	

¹ Fluoreto de polivinilideno² Poliéster

Observa-se que o filtro PVDF obteve menor variação com base nos resultados apresentados, e quando correlacionado com a avaliação do perfil cromatográfico expresso na Figura 8, é possível visualizar que o filtro PET apresenta picos que não foram detectados na amostra controle e no filtro PVDF.

Figura 8 – Sobreposição dos cromatogramas para avaliação do filtro.

A robustez do método foi comprovada após análise do planejamento experimental realizado através do *software Action Stat*, para alterar as condições de análise conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Variações nas condições cromatográficas para a quantificação do NDGA.

<i>Ordem</i>	<i>A</i> ¹	<i>B</i> ²	<i>C</i> ³	<i>D</i> ⁴	<i>Resposta (%)</i>
1	-1	-1	1	1	99,97
2	1	1	-1	-1	102,33
3	1	1	1	1	98,33
4	-1	1	1	-1	98,79
5	1	-1	-1	1	99,22
6	-1	1	-1	1	98,71
7	1	-1	1	-1	99,92
8	-1	-1	-1	-1	99,11

¹ Composição de metanol na fase móvel (1: 6%; -1: 4%);² Coluna diferente (1: Agilent; -1: Phenomenex);³ Temperatura (1: 30°C; -1: 25°C);⁴ Fluxo de fase móvel (1: 1,1 mL/min; -1: 0,9 mL/min).

3. Conclusão

O método analítico desenvolvido demonstrou ser seletivo para a finalidade proposta, pois quando comparado ao perfil cromatográfico da solução de NDGA frente às soluções-branco não houve eluições no mesmo tempo de retenção. O NDGA se mostrou susceptível às degradações químicas e não susceptível às degradações físicas nas condições de estresses durante o EDF. Além disso, o método apresentou resposta linear com exatidão e robustez dentro da faixa de 80 a 120% da concentração nominal da amostra com coeficiente de determinação de 0,9943 e precisão (DPR < 2,0). Por fim, os parâmetros foram conduzidos de acordo com o ICH, RDC nº 166/ 2017e RDC nº 53/ 2015, portanto, conclui-se que o método desenvolvido e validado é indicativo de estabilidade e adequado para o doseamento do NDGA.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não ter conflitos de interesse.

Agradecimentos

Não houve financiamento recebido de nenhuma agência para qualquer tipo de trabalho incluído neste artigo ou na preparação deste artigo.

4. CONCLUSÕES GERAIS DA DISSERTAÇÃO

No presente estudo, o método desenvolvido e validado foi capaz de separar, identificar e quantificar o NDGA na presença de suas potenciais impurezas e produtos de degradação, sendo um dos critérios de aceitação na seletividade. Além disso, o método foi linear, preciso, exato e robusto de acordo com as diretrizes do ICH e da RDC nº 166/2017e RDC nº 53/ 2015. Portanto, o método poderá ser utilizado na rotina laboratorial para dosear o NDGA.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho abordou o histórico dos fitoterápicos e como estas drogas estão sendo empregadas no mercado, as dificuldades relacionadas ao cultivo, à coleta e à forma como a síntese orgânica vem aprimorando as moléculas em questão em busca de conseguir garantir eficácia e segurança para o consumidor.

O método desenvolvido e validado utilizando a técnica por CLAE contempla um dos itens de qualidade para assegurar que o IFA do NDGA poderá ser utilizado de forma segura cumprindo os itens da legislação.

Análises adicionais serão necessárias para confirmação de seus produtos de degradação.

6. ANEXOS

6.1. Anexo 1 - Desenvolvimento de método analítico

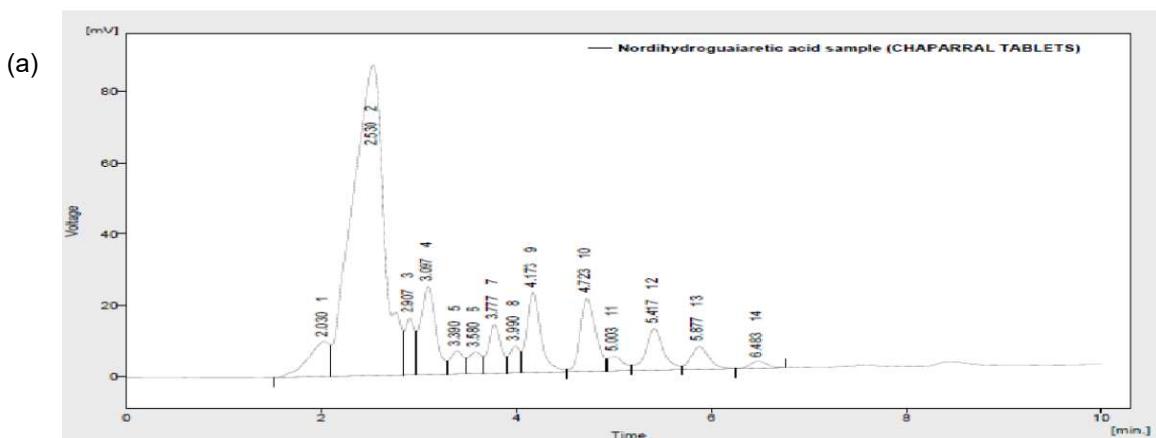
6.1.1. Otimização da metodologia analítica para determinação de ácido nordihidroguaiarétilico

Ramadoss & Oruganti (2016) descrevem uma validação de metodologia analítica para testar formulações de comprimidos de NDGA e identificar o extrato da planta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na Tabela 1, as condições cromatográficas validadas estão apresentadas pelos autores.

Tabela 1 Sistema Cromatográfico testado.

Parâmetros cromatográficos	Condições
Coluna cromatográfica	C18 250 x 4,6 mm x 5 μm
Detector DAD – Comprimento de onda	281
Vazão	1,0 mL/min
Fase móvel	Metanol: Água (3:1)
Modo	Isocrático
Diluente	Metanol 75%
Volume de injeção	20 μL

A Figura 1(a) refere-se ao cromatograma obtido por Ramadoss & Oruganti (2016) nas condições citadas acima e a Figura 1(b) reporta o cromatograma obtido durante este desenvolvimento sob as mesmas condições.



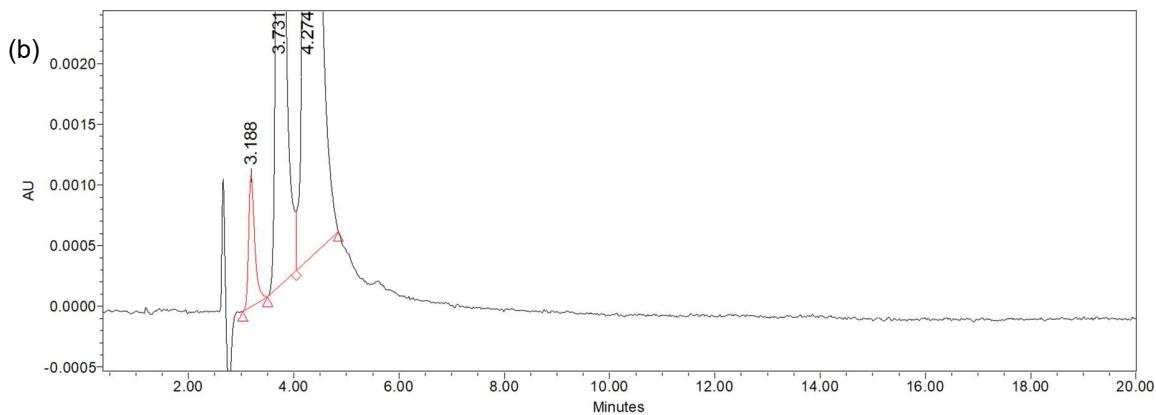


Figura 1 Cromatograma sob condições validadas por Ramadoss & Oruganti (2016). (a) cromatograma obtido e publicado pelos autores; (b) cromatograma obtido no desenvolvimento deste trabalho sob as mesmas condições do autor.

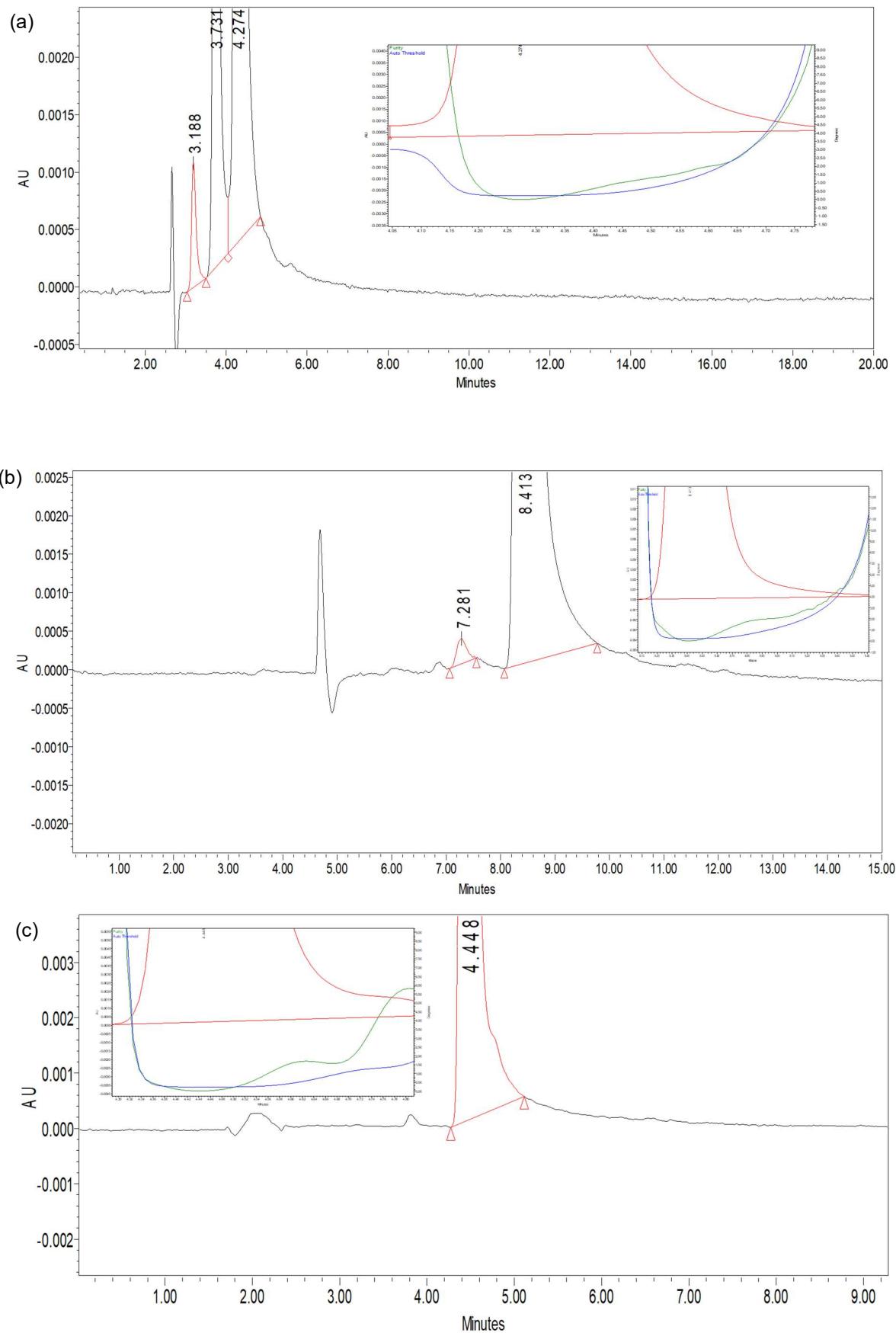
Conclui-se que o método citado não é indicativo de estabilidade, visto que há indícios de coeluição em ambas as imagens, logo, não é possível identificar qual é o pico respectivo do NDGA.

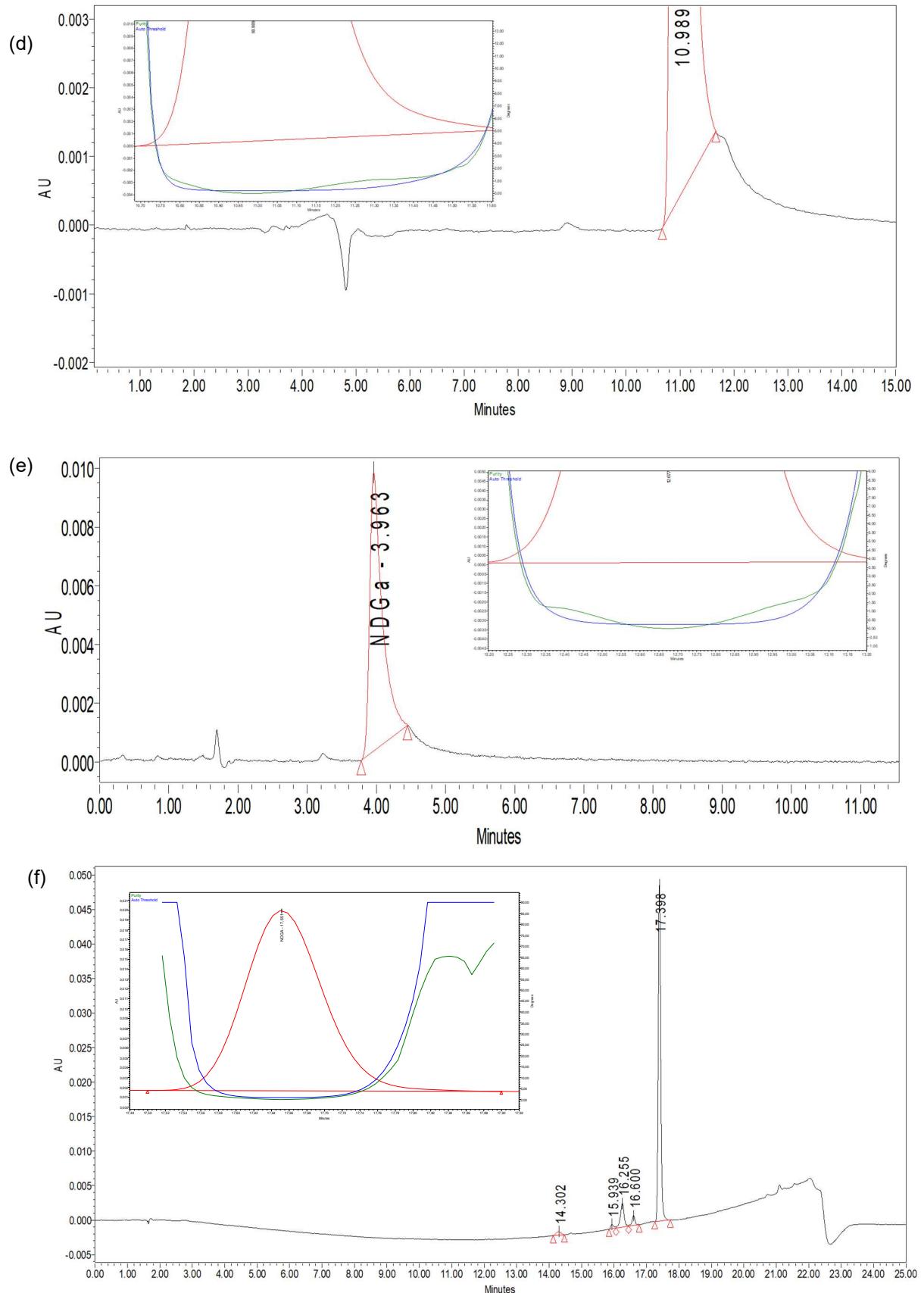
Algumas alterações relacionadas à adequação do sistema foram realizadas com a finalidade de garantir que o método a ser desenvolvido seria capaz de ser indicativo de estabilidade e quantificar o NDGA com precisão, exatidão e linearidade, conforme Tabela 2.

Tabela 2 Condições testadas.

Testes Nº.	Composição de fase móvel	Especificação da coluna
1	Metanol: Água (75:25, V/V)	Waters Xbridge C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
2	Metanol: Água (75:25, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
3	ACN: Água (75:25, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
4	ACN: Água (50:50, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
5	ACN: Água (50:50, V/V)	Phenomenex Luna C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
6	Metanol: Água (95:5, V/V / 5:95, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 250 x 4.6 mm x 5 µm
7	Metanol: Água (95:5, V/V / 5:95, V/V)	Agilent Eclipse XDB C18 150 x 4.6 mm x 5 µm

Na Figura 2, estão apresentados os resultados de cada teste realizado no desenvolvimento conforme Tabela 2.





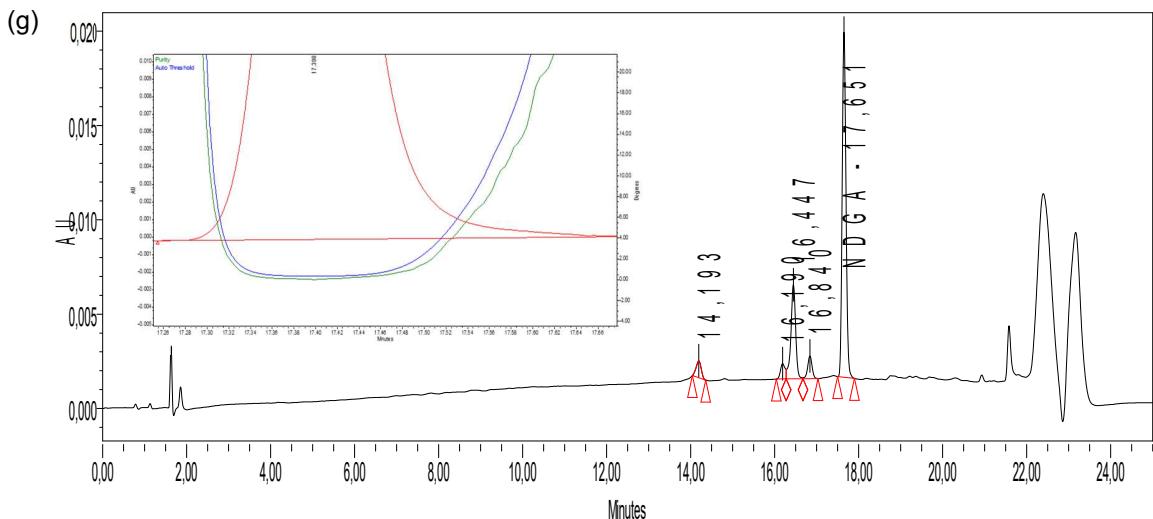


Figura 2 Resultados obtidos no desenvolvimento do método. (a) Cromatograma referente ao teste 1. (b) Cromatograma referente ao teste 2. (c) Cromatograma referente ao teste 3. (d) Cromatograma referente ao teste 4. (e) Cromatograma referente ao teste 5. (f) Cromatograma referente ao teste 6. (g) Cromatograma referente ao teste 7.

É possível observar nos resultados obtidos que os testes de 1 a 5 não se apresentaram espectralmente homogêneos. Portanto, foram realizados testes utilizando gradiente na tentativa de separar os compostos que estavam coeluindo com o pico do NDGA.

O teste 6 apresenta-se espectralmente homogêneo com a separação dos compostos que estavam coeluindo nos testes anteriores, mas em busca de otimização do método foi realizado o teste 7 para diminuir o comprimento da coluna, no qual os resultados foram aprovados e, portanto, deu-se sequência ao desenvolvimento.

O comprimento de onda foi determinado pela avaliação da máxima absorvidade, conforme espectro apresentado na Figura 3, com MSA de 0,08 e cujo valor obtido foi de 283 nm.

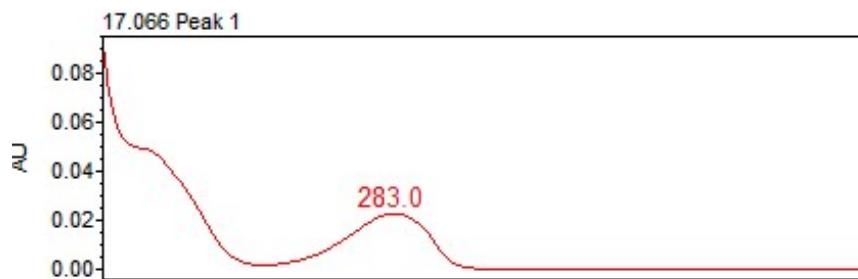


Figura 3 Espectro de absorção na região UV-Vis para NDGA.

De acordo com as condições determinadas, a repetibilidade das injeções foi avaliada para comprovar a adequação do sistema cromatográfico. O cromatograma obtido na condição final do método está apresentado na Figura 4, a qual demonstrou ser espectralmente homogênea em relação ao pico do NDGA por não apresentar cruzamentos entre as linhas de pureza (*Purity* e *Auto Threshold*).

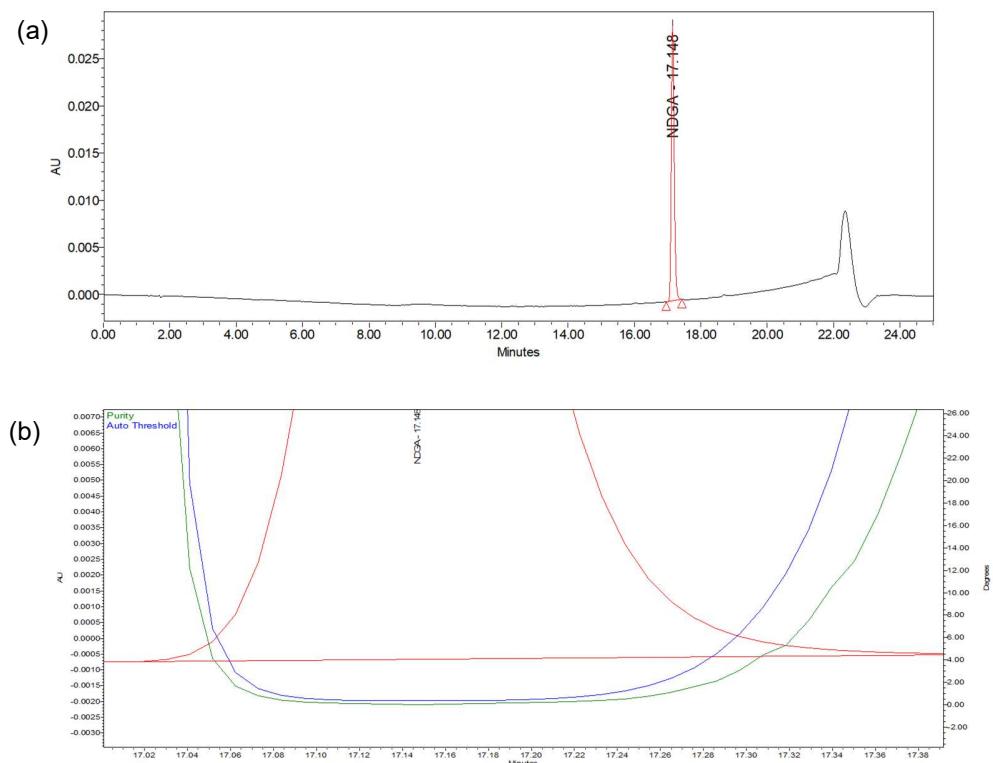


Figura 4 Avaliação do cromatograma na condição final do método. (a) Cromatograma de NDGA a 60 µg L⁻¹. (b) Homogeneidade espectral obtida.

Os dados de verificação de sistema são apresentados de acordo com a metodologia analítica (Tabela 3). O sistema cromatográfico foi considerado apto com os resultados apresentados.

Tabela 3 Dados cromatográficos para avaliação de adequação de sistema.

DPR (%)	0,85 %
Fator de simetria	1,34 ± 0,2
Número de pratos teóricos	114567

Após definir o sistema cromatográfico, foram realizados os testes para definir os agentes estressantes, assim como suas respectivas concentrações e tempo de coleta.

6.1.2. Estudo de degradação forçada

O desenvolvimento para a determinação da degradação forçada foi realizado com estresse ácido, alcalino, oxidativo, íon metálico, fotodegradação, térmico e de umidade (BRASIL, 2015). As condições testadas durante o desenvolvimento do método estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Condições experimentais no estudo de degradação forçada.

Agente estressante	Concentração / Tempo
Estresse ácido	HCl 0,1 mol L ⁻¹ – Imediato HCl 0,1 mol L ⁻¹ – 45 minutos HCl 0,1 mol L ⁻¹ – 90 minutos HCl 0,1 mol L ⁻¹ / NaOH 0,1 mol L ⁻¹ – 90 minutos
Estresse básico	NaOH 1,0 mol L ⁻¹ – Imediato NaOH 0,1 mol L ⁻¹ – Imediato NaOH 0,02 mol L ⁻¹ / HCl 0,02 mol L ⁻¹ – Imediato
Estresse oxidativo	H ₂ O ₂ 0,01% - Imediato
Ions metálicos	FeCl ₃ 20 mmol L ⁻¹ – 24 horas CuSO ₄ 100 mmol L ⁻¹ – 24 horas FeCl ₃ 20 mmol L ⁻¹ / EDTA 100 mmol L ⁻¹ - 24 horas CuSO ₄ 100 mmol L ⁻¹ / EDTA 100 mmol L ⁻¹ - 24 horas
Temperatura	60°C - 10 dias
Umidade	75% UR - 10 dias
Fotólise	1,2 milhões lux/horas (2 ciclos) ¹

¹Câmara de fotoestabilidade com calibração actinométrica com intensidade de 85 horas por ciclo.

6.1.2.1. Degradação ácida e básica

O estudo de degradação forçada via hidrólise catalisada por ácido foi conduzido de duas formas independentes.

1. Estudo cinético com análises em tempos pré-determinados (0, 45 e 90 minutos) sem neutralização e
2. Estudo com neutralização após 90 minutos de degradação.

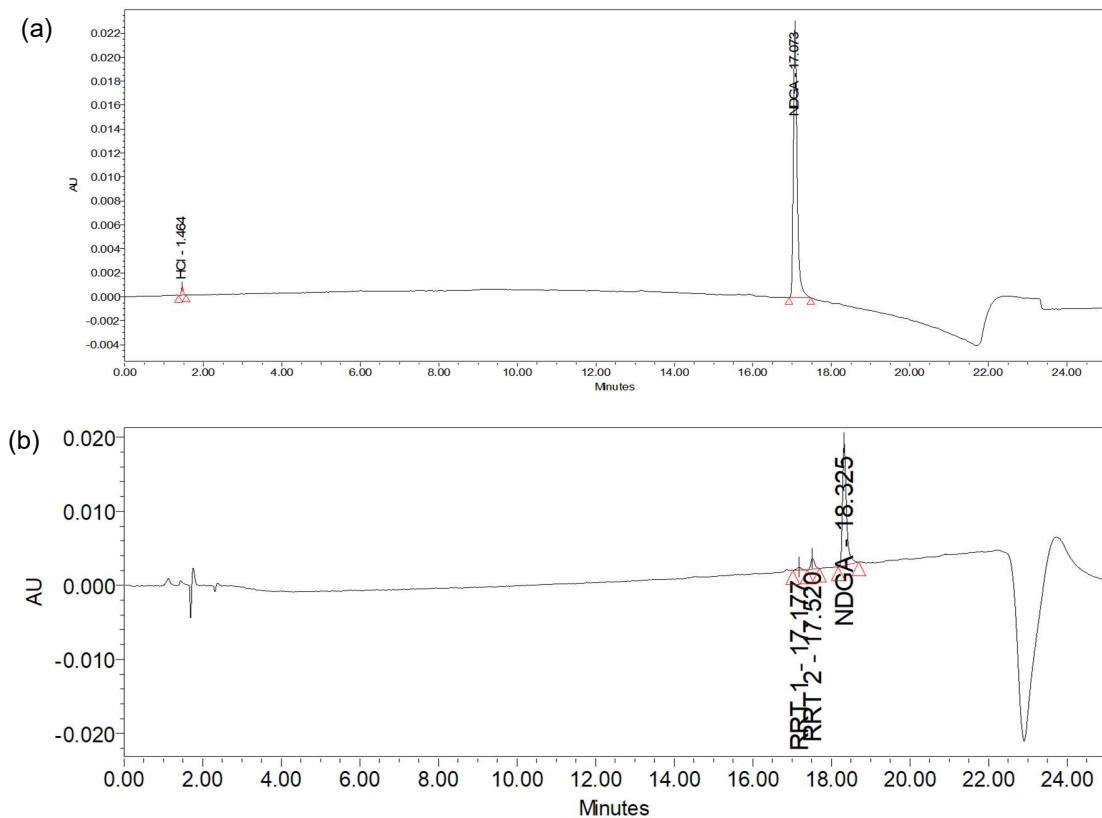
Os resultados obtidos na análise foram comparados frente à amostra-controle. Os resultados dos testes supracitados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Resultados das soluções em estresse ácido.

	Tempo de coleta (minutos)	Fator Resposta ¹	Recuperação do NDGA (%)
Amostra-controle	-	2383	-
HCl 0,1 mol L ⁻¹	0	2359	99,00
HCl 0,1 mol L ⁻¹	45	2324	97,52
HCl 0,1 mol L ⁻¹	90	2120	88,96
HCl 0,1 mol L ⁻¹ / NaOH 0,1 mol L ⁻¹	90	2064	86,61

¹relação sinal / concentração sinal

Pode-se observar o decaimento significativo da recuperação do NDGA decorrente do tempo na condição exposta. Na Figura 5, o perfil cromatográfico é apresentado para a condição de estresse.



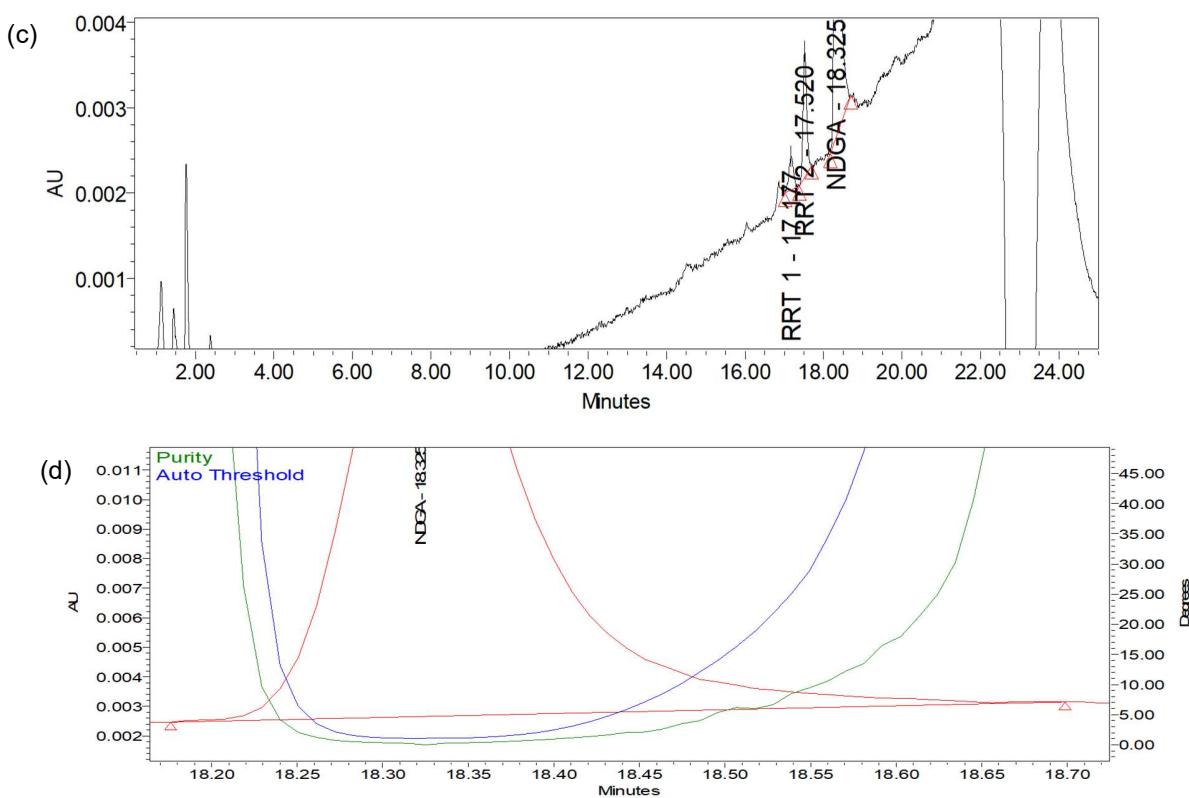


Figura 5 Resultados obtidos em estresse ácido. (a) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em HCl 0,1 mol L⁻¹ após 90 minutos de estresse, sem neutralização. (b) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em HCl 0,1 mol L⁻¹ neutralizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹. (c) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em HCl 0,1 mol L⁻¹ neutralizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹, aplicado o zoom. (d) Homogeneidade espectral da solução-amostra NDGA em HCl 0,1 mol L⁻¹ neutralizada com NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Observa-se que na Figura 5(a) não houve a formação de produtos de degradação ao serem analisados os cromatogramas da degradação ácida com 90 minutos de estresse. Na Figura 5(b), os produtos de degradação foram eluídos e ainda nota-se que a eluição ocorreu somente quando a solução foi neutralizada, devido à provável existência de grupamentos químicos susceptíveis à protonação, tais como os grupos hidrofílicos. Quando expostos a condições ácidas de pH, os grupos hidrofílicos são protonados e deixam a molécula mais polar, deste modo, haverá maior interação com a fase móvel. Quando a solução foi neutralizada, tais grupos funcionais retornaram a sua condição, apresentaram melhor interação com a coluna e foram identificados no método. O zoom foi aplicado na Figura 5(c) para melhor visualização dos produtos de degradação formados e, na Figura 5(d), confirma-se a homogeneidade espectral do NDGA em estresse ácido.

Os resultados do estudo de degradação forçada conduzido em meio básico são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Resultados das soluções em estresse básico.

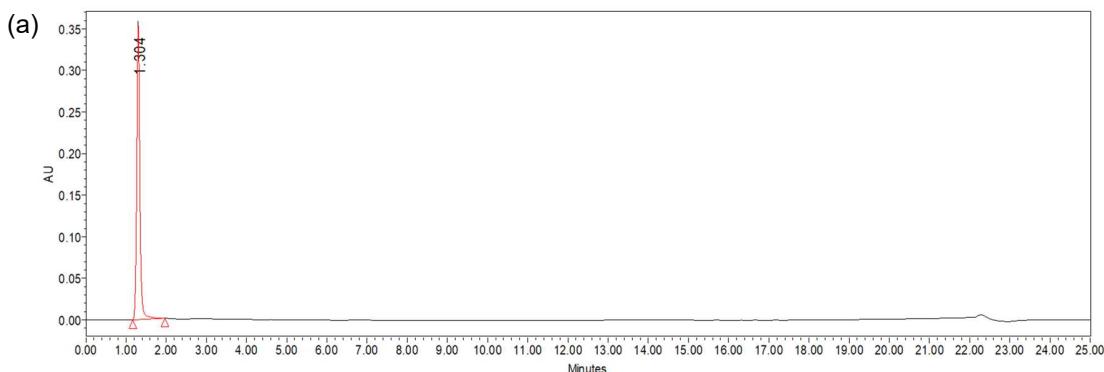
	Tempos de coleta (horas)	Fator Resposta ¹	Recuperação do NDGA (%)
Amostra Controle	-	2383	-
NaOH 1,0 mol L ⁻¹	0	0	0
NaOH 0,1 mol L ⁻¹	0	159	6,67
NaOH 1,0 mol L ⁻¹ / HCl 1,0 mol L ⁻¹	0	962	40,37
NaOH 0,1 mol L ⁻¹ / HCl 0,1 mol L ⁻¹	0	1373	57,62
NaOH 0,02 mol L ⁻¹ / HCl 0,02 mol L ⁻¹	0	1746	73,27

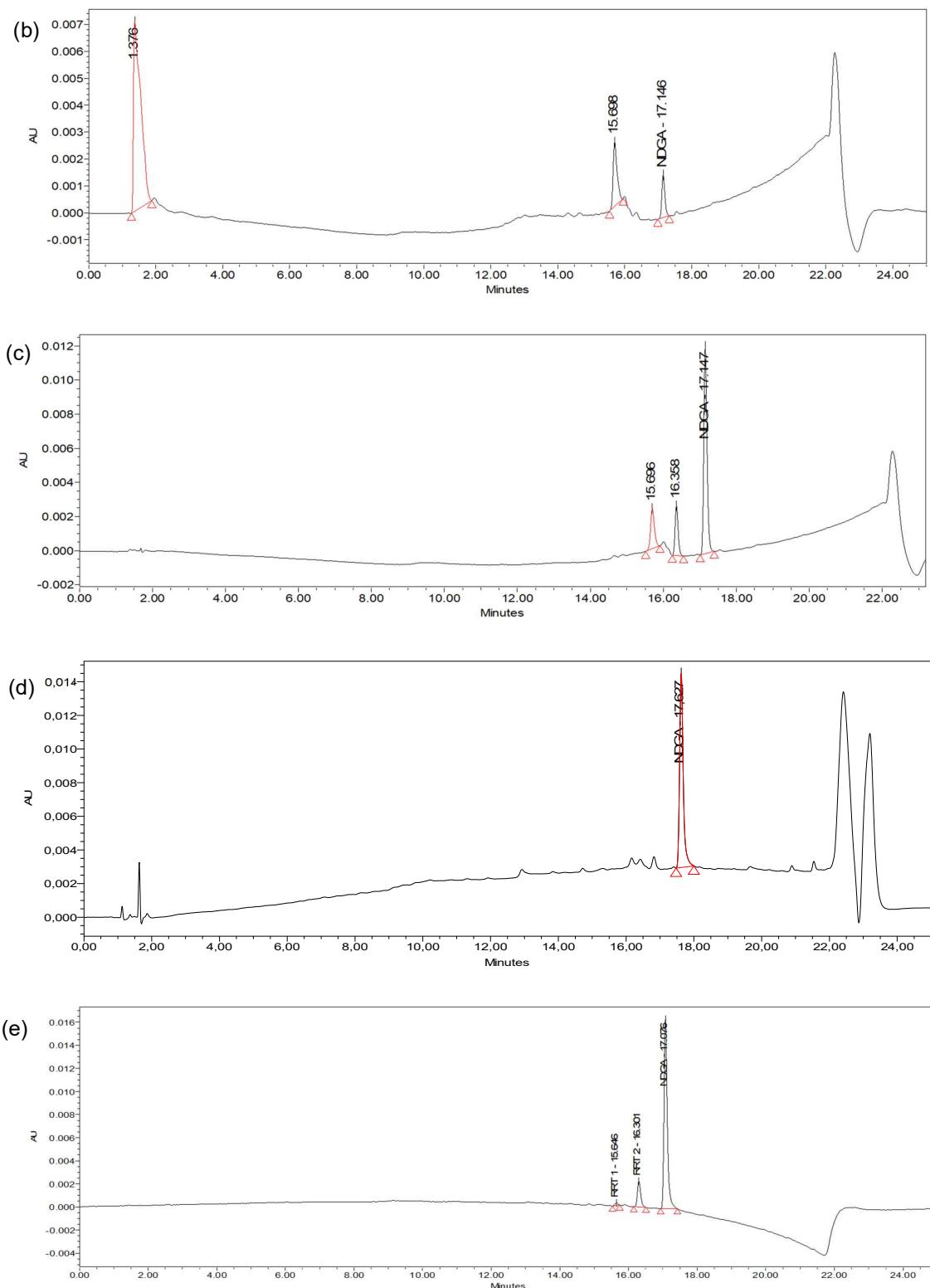
¹ relação sinal / concentração sinal

Pode-se verificar uma baixa recuperação do analito (NDGA) quando a análise da solução foi realizada sem ser previamente neutralizada. Tal fato pode ser explicado pela formação de sais dos respectivos catecósis, devido à desprotonação dos grupamentos hidrofílicos, assim a molécula em questão aumenta a polaridade e apresenta baixa retenção em colunas cromatográficas de fase reversa, a qual o método em questão utiliza (MOUGEL et al., 2019).

Todavia, quando feita a neutralização da solução, pode-se evidenciar recuperação de aproximadamente 73% do ativo (NDGA), juntamente dos produtos de degradação inespecíficos.

A neutralização é necessária para que a molécula torne-se apolar, com a finalidade de obter maior recuperação do analito. Tal diferença em sua polaridade fica evidenciada ao serem analisados os cromatogramas expostos na Figura 6.





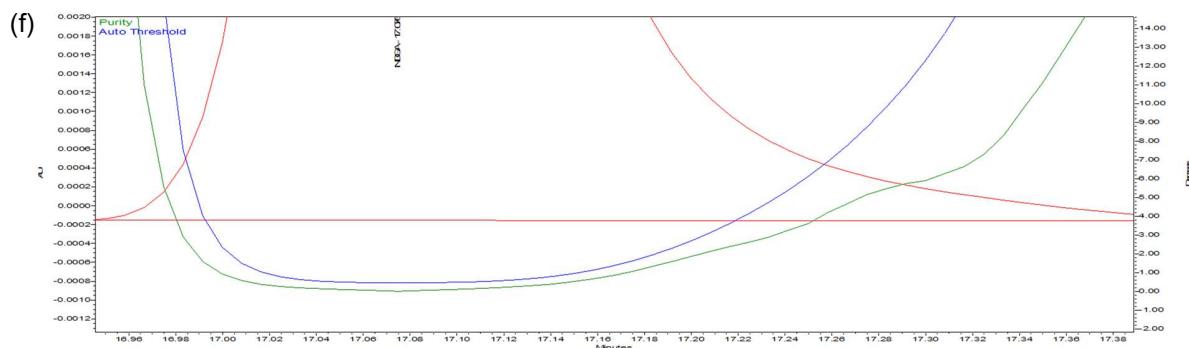


Figura 6 Resultados obtidos em estresse básico. (a) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em NaOH 1,0 mol L⁻¹. (b) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em NaOH 0,1 mol L⁻¹. (c) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em NaOH 1,0 mol L⁻¹ neutralizado com HCl 1,0 mol L⁻¹. (d) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em NaOH 0,1 mol L⁻¹ neutralizado com HCl 0,1 mol L⁻¹. (e) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em NaOH 0,02 mol L⁻¹ neutralizado com HCl 0,02 mol L⁻¹. (f) Homogeneidade espectral da solução-amostra NDGA em NaOH 0,02 mol L⁻¹ neutralizado com HCl 0,02 mol L⁻¹.

Nas Figura 6 (a) e (b), é possível visualizar o efeito do pH básico quando não neutralizado; fato diferente do observado nas Figura 6 (c), (d) e (e), cujos pHs foram neutralizados e apresentam recuperação de acordo com a concentração do agente degradante, pois quanto maior a concentração, maior a degradação.

Portanto, conclui-se que a neutralização é fundamental para a molécula do NDGA em condições de hidrólise, visto a dependência de pH da molécula de NDGA e de seus produtos de degradação. O analito exposto à condição de estresse proposta manteve-se espectralmente homogêneo e o decaimento significativo foi superior a 10%.

6.1.2.2. Degradação oxidativa e por íons metálicos

O H₂O₂ foi utilizado como agente estressante em amostras submetidas ao meio oxidativo. Os resultados da degradação oxidativa estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados das soluções em estresse oxidativo.

Tempos de coleta (minutos)	Fatores Resposta ¹	Recuperação do NDGA (%)
Amostra-controle	-	2383
H ₂ O ₂ 0,01%	0	2150 90,22

¹ relação sinal / concentração sinal

De acordo com os dados, observou-se decaimento de aproximadamente 10% da recuperação do NDGA para esta condição. E os cromatogramas obtidos para esta análise estão reportados na Figura 7.

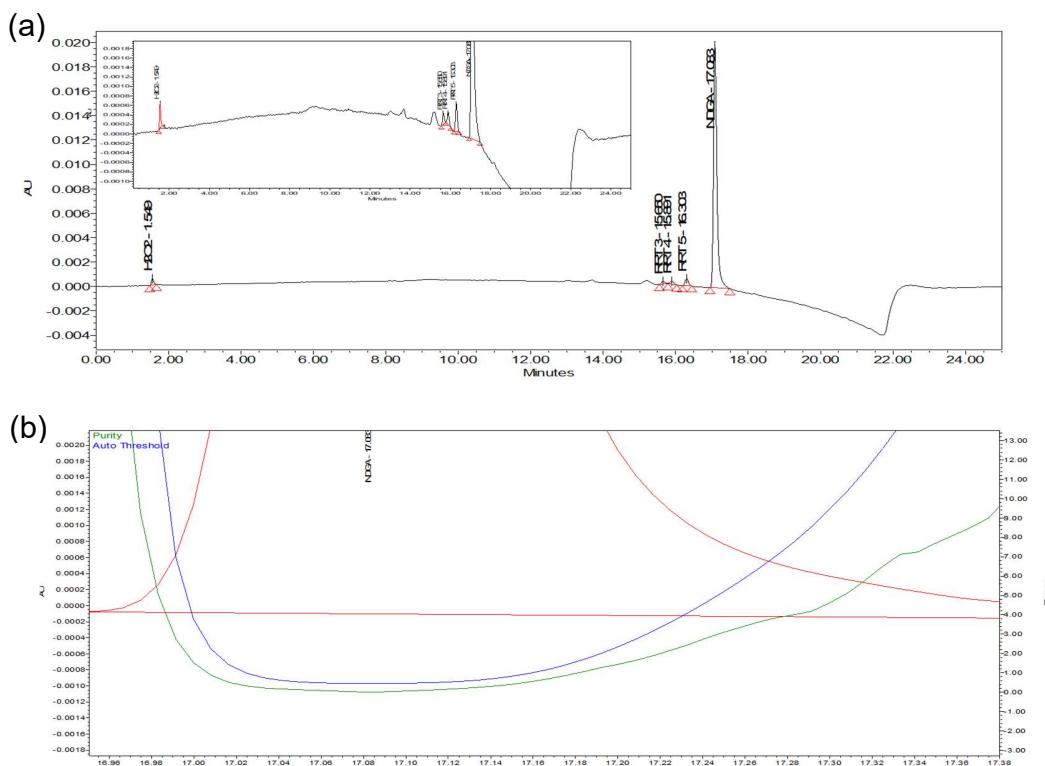


Figura 7 Resultados obtidos em estresse oxidativo. (a) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em H_2O_2 0,01%. (b) Homogeneidade espectral da solução amostra NDGA em H_2O_2 0,01%.

A porcentagem de produtos de degradação gerados é relativa ao decaimento do pico do analito (NDGA), nos quais estão reportados no EDF da validação da metodologia. Adicionalmente, também foi verificada a homogeneidade espectral do pico do NDGA após o período de estresse, e que se apresenta homogêneo.

Fármacos susceptíveis à oxidação podem formar cetona e correspondem ao mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. O fenol também pode transferir elétrons formando N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido (BLESSY et al., 2014).

As condições apresentadas na Tabela 8 foram testadas para as amostras expostas ao estresse de íons metálicos.

Tabela 8 Resultados das soluções em estresse de íons metálicos.

	Tempo de coleta (horas)	Fator Resposta ¹	Recuperação do NDGA (%)
Amostras-controle	-	2387	-
FeCl ₃ 20 mmol L ⁻¹	24	0	0
CuSO ₄ 100 mmol L ⁻¹	24	0	0
FeCl ₃ 20 mmol L ⁻¹ / EDTA 100 mmol L ⁻¹	24	2252	94,34
CuSO ₄ 100 mmol L ⁻¹ / EDTA 100 mmol L ⁻¹	24	2252	94,34

¹ relação sinal / concentração sinal

Foi possível quantificar o NDGA somente quando adicionado o EDTA com base nos resultados obtidos. Conclusões semelhantes às observadas neste estudo foram reportadas por Oviedo e Rodríguez (2003) e Antonin et al., (2011), pois, o EDTA por ser um agente quelante evita a precipitação do analito em solução e sequestra os metais presentes. Desta forma, quando adicionado o EDTA em solução, o mesmo se complexa com íons metálicos e libera as moléculas de NDGA em solução, às quais podem ser identificadas novamente. Na Figura 8, é apresentada a estrutura química do complexo formado de cobre com EDTA.

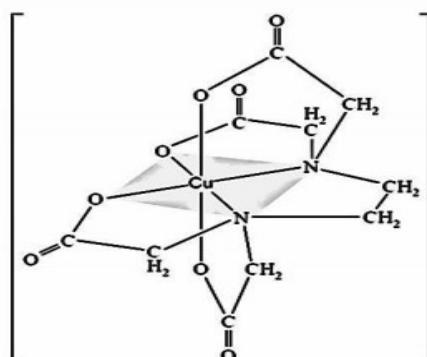


Figura 8 Estrutura química do complexo de EDTA com cobre.
Fonte: Adaptado de SKOOG et al., 2014.

Após a adição do EDTA, os resultados observados para a amostra estressada em FeCl₃ e CuSO₄ foram os mesmos, contudo, o agente estressante definido foi de acordo com o perfil de degradação observado na Figura 9.

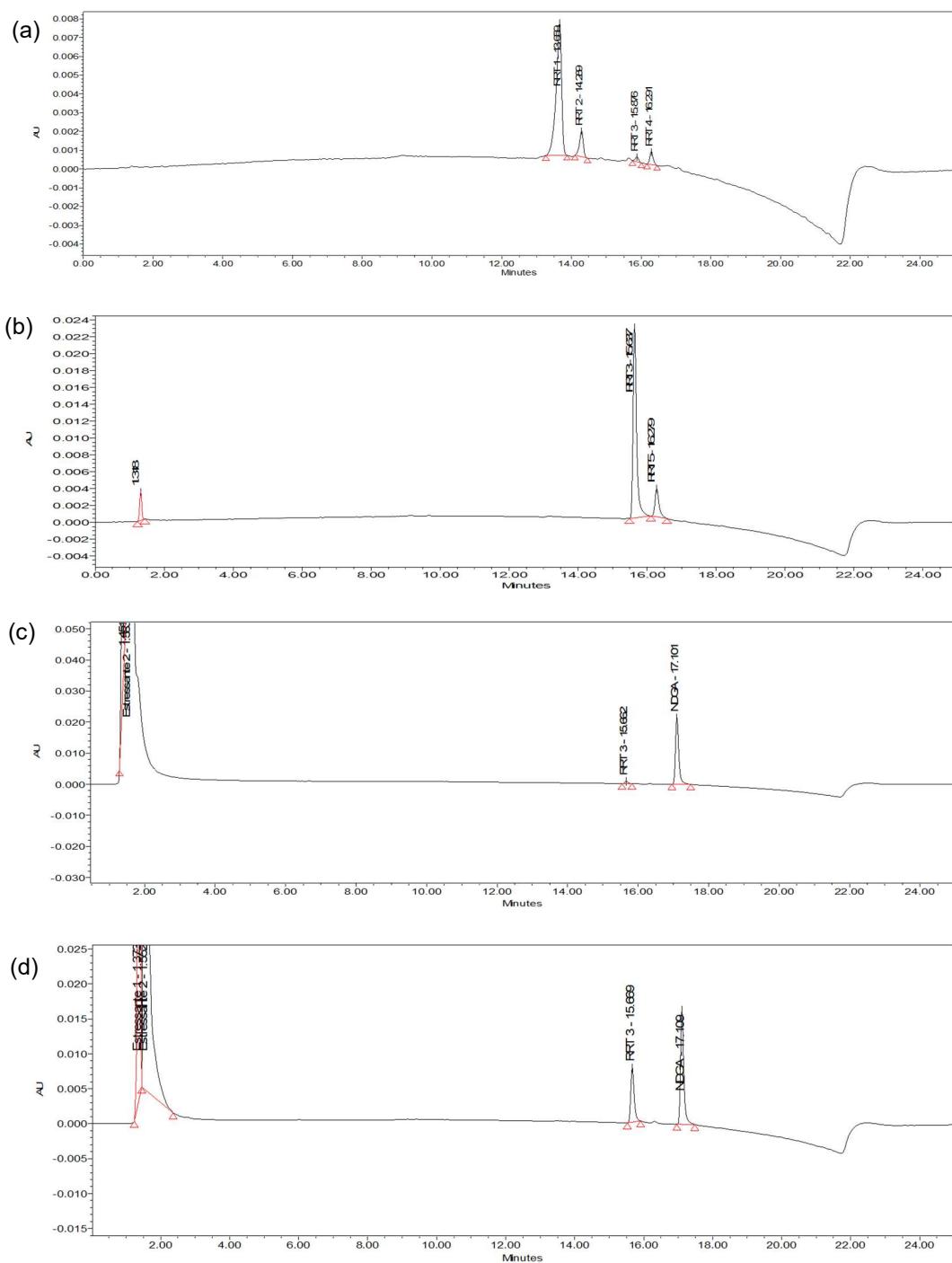


Figura 9 Resultados obtidos em estresse de íons metálicos. (a) Cromatograma da solução amostra de NDGA em FeCl_3 20 mmol L⁻¹. (b) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em CuSO_4 100 mmol L⁻¹. (c) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em FeCl_3 20 mmol L⁻¹ com adição de EDTA 100 mmol L⁻¹. (d) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em CuSO_4 100 mmol L⁻¹ com adição de EDTA 100 mmol L⁻¹.

Notou-se que sem a adição do agente quelante, com base nos resultados apresentados acima, a recuperação do NDGA é nula, conforme chromatogramas nas

Figuras 9(a) e (b), visto que a molécula de NDGA está complexada com o metal adicionado. As amostras analisadas com a adição do EDTA (Figuras 9(c) e (d)), apresentam-se com recuperação do analito nos dois metais testados. Com isso, o metal definido para esta condição foi o CuSO₄, justificado pelo seu perfil cromatográfico obtido, pois o produto de degradação gerado é equivalente ao decaimento da recuperação.

Além disso, Villota, Lomas e Camarero (2016) e Rodríguez et al. (2009) também relataram que na oxidação por íons metálicos pode ocorrer a desprotonação da hidroxila. Galano et al. (2010) realizaram um estudo eletroquímico do NDGA, cujos resultados atribuídos também correspondem à formação de o-quinona.

6.1.2.3. Degradção física

Na degradação física, as amostras foram submetidas aos estresses de temperatura, umidade e fotodegradação.

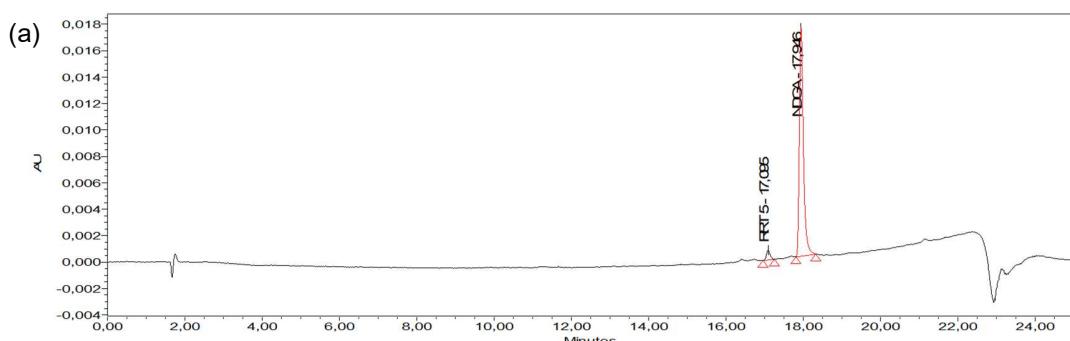
Os resultados observados na degradação física são apresentados na Tabela 9.

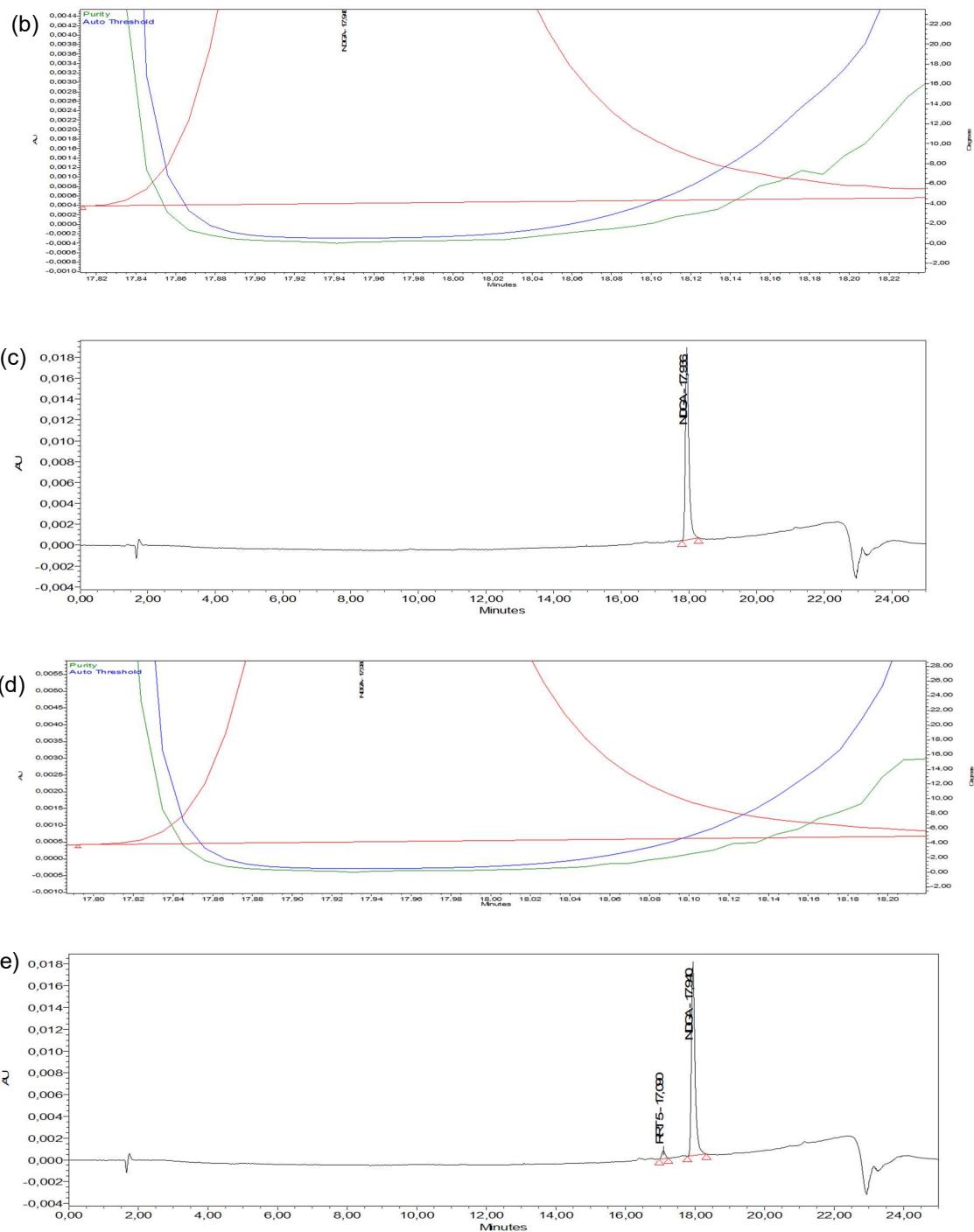
Tabela 9 Resultados das soluções em estresses físicos.

	Tempos de coleta (horas)	Fatores Resposta ¹	Recuperação do NDGA (%)
Amostra-controle	-	2387	-
Estresse térmico	240	2318	97,11
Estresse de umidade	240	2318	97,11
Estresse de fotodegradação	170	2308	96,69

¹relação sinal / concentração sinal

De acordo com os mesmos, observa-se que não houve decaimento significativo da recuperação do NDGA para as condições. Adicionalmente, também se verificou a homogeneidade espectral do pico do NDGA após o tempo de estresse confirmando a homogeneidade do NDGA nos cromatogramas (Figura10).





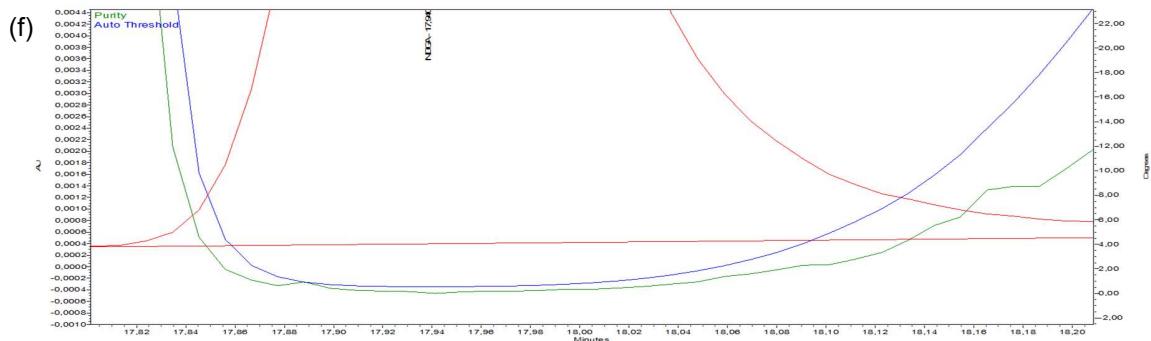


Figura 10 Resultados obtidos em estresses físicos. (a) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em estresse térmico.(b) Homogeneidade espectral da solução-amostra NDGA em estresse térmico. (c) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em estresse de umidade. (d) Homogeneidade espectral da solução-amostra NDGA em estresse de umidade. (e) Cromatograma da solução-amostra de NDGA em estresse fotolítico. (f) Homogeneidade espectral da solução-amostra NDGA em estresse fotolítico.

O método foi considerado apto para ser validado após determinar as condições de estresse do estudo de degradação forçada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- ALSANTE, Karen M.; BAERTSCHI, Steven W.; COUTANT, Michael; MARQUEZ, Brian L; AFIADO, Thomas R; ZELESKY, Todd C. Degradation and Impurity Analysis for Pharmaceutical Drug Candidates. **Handbook Of Modern Pharmaceutical Analysis**, v. 10, p.59-169, 2011.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines For Standard Method Performance Requirements, 2016.
- ARRIGO, André-patrick. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 27, n. 9-10, p.936-944, nov. 1999.
- ARTEAGA, Silvia; ANDRADE-CETTO, Adolfo; CÁRDENAS, Rene. Larrea Tridentata (Creosote Bush), An Abundant Plant Of Mexican And Us-American Deserts And Its Metabolite Nordihydroguaiaretic Acid. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p.231-239, abr. 2005.
- BAERTSCHI, Steven W; ALSANTE, Karen M; REED, Robert A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 2. ed. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2011. 612 p.
- BARA, Maria Teresa F.; RIBEIRO, Paula A.m.; ARANTES, Maria do Carmo B; AMORIM, Luci Ley S.S; PAULA, José Realino. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p.211-215, jun. 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Nº 4**. Brasília, DF: Anvisa, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 318 de 06 de novembro de 2019**. Brasília, DF: Anvisa, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Brasília, DF: Anvisa, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução De Diretoria Colegiada - RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015**. Brasília, DF: Anvisa, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 48 , de 16 de março De 2004**. Brasília, DF: Anvisa, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 134 , de 29 de maio De 2003**. Brasília, DF: Anvisa, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução De Diretoria Colegiada - RDC N° 17, de 24 de fevereiro de 2000.** Brasília, DF: Anvisa, 2000.

BRETNALL, Alison E; CLARKE, Graham S. Validation Of Analytical Test Methods. In: Ahuja, Satinder & Scypinski, Stephen. **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis.** 2. ed. Nova Jersey: Separation Science And Technology, 2011. v. 10, cap 11, p.429-457.

BUCAR, Franz; WUBE, Abraham; SCHMID, Martin. Natural product isolation--how to get from biological material to pure compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p.525-545, abr. 2013.

BUSSE, Werner. The Significance of Quality for Efficacy and Safety of Herbal Medicinal Products. **Drug Information Journal**, v. 34, n. 1, p.15-23, jan. 2000.

CASS, Quezia B; DEGANI, Ana Lúcia Gusmão. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação.** São Carlos: Edufscar, 2001. 77 p.

COLLINS, Carol H; BRAGA, Gilberto L; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de Cromatografia.** São Paulo: Unicamp, 2006. 456 p.

CRUZ, Mayara Teles da; ALVIM, Marina Neiva. **Fitoterápicos: estudos com plantas para fins terapêutico e medicinal.** 2013. 17 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Sabará, 2013.

CUI, Qinghua; DU, Ruikun; LIU, Miaomiao; RONG, Lijun. Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. **Molecules**, v. 25, n. 1, p.183-200, jan. 2020. MDPI AG.

DAVID, Bruno; DIAS, Daniel A; WOLFENDER, Jean-luc. The pharmaceutical industry and natural products: Historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p.299-315, abr. 2015.

DRECKTRAH, D; FIGUEIREDO, P; MASON, Roger M; BROWN, William J. Retrograde trafficking of both Golgi complex and TGN markers to the ER induced by nordihydroguaiaretic acid and cyclofenil diphenol. **Journal Of Cell Science**, p.951-965, abr. 1998.

EADS, D; HANSEN, R; OYEGUNWA, U M; CECIL, C; CULVER, C; SCHOLLE, F; PETTY, I; LASTER, S. Terameprocol, a methylated derivative of nordihydroguaiaretic acid, inhibits production of prostaglandins and several key inflammatory cytokines and chemokines. **Journal Of Inflammation**, v. 6, n. 2, p.1-18, jan. 2009.

EKOR, Martins. The Growing Use Of Herbal Medicines: Issues Relating To Adverse Reactions And Challenges In Monitoring Safety. **Frontiers In Pharmacology**, v. 4, n. 177, p.1-10, jan. 2014.

FARIA, C M Q G de; NAZARE, A C; PETRONIO, M S; PARACATU, L C; ZERAÍ, M L; REGASINI, L O; SILVA, D H; FONSECA, L M de; XIMENES, V F. Protocatechuic Acid Alkyl Esters: Hydrophobicity As a Determinant Factor for Inhibition of NADPH Oxidase. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 28, p.4885-4893, 1 out. 2012.

- FLORIANO-SÁNCHEZ, E; VILLANUEVA, C; MEDINA-CAMPOS, O N; ROCHA, D; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, D J; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. Nordihydroguaiaretic acid is a potent *in vitro* scavenger of peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid and prevents *in vivo* ozone-induced tyrosine nitration in lungs. **Free Radical Research**, v. 40, n. 5, p.523-533, maio 2006.
- GEZGINCI, Mikail Hakan; TIMMERMANN, Barbara N. A Short Synthetic Route to Nordihydroguaiaretic Acid (NDGA) and Its Stereoisomer Using Ti-Induced Carbonyl-Coupling Reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 35, p.6083-6085, ago. 2001.
- GHOSH, V. K.; NAGORE, D. H.; KADBHANE, K. P.; PATIL, M.J. Different approaches of alternative medicines in acne vulgaris treatment. **Oriental Pharmacy And Experimental Medicine**, v. 11, n. 1, p.1-9, mar. 2011.
- GIORDANO, F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p.500-508, mar. 2005.
- HAMBURGER, Matthias; HOSTETTMANN, Kurt. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p.3864-3874, jan. 1991.
- HEINRICH, Michael; BARNES, Joanne; PRIETO-GARCIA, José; GIBBONS, Simon; WILLIAMSON, Elizabeth. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. 3. ed. China: Churchill Livingstone, 2018. 360 p.
- HERON, S; YARNELL, e. The safety of low-dose *Larrea tridentata* (DC) Coville (creosote bush or chaparral): a retrospective clinical study. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p.175-185, abr. 2001.
- HOLLAND, J A; GOSS, R A; O'DONNELL, R W; CHANG, M M; JOHNSON, D K; ZIEGLER, L M. Low-density lipoprotein induced actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells: mechanisms of action. **Endothelium: Journal Of Endothelial Cell Research**, v. 8, n. 2, p.117-135, fev. 2001.
- ICH. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. **Stability Testing Of New Drug Substances And Products Q1a(R2)**, 2003.
- ICH. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. **Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)**, 2005.
- JAESCHKE, H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. **Journal Of Gastroenterology And Hepatology**, v. 26, n. 1, p.173-179, jan. 2011.
- KHAN, M; REDDY, C N; RAVINDRA, G; REDDY, K V; DUBEY, P K. Development and validation of a stability indicating HPLC method for simultaneous determination of four novel fluoroquinolone dimers as potential antibacterial agents. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 59, n. 1, p.162-166, fev. 2012.

- KINGHORN, A Douglas; PAN, Li; FLETCHER, Joshua N; CHAI, Heebyung. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. **Journal Of Natural Products**, Si, v. 74, n. 6, p.1539-1555, jun. 2011.
- KLAUNIG, J; KAMENDULIS, L M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, v. 44, p.239-267, 2004.
- LAMBERT, Joshua D; MEYERS, Ross O; TIMMERMANN, Barbara N; DORR, Robert T. Pharmacokinetic analysis by high-performance liquid chromatography of intravenous nordihydroguaiaretic acid in the mouse. **Journal Of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 754, n. 1, p.85-90, abr. 2001.
- LANÇAS, Fernando M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.
- LIA, V V; CONFALONIERI, V A; COMAS, C L; HUNZIKER, J H. Molecular Phylogeny of Larrea and its Allies (Zygophyllaceae): Reticulate Evolution and the Probable Time of Creosote Bush Arrival to North America. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 21, n. 2, p.309-320, nov. 2001.
- LÜ, Jian-ming; LIN, P H; YAO, Q. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p.840-860, abr. 2010.
- LÜ, Jian-ming; NURKO, Jacobo; WEAKLEY, Sarah M; JIANG, Jun; KOUGIAS, Panagiotis; LIN, Peter H; YAO, Qizhi; CHEN, Changyi. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: An update. **Medical Science Monitor: International Medical Journal Of Experimental And Clinical Research**, v. 16, n. 5, p.93-100, ago. 2010.
- MAALOUF, S; EL-SABBAN, H; DARWICHE, N; GALI-MUHTASIB, H. Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes. **Molecular Carcinogenesis**, v. 34, n. 3, p.121-130, jul. 2002.
- MEYER, April N; MCANDREW, Christopher W; DONOGHUE, Daniel J. Nordihydroguaiaretic Acid Inhibits an Activated FGFR3 Mutant, and Blocks Downstream Signaling in Multiple Myeloma Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 18, p.7362-7370, set. 2009.
- MILAGROS, M Rocha; VICTOR, V M. Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effects of mitoquinone. **Medical Science Monitor: International Medical Journal Of Experimental And Clinical Research**, v. 13, n. 7, p.132-145, jul. 2007.
- NETTO, E M; SHUQAIR, N S M S A Q; BALBINO, E E; CARVALHO, A C D. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 03, p.9-17, mar. 2006.
- NEWMAN, David J; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.629-661, 7 fev. 2016. American Chemical Society (ACS).
- NISHIMURA, K; TSUMAGARI, H; MORIOKA, A; YAMAUCHI, K; LU, S; JISAKA, M;

- NAGAYA, T; YOKOTA, K. Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. **Applied Biochemistry And Biotechnology - Part A Enzyme Engineering And Biotechnology**, v. 102-103, n. 1-6, p.239-250, jul/dez. 2002.
- PARACATU, L C; FARIA, C M; ZERAIK, M L; QUINELLO, C; RENNÓ, C; PALMEIRA, P; FONSECA, L M; XIMENES, V F. Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. **Food And Function: The Royal Society Of Chemistry**, v. 6, n. 6, p.1818-1831, jun. 2015.
- PARK, S; HAHM, R E; LEE, D K; YANG, C H. Inhibition of AP-1 transcription activator induces myc-dependent apoptosis in HL60 cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 91, n. 5, p.973-986, abr. 2004.
- RAMADOUSS, Karthikeyan; ORUGANTI, Sai K. Isolation, Characterization and Determination of Nordihydroguaiaretic Acid in Nutrition Supplement by Using Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography. **Eurasian Journal Of Analytical Chemistry**, v. 11, n. 4, p.225-232, 2016.
- RAMAN, N V V S S; HARIKRISHNA, K A; PRASAD, A V S S; REDDY, Ratnakar K; RAMAKRISHNA, K. Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for famciclovir. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p.797-802, dez. 2009.
- RATES, S.m.k. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p.603-613, maio 2001.
- RÍOS, Juan Manuel; MANGIONE, Antonio; GIANELLO, Jc. Effects of natural phenolic compounds from a desert dominant shrub *Larrea divaricata* Cav. on toxicity and survival in mice. **Revista Chilena de História Natural**, v. 81, n. 2, p.293-302, jun. 2008.
- ROLO, A P; PALMEIRA, C M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p.167-178, abr. 2006.
- RÖPKE, Cristina D; KANEKO, Telma M; RODRIGUES, Renata M; SILVA, Vanessa V; BARROS, S; SAWADA, Tânia C H; KATO, Massuo J; BARROS, Silvia B M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcathecol from four topical formulations. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p.109-116, dez. 2002.
- SHABIR, Ghulam A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal Of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p.57-66, fev. 2003.
- SHAH, Y; IQBAL, Z; AHMAD, L; KHAN, A; KHAN, M I; NAZIR, S; NASIR, F. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: method development, validation and optimization of various experimental parameters. **Journal Of Chromatography B: Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences**, v. 879, n. 9-10, p.557-563, mar. 2011.
- SHEAHAN, Mary Clare; CHASE, Mark W. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae

- R.Br. based on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data. **Botanical Journal Of The Linnean Society**, v. 122, n. 4, p.279-300, dez. 1996.
- SHEIKH, Nasreen M.; PHILEN, Rossanne M.; LOVE, Lori A. Chaparral-Associated Hepatotoxicity. **Archives Of Internal Medicine American Medical Association**, v. 157, n. 8, p.913-919, abr. 1997.
- SIERENS, J; HARTLEY, J A; CAMPBELL, M J; LEATHEM, A J C; WOODSIDE, J V. In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. **Teratogenesis, Carcinogenesis, And Mutagenesis**, v. 22, n. 3, p.227-234, abr. 2002.
- SIMÕES, Claudia M. Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. 464 p.
- SINHA, V R; MONIKA; TREHAN, A; KUMAR, M; SINGH, S; BHINGE, J R. Stress studies on acyclovir. **Journal Of Chromatographic Science**, v. 45, n. 6, p.319-324, jul. 2007.
- SKOOG, D A; WEST, D M; HOLLER, F J; CROUCH, S R. **Fundamentos De Química Analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014. 950 p.
- SNYDER, D S; CASTRO, R; DESFORGES, J F. Antiproliferative effects of lipoxygenase inhibitors on malignant human hematopoietic cell lines. **Experimental Hematology**, v. 17, n. 1, p.6-9, jan. 1989.
- TIERRA, Michael. **Treating Cancer With Herbs: An Integrative Approach**. Lotus Press, 2003. 508 p.
- TUROLLA, Monica Silva dos Reis; NASCIMENTO, Elizabeth de Souza. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p.289-306, jun. 2006.
- UNITED STATES (United States). Napo Pharmaceuticals, Inc. Pravin R. Chaturvedi. **PHARMACOLOGICALLY OPTIMIZED MULTIMODAL DRUG DELIVERY SYSTEM FOR NORDIHYDROGUARETIC ACID (NDGA)**. USA nº US 9314.437 B2, 23 abr. 2012, 19 abr. 2016. U.S. PATENT DOCUMENTS, p. 1-20, 2016.
- VALE, Nilton Bezerra do. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 52, n. 3, p.368-380, jun. 2002.
- VAN AUKEN, O. W. Shrub Invasions of North American Semiarid Grasslands. **Annual Review Of Ecology And Systematics**, v. 31, n. 1, p.197-215, nov. 2000.
- WALLER, Coy W.; GISVOLD, Ole. A phytochemical investigation of Larrea divaricata Cav. **Journal Of The American Pharmaceutical Association**, Si, v. 34, n. 3, p.78-81, mar. 1945.
- WASHINGTON. Institute Of Medicine And National Research Council Of The National.

Scientific Principles for Integrating and Evaluating the Available Data. In: _____. **Dietary Supplements: A Framework for Evaluating Safety**. Washington, Dc: The National Academies Press, 2005. cap. 10. 253-268 p.

WEST, M; MHATRE, M; CEBALLOS, A; FLOYD, R A; GRAMMAS, P; GABBITA, S P; HAMDHEYDARI, L; MAI, T; MOU, S; PYE, Q N; STEWART, C; WEST, S; WILLIAMSON, K S; ZEMLAN, F; HENSLEY, K. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. **Journal Of Neurochemistry**, v. 91, n. 1, p.133-143, out. 2004.

WHITFORD, Walter G; NIELSON, Ronald; SOYZA, Amrita de. Establishment and effects of establishment of reosotebush, Larrea tridentata, on a Chihuahuan Desert watershed. **Journal of Arid Environments**, v. 47, n. 1, p.1-10, jan. 2001.

WUKIRSARI, Tuti; NISHIWAKI, Hisashi; NISHI, Kosuke; SUGAHARA, Takuya; AKIYAMA, Koichi; KISHIDA, Taro; YAMAUCHI, Satoshi. Cytotoxic Activity of Dietary Lignan and Its Derivatives: Structure–Cytotoxic Activity Relationship of Dihydroguaiaretic Acid. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 62, n. 23, p.5305-5315, maio 2014.

YUNES, Rosendo A.; PEDROSA, Rozangela Curi; CECHINEL FILHO, Valdir. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p.147-152, fev. 2001.

7.2. CAPÍTULO 1 -ARTIGO

ALSANTE, Karen M.; BAERTSCHI, Steven W.; COUTANT, Michael; MARQUEZ, Brian L; AFIADO, Thomas R; ZELESKY, Todd C. Degradation and Impurity Analysis for Pharmaceutical Drug Candidates. **Handbook Of Modern Pharmaceutical Analysis**, v. 10, p.59-169, 2011.

ANTONIN, V S; SILVA, J C M; SOUZA, R F B; SANTOS, M C; MALPASS, G R P. Estudo da Degradção do Complexo EDTA Cu (II) por Métodos Eletroquímicos. In: INTERNACIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 3, 2011, São Paulo. Anais. São Paulo, 2011. p. 1 - 8.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Appendix F: Guidelines For Standard Method Performance Requirements, 2016, pp. 1–18 (accessed november 25, 2019) http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

BRASIL, Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24 de julho de 2017. Brasília, DF: Anvisa, 2017.

pp. 1–13 (acesso em 25 de novembro, 2019) http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892.

BRASIL, Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 53, 4 de dezembro de 2015. Brasília, DF: Anvisa, 2015.
pp. 1–22 (acesso em 25 de novembro, 2019) <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>.

GE, Liya; LI, Shao-ping; LISAK, Grzegorz. Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, out. 2019.

GROUTAS, William C. Mecanismos de Reacción en Química Orgánica. Wichita: McGraw-hill, p.1-205, 2002. (212).

ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005, pp. 1–17 (acesso em 25 de novembro, 2019) [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF).

LÜ, Jian-ming; NURKO, Jacobo; WEAKLEY, Sarah M; JIANG, Jun; KOUGIAS, Panagiotis; LIN, Peter H; YAO, Qizhi; CHEN, Changyi. Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: An update. *Medical Science Monitor : International Medical Journal Of Experimental And Clinical Research*, v. 16, n. 5, p.93-100, ago. 2010.

MOUGEL, C; GARNIER, T; CASSAGNAU, P; SINTES-ZYDOWICZ, N. Phenolic foams: A review of mechanical properties, fire resistance and new trends in phenol substitution. *Polymer*, v. 164, p.86-117, fev. 2019.

OVIEDO, Claudia; RODRÍGUEZ, Jaime. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p.901-905, dez. 2003.

PARACATU, L C; FARIA, C M; ZERAIK, M L; QUINELLO, C; RENNÓ, C; PALMEIRA, P; FONSECA, L M; XIMENES, V F. Hydrophobicity and antioxidant activity acting together

for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. Food And Function: The Royal Society Of Chemistry, v. 6, n. 6, p.1818-1831, jun. 2015.

RAMAN, N V V S S; HARIKRISHNA, K A; PRASAD, A V S S; REDDY, Ratnakar K; RAMAKRISHNA, K. Development and validation of a stability-indicating RP-LC method for famciclovir. Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, v. 50, n. 5, p.797-802, dez. 2009.

SHEIKH, Nasreen M.; PHILEN, Rossanne M.; LOVE, Lori A.. Chaparral-Associated Hepatotoxicity. Archives Of Internal Medicine American Medical Association, v. 157, n. 8, p.913-919, abr. 1997.

SNYDER, D S; CASTRO, R; DESFORGES, J F. Antiproliferative effects of lipoxygenase inhibitors on malignant human hematopoietic cell lines. Experimental Hematology, v. 17, n. 1, p.6-9, jan. 1989.

VILLOTA, N.; LOMAS, J M; CAMARERO, L M. Nature of the degradation products of phenol which produce high levels of color in the wastewater oxidized in a photo-Fenton system. Desalination And Water Treatment, v. 57, n. 59, p.28784-28793, 20 jun. 2016.

WEST, M; MHATRE, M; CEBALLOS, A; FLOYD, R A; GRAMMAS, P; GABBITA, S P; HAMDHEYDARI, L; MAI, T; MOU, S; PYE, Q N; STEWART, C; WEST, S; WILLIAMSON, K S; ZEMLAN, F; HENSLEY, K. The arachidonic acid 5-lipoxygenase inhibitor nordihydroguaiaretic acid inhibits tumor necrosis factor alpha activation of microglia and extends survival of G93A-SOD1 transgenic mice. Journal Of Neurochemistry, v. 91, n. 1, p.133-143, out. 2004.