



# Desenvolvimento de método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lupeol em nanocápsulas poliméricas

Letícia Nasser Naves<sup>1</sup>; Maria Augusta Alves Silva<sup>1</sup>; Alexandre Pereira Santos<sup>2</sup>; Mariana O. Berreta<sup>1</sup>; Marize Campos Valadares<sup>2</sup>; Eliana Martins Lima<sup>1</sup>; Danielle Guimarães Almeida Diniz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Goiânia, Goiás, Brazil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, Goiânia, Goiás, Brazil.

## RESUMO

Um método de cromatografia líquida de alta performance simples, exato e preciso foi desenvolvido para a determinação do lupeol em nanocápsulas poliméricas. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Varian C8 (250 mm x 4,6 mm x 5 mm), mantida a 35°C, fase móvel constituída por acetonitrila e metanol acidificado com ácido acético a 0,1% (95:5 v/v), e taxa de fluxo de 1,2 mL/min, com um volume injeção de amostra de 20 µl e detecção UV a 210 nm, com o tempo de eluição de 6,2 min. O método proposto é linear para a faixa de concentração de 10 a 250 µg/mL com coeficiente de correlação de 0,9996. As análises de exatidão e precisão demonstraram baixos valores de desvio padrão relativo (< 4,2%). A metodologia foi específica, linear, precisa, exata e robusta, se mostrando capaz de ser aplicada para quantificação de lupeol em nanocápsulas poliméricas.

Palavras-Chave: Lupeol. CLAE. Nanocápsulas.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização de plantas medicinais como insumos e/ou para obtenção de diferentes formas farmacêuticas, tem sido alvo de constantes investimentos no mercado farmacêutico. Neste contexto, as agências regulatórias de cada país impõem algumas exigências para o registro de novos produtos, sendo uma delas a validação de metodologia analítica para determinação das substâncias ativas quando o método analítico utilizado não for farmacopeico. A maioria dos países tem estabelecido documentos oficiais que fornecem diretrizes a serem adotadas durante o processo de validação, incluindo ferramentas estatísticas para validação do método analítico (Brasil, 2003; Barros et al., 2002; Codex, 1995; European Commission, 2000; US-FDA, 2010; ICH, 1996; INMETRO, 2003; Ribani et al., 2004; USP, 2007; WHO, 1992; Bedner et al., 2008). A validação de um método é um processo contínuo que começa durante o planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do seu desenvolvimento. Técnicas clássicas de separação, como cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC), sempre foram destaques na química analítica pela sua capacidade de oferecerem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e nos alimentos (Bedner et al., 2008).

O lupeol é um composto triterpênico pentacíclico, isolado de diversas espécies, como a sucupira branca, *Pterodon emarginatus*, árvore nativa do cerrado. Apresenta, em sua estrutura química, quatro anéis com seis membros e um anel de cinco membros (lupano e hopanos), ponto de fusão de 215-216°C, peso molecular de 426,7 g/mol, comprimento de onda máximo no ultravioleta de 210 nm e pouca solubilidade em água (Geetha & Varalakshmi, 2001). Esta molécula exibe atividade antiinflamatória, antioxidante, antiartrítica, antidiabética, cardioprotetora, antiproliferativa, quimioprotetora e citoprotetora. No entanto, a quantidade de lupeol, em mg/kg corpóreo, necessária para promoção desses efeitos farmacológicos é

*Autor correspondente:* Danielle Guimarães Almeida Diniz, Universidade Federal de Goiás – UFG, FARMATEC- Av. Universitária n° 1166 - Setor Universitário, 74605-010-Goiânia, Goiás-Brasil. E-mail: danielle@ufg.br

elevada (Chaturvedi et al., 2008; Geetha & Varalakshmi, 2001; Kweifio-Okai et al., 1995; Saleem, 2009; Sunita et al., 2001; Siddique & Salem, 2011). Para contornar os problemas de sua solubilidade em meio aquoso, foram desenvolvidas dispersões de nanocápsulas poliméricas contendo lupeol utilizando mygliol 812 como núcleo oleoso e PLGA 85:15 como unidade polimérica. A extração do fármaco a partir deste sistema é extremamente importante para sua quantificação, neste caso, o desenvolvimento de um método simples, rápido e preciso para a extração e quantificação do lupeol presente nas nanocápsulas é altamente desejável. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico por CLAE para quantificação do lupeol.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Para formulação das nanocápsulas foram utilizados lupeol (teor 99,9%) (Sigma®), miglyol 812 (Sasol®), PLGA (85:15) (Sigma®) massa molecular de 10kDa, Poloxamer 188 (Pluronic F68)(Sigma®) e Poloxamer 127 (Pluronic F127) (Sigma®) e acetona (Vetec). Os solventes empregados foram acetona (JT Baker®) e metanol (JT Baker®), ambos grau CLAE, e ácido acético PA (Vetec).

### Preparo das nanocápsulas poliméricas contendo lupeol

As nanocápsulas (NC) foram obtidas segundo o método de deposição interfacial de polímero pré-formado, proposto por Fessi e colaboradores (1989). A fase oleosa, constituída de fosfatidilcolina de soja, PLGA (85:15), miglyol 812 e lupeol, foi vertida por gotejamento e mantida sob agitação sobre a fase aquosa, constituída por tampão fosfato pH 7,4, Pluronic F127 e Pluronic F68. O volume da dispersão obtida foi reduzido utilizando-se evaporador rotatório de maneira que a concentração final de lupeol foi ajustada para 1 mg mL<sup>-1</sup> (m/v).

### Extração do fármaco das nanocápsulas

Após o preparo das nanocápsulas e separação do fármaco livre através de filtração em membrana PVDF de 0,45 µm (Durapore), as amostras de nanocápsulas foram tratadas com etanol na proporção de 1:8 (v/v), agitadas em vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para precipitação e separação do polímero. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado em membrana PVDF de 0,45 µm (Durapore) para quantificação do lupeol. A concentração final da amostra analisada foi de 111,11 µg.mL<sup>-1</sup>

### Instrumentação e Condições Cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido Varian®, modelo Pro Star, equipado com módulo de injeção automática (Pro Star 410), bomba quaternária (Pro Star 240) e detector de comprimento de onda UV-Visível (Pro Star 310). Os dados foram processados através do programa Galaxie® (versão 1.9). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Chromospher RP-8 de 250 mm x 4mm x

5µm (Varian), fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 20 µL, detecção em 210 nm e fase móvel constituída por acetona:metanol acidificado (0,1% de ácido acético) na proporção de 95:5 (v/v).

### Preparo da solução padrão

A amostra padrão de lupeol foi dissolvida em metanol, submetida a ultrassom até completa dissolução e, em seguida, filtrada através de uma membrana (Durapore) PVDF de 0,45 µm.

### Validação do Método analítico

A validação foi realizada de acordo com as diretrizes para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, publicadas pela ANVISA e Food and Drug Administration (FDA), seguindo-se os critérios de seletividade, linearidade, intervalo, precisão intra-corrída, precisão intermediária, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação (Brasil, 2003; ICH, 1996; Inmetro, 2003; Ribani et al., 2004).

A seletividade do método foi avaliada através de análises comparativas entre o branco, as dispersões de nanocápsulas sem lupeol e as dispersões de nanocápsulas contendo lupeol. Para a análise de linearidade, três curvas de calibração foram avaliadas com concentrações de 10, 25, 50, 100, 125, 150, 200 e 250 µg.mL<sup>-1</sup> de padrão de lupeol. Foram realizadas análises de precisão intra-corrída e precisão intermediária com as soluções padrão. Para determinação da precisão intra-corrída foram realizadas nove determinações de três valores de concentração: alta (200 µg.mL<sup>-1</sup>), média (125 µg.mL<sup>-1</sup>) e baixa (25 µg.mL<sup>-1</sup>). Para a precisão intermediária, replicatas dessas concentrações foram preparadas por analistas diferentes em dias diferentes e analisadas. A precisão intermediária foi determinada seguindo os critérios de desvio padrão relativo menor que 5%.

Os limites de quantificação e detecção foram determinados por análise cromatográfica de triplicatas de soluções do fármaco em concentração decrescente, até menor nível mensurável e detectável, com precisão e exatidão. As soluções estabelecidas foram de 12, 10, 8, 5 e 4 µg.mL<sup>-1</sup>. A robustez do método foi avaliada através da alteração da temperatura de 35°C para 30°C, composição da fase móvel de 95:5 (v/v) para 94:6 (v/v) e fluxo da fase móvel de 1,2 para 1,1 mL/min. A estabilidade da solução do fármaco em metanol mantida a temperatura de 4°C, foi avaliada após 24 e 48 horas.

Os valores do fator de capacidade (k'), fator de simetria e resolução para o pico do lupeol bem como número de pratos teóricos foram processados através do programa Galaxie® (versão 1.9).

## RESULTADOS

O resultado obtido para a seletividade do método demonstra a inexistência de coeluição de substâncias interferentes da formulação de nanocápsulas na eluição

do analito (Figura 1). As análises obtidas para o padrão de lupeol apresentaram fator de capacidade ( $k'$ ) de 1.6 e fator de simetria de 1.06 para o pico do lupeol. Pode-se observar conforme cromatograma demonstrado na Figura 1(2), que no tempo de retenção do lupeol (6,2 min) não há sinal cromatográfico, constatando-se que o método possui seletividade para detecção do ativo. Os resultados obtidos para o número de pratos teóricos foram acima de 8000 em todas as análises.

A metodologia de análise desenvolvida demonstrou linearidade na faixa de 10 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e coeficiente linear de 0,9996 (Figura 2). A precisão intra-corrída, precisão intermediária e a exatidão, conforme Tabelas 1-3, demonstraram valores de RSD inferiores a 5%. Dessa forma, os valores de precisão e exatidão atendem a RE 899 da ANVISA (Brasil, 2003). Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação foram 5 e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 4).

As mudanças nos parâmetros analíticos avaliados não apresentaram diferenças significativas no tempo de retenção e nas áreas como pode ser demonstrado na Tabela 5. A solução padrão permaneceu estável por períodos de 24 e 48 horas, mantendo a concentração de 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  com 1,07% RSD e livre de produtos de degradação.

TABELA 1: Precisão intra-corrída do método cromatográfico para o Lupeol.

Concentração Teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentração calculada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Precisão (%)
25	24.01	96.05
125	125.48	100.43
200	197.57	98.79

TABELA 2: Precisão Intermediária .

Concentração esperada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Média da concentração obtida ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Precisão (%)	SD (%)	RSD (%)
25	24.53	98.13	1.01	4.12
125	127.14	101.71	3.09	2.43
200	197.99	99	6.29	3.17

TABELA 3: Exatidão do método cromatográfico para o Lupeol.

Concentração Teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentração calculada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD (%)
25	24.01	3.37
125	125.48	1.43
200	197.57	4.15

TABELA 4: Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Concentração Teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentração Calculada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	SD (%)	RSD (%)	Exatidão (%)
4	3.39	0.47	13.81	84.75
5	5.48	0.56	10.18	109.67
8	7.77	0.39	4.99	97.08
10	9.83	0.46	4.64	98.33
12	11.83	0.34	2.86	98.58

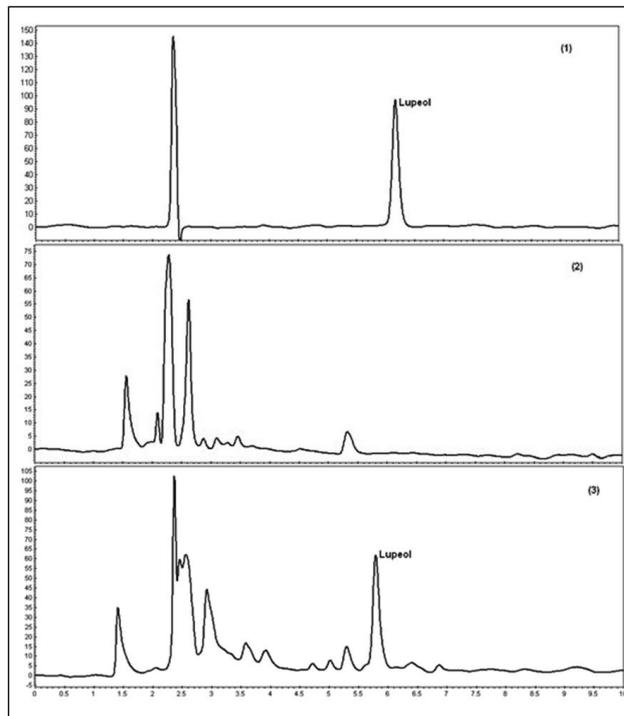


FIGURA 1: Cromatogramas obtidos por CLAE para o lupeol, usando coluna C 08 (250 x 4.6 mm), fase móvel constituída de ACN: MeOH acidificado com 0.1% de ácido acético (95:5), fluxo de 1.2 mL/min e temperatura da coluna de 35°C. (1) Lupeol; (2) nanocápsulas sem lupeol; (3) nanocápsulas com lupeol.

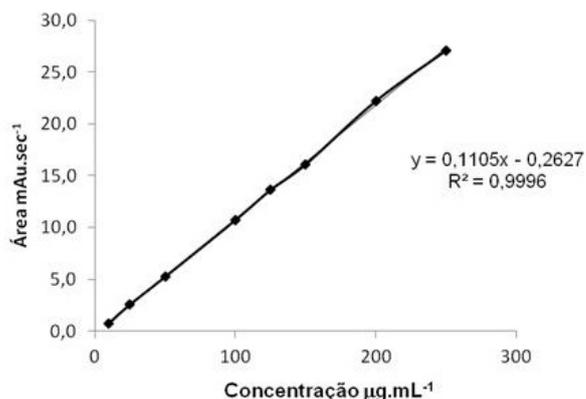


FIGURA 2: Curva de calibração obtida por CLAE para o lupeol, usando coluna C 08 (250 x 4.6 mm), fase móvel constituída de ACN: MeOH acidificado com 0.1% de ácido acético (95:5), fluxo de 1.2 mL/min e temperatura da coluna de 35°C.

TABELA 5: Robustez

Parâmetros Avaliados	Tempo de Retenção (min)	Área (mAu.min)	Concentração ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Fluxo (1.1)	6.75 $\pm$ 0,0	23.85 $\pm$ 0,05	213,45 $\pm$ 0,4
Temperatura da coluna (30°C)	6.63 $\pm$ 0,01	23.95 $\pm$ 0,2	214,36 $\pm$ 2,2
Fase móvel (94:6)	6.18 $\pm$ 0,01	23.7 $\pm$ 0,1	212,10 $\pm$ 0,9

## DISCUSSÃO

Encontram-se na literatura trabalhos publicados envolvendo diferentes métodos analíticos para detecção e separação de compostos triterpênicos, alguns destes métodos, empregam cromatografia gasosa, espectrometria de massas, cromatografia preparativa em camada delgada, cromatografia líquida, sendo necessária, para muitas dessas técnicas, a derivatização dos compostos analisados. Na maioria dos métodos de CLAE para a separação do lupeol e seus isômeros foi possível observar que os principais componentes utilizados na fase móvel foram água, acetonitrila e metanol (Bedner et al., 2008; Abyshev et al., 2006; Amico et al., 2004; Martelanc et al., 2007; Kpoviéssi et al., 2008; Mathe et al., 2004; Laghari et al., 2011).

O desenvolvimento de métodos por CLAE empregando detector de ultravioleta para análise do lupeol apresenta algumas dificuldades, já que a maioria dos compostos triterpênicos demonstra absorção em torno de 210 nm, o que torna a sensibilidade de detecção UV dependente do tipo dos constituintes da fase móvel (Paul et al., 2011). Neste trabalho, os constituintes da fase móvel foram fixados e avaliados com diferentes parâmetros cromatográficos como pH, fluxo, temperatura, tipo e comprimento de coluna, bem como volume de injeção, para avaliar o tempo de retenção, simetria e resolução dos picos. A variação do pH da fase móvel, utilizando uma coluna C8 e o fluxo de 1,2 mL/min, permitiu o ajuste do tempo de retenção do lupeol em aproximadamente 6,2 minutos contribuindo para a realização de uma corrida mais rápida, bem como para a melhor simetria do pico.

Mathe et al. (2004) separaram de amostras comerciais de óleos, por CLAE usando detector de UV, em 90 minutos de análise, o lupeol e seus isômeros de uma mistura de outros triterpenos empregando eluição em gradiente, coluna C18, 210 nm e fase móvel constituída de água e acetonitrila contendo 0,01% de ácido fosfórico. Martelanc et al. (2007) e Bedner et al. (2008) demonstraram em seus trabalhos tempo de retenção de 15 minutos e 25 minutos respectivamente para o lupeol, ambos utilizando coluna C18 e tendo como constituintes da fase móvel acetonitrila, metanol e água em diferentes proporções. Ambos relatam problemas na separação dos picos e na resolução da linha de base. Shah et al. (2010) desenvolveram e validaram método cromatográfico por CLAE para determinação simultânea de  $\beta$ -sitosterol e lupeol em amostras de *Vernonia cinerea* Linn, utilizando coluna C18 (150 mm x 4mm) como fase estacionária, fase móvel constituída por metanol e acetonitrila 30:70 (v/v). O método proposto por estes autores demonstrou resposta adequada para os parâmetros validados e, tempo de eluição de aproximadamente 7 min para o lupeol. Shailajan et al. (2012) também desenvolveram e validaram método cromatográfico por CLAE para determinação simultânea do lupeol e outros 2 triterpenos a partir de amostras de *Carissa carandas*, os resultados

obtidos permitiram a separação do lupeol com 5.2 minutos de eluição.

Laghari et al. (2011) desenvolveram e otimizaram vários parâmetros para uma rápida determinação do lupeol em extratos de plantas por CLAE-MS, utilizando como fase móvel metanol e ácido fórmico, fluxo isocrático a uma vazão de 1,0 mL por minuto com tempo total de corrida de 6 minutos e tempo de retenção do lupeol de 4 minutos, demonstrando que a fase móvel desempenha papel fundamental no tempo de análise do lupeol. Oliveira et al. (2012) desenvolveram e otimizaram método por CLAE utilizando detector de arranjo de diodos para identificação e quantificação do lupeol em produtos intermediários de *V. ferruginea* utilizando coluna C8 e fase móvel constituída por acetonitrila e ácido acético na proporção de 99,99:0,01 (v/v), obtendo tempo de eluição para o lupeol de 17 minutos.

No presente trabalho, quando utilizada a coluna C18 também foram obtidos resultados insatisfatórios para assimetria do pico de lupeol, assim como observado por Martelanc et al. (2007) e Bedner et al. (2008). Alterações no tamanho e temperatura da coluna, inicialmente de 150 mm para 250 mm, e de 45°C para 25°C, também interferiram diretamente no tempo de retenção do lupeol, entretanto, uma melhora na assimetria do pico, separação adequada dos constituintes da formulação de nanocápsulas proposta somente foi conseguida quando utilizada coluna com fase estacionária RP-8.

Segundo Ribani e colaboradores (2004), os testes de conformidade do sistema são utilizados para verificar se a reprodutibilidade do sistema cromatográfico é adequada para o desenvolvimento do método analítico, por apresentarem valores dentro de limites aceitos e recomendados internacionalmente. Devem ser realizados antes da validação do método para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de qualidade. Quanto ao número mínimo de pratos teóricos para a validação de um método cromatográfico Ribani e colaboradores (2004) preconizam que estes devem ser de 2000, logo, os resultados obtidos para o número de pratos teóricos neste trabalho estão adequados ao preconizado. De acordo com recomendado pelo ICH e pela USP para validação de métodos cromatográficos os valores obtidos para o fator de capacidade devem ser menor que 2 e o fator de simetria deve estar entre 0.95 e 1.15. Os valores obtidos para o fator de capacidade ( $k'$ ) e fator de simetria para o pico do lupeol proposto neste trabalho também estão de acordo com o preconizado.

O método de separação cromatográfica desenvolvido foi capaz de detectar o lupeol em amostras de nanocápsulas de PLGA, não se evidenciando a coeluição de interferentes da formulação no tempo de retenção equivalente ao lupeol e demonstrou resolução de 2.29 em relação ao pico antecessor (Figura 1(3)), assegurando a quantificação do analito de interesse. Os métodos analíticos descritos na literatura para análise do lupeol relatam a capacidade dos mesmos em identificar

e quantificar o lupeol a partir de amostras de extratos da matéria prima vegetal e/ou produtos intermediários, não havendo trabalhos descritos para análise do lupeol a partir de nanocápsulas poliméricas.

Os resultados obtidos neste trabalho para o coeficiente de correlação linear e RSD do método estão de acordo com os parâmetros preconizados pelas resoluções 899 ANVISA e Q2 ICH, nos quais para ser considerado linear um método deve apresentar um coeficiente de correlação da curva (R) maior que 0,995 e RSD inferior a 5% (Brasil, 2003; ICH, 1996).

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes, sendo um importante parâmetro que possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise. A exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais, aceitos como referência (Cassiano et al., 2009). Desta forma, o método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou precisão e exatidão através da concordância das concentrações medidas. Os resultados para precisão intra-corrida, precisão intermediária e exatidão do lupeol durante o período de validação estão de acordo com os limites recomendados pela ANVISA e ICH Q2 que afirmam que a precisão pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medições, não aceitando valores superiores a 5% (Brasil, 2003; ICH, 1996). Os valores descritos nas Tabelas 1-3 foram satisfatórios, demonstrando conformidade com os limites estabelecidos.

Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação indicam uma boa sensibilidade do método para a determinação do lupeol, visto que, nas amostras de nanocápsulas analisadas a concentração do fármaco encapsulado foi de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Neste trabalho obteve-se para o limite de quantificação e detecção valores próximos aos valores demonstrados por Shah et al. (2010) em seu trabalho, que foram de 7 e 10 µg.mL<sup>-1</sup> respectivamente. Oliveira et al. (2012) obtiveram valores de 0,38 e 0,98 µg.mL<sup>-1</sup> para os limites de detecção e quantificação respectivamente, empregando detector de arranjo de diodos. Valores equivalentes a esses também foram obtidos por Shailajan et al. (2012) empregando mesma técnica.

Métodos desenvolvidos são considerados válidos quando demonstram a confiabilidade e segurança necessária em procedimentos analíticos. Em conclusão, os parâmetros avaliados neste estudo asseguram que o método desenvolvido alcançou precisão, exatidão e especificidade para a quantificação do lupeol presente em nanocápsulas de PLGA.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## ABSTRACT

*Development of analytical method for measurement of lupeol in polymeric nanocapsules by high-performance liquid chromatography (HPLC)*

**A simple, precise and accurate high-performance liquid chromatographic method has been developed for the determination of lupeol in polymeric nanocapsules. Chromatographic separation was performed on a Varian C8 column (250 mm x 4.6 mm x 5 mm) maintained at 35°C, with a mobile phase composed of acetonitrile and methanol (95:5 v/v) acidified with 0.1% acetic acid, flowing at 1.2 mL/min, with an injected sample volume of 20 µL, UV detection at 210 nm and a run time of 6.2 min. The proposed method was linear over the concentration range 10-250 µg/mL, with R<sup>2</sup> = 0.9996. Analyses of accuracy and precision showed low values of relative standard deviation (<4.2%). The methodology was specific, linear, accurate, precise and robust and proved to be adequate for the quantitative analysis of lupeol in polymeric nanocapsules.**

Keywords: Lupeol. HPLC. Nanocapsules.

## REFERÊNCIAS

Abyshev AZ, Zhurkovich IK, Agaev ÉM, Abdulla-Zade AA, Guseinov AB. Methods of standardization of the quality of betulenol parent substance and its ready-to-use medicinal forms. *Pharm Chem J.* 2006;40(1):49-53.

Amico V, Napoli EM, Renda A, Ruberto G, Spatafora C, Tringali C. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar 'Nerello Mascalese'. *Food Chem.* 2004;88(4):599-607.

Barros NB, Pimentel MF, Araújo MCU. Recomendações para Calibração em Química Analítica - Parte I. Fundamentos e Calibração com um Componente (Calibração Univariada). *Quím Nova.* 2002;25(5):856-65.

Bedner M, Schantz MM, Sander LC, Sharpless KE. Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto. *J Chromatogr A.* 2008;1192(1):74-80.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02/06/2003.

Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova.* 2009;32(4):1021-30.

Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2008; 263(1):1-13.

- CODEX, Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling: Criteria for evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex puporses, CX/MAS 95/3, 1995.
- European Commission. Guidance Document on Residue Analytical Methods, SANCO/825/00, 2000.
- Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JPH, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 1989;55(1):1-4.
- Geetha T, Varalakshmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):77-80.
- ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A Text on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, March Geneva; 1996.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre validação de Métodos e Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- Kpoviéssi DSS, Gbaguidi F, Gbénou J, Accrombessi G, Moudachirou M, Rozet E, Hubert P, Quetin-Leclercq J. Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders by capillary gas chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(4):1127-35.
- Kweifio-Okai G, Field B, Rumble BA, Macrides TA, De Munk F. Esterification improves the antiarthritic effectiveness of lupeol. *Drug Dev Res.* 1995;35(3):137-41.
- Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM. *Alhagi maurorum*: A convenient source of lupeol. *Ind Crops Prod.* 2011;34(1):1141-45.
- Martelanc M, Vovk I, Simonovska B. Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.* 2007;1164(1-2): 145-52.
- Mathe C, Culioli G, Archier P, Vieillescazes C. High-performance liquid chromatographic analysis of triterpenoids in commercial Frankincense. *Chromatographia.* 2004;60(9-10):493-9.
- Oliveira EMS, Freitas SL, Martins FS, Couto RO, Pinto MV, Paula JR, Conceição EC, Bara MTF. Isolation and quantitative hplc-pda analysis of lupeol in phytopharmaceutical intermediate products from *Vernonanthura ferruginea* (less.) h. rob. *Quím Nova.* 2012; 35(5):1041-5.
- Paul M, Bruning G, Weihrather J, Jauch J. Qualitative and Quantitative Analysis of 17 Types of Tetra- and Pentacyclic Triterpenic Acids in *Boswellia papyrifera* by a Semi-Automatic Homomodal 2D HPLC method. *Chromatographia.* 2011;74(1):29.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Quím Nova.* 2004;27(5):771-80.
- Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* 2009;285(2):109–15.
- Shah W, Kekare M.B, Vaidya V. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and lupeol in *Vernonia cinerea* Linn. *Int J Pharm and Bio Sciences.* 2010;1(3):1-5.
- Shailajan S, Menon S, Sayed N, Tiwari B. Simultaneous estimation of three triterpenoids from *Carissa carandas*, using validated high performance liquid chromatography. *Int J Green Pharm.* 2012;6 (3):241-7.
- Siddique HR, Saleem M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Sci.* 2011;88(7-8):285-93.
- Sunitha S, Nagaraj M, Varalakshmi P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia.* 2001;72(5):516-23.
- United States Food and Drug Administration (US-FDA). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods (ICH Q2), 1994. Disponível em <http://www.fda.gov/cder>, 2010.
- USP, United States Pharmacopeia Conventio US Pharmacopeia 30, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville; 2007.
- WHO, World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report, WHO Technical Report Series, Geneva. 1992. n.823.

Recebido em 27 de junho de 2013.

Aceito em 10 de setembro de 2013.