

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE NEROLIDOL EM UM DISPOSITIVO POLIMÉRICO DE LIBERAÇÃO PROLONGADA, APÓS DERIVATIZAÇÃO COM VÂNILINA

Tatiana Gomes Ribeiro<sup>1</sup>, Juçara Ribeiro Franca<sup>1</sup>, André Mesquita Marques<sup>2</sup>, Maria Auxiliadora Coelho Kaplan<sup>2</sup>, André Augusto Gomes Faraco<sup>1</sup> e Rachel Oliveira Castilho<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UFMG - Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

<sup>2</sup>UFRJ - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bloco H, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

This work describes the development and validation of analytical method to assay nerolidol in a hydrophilic matrix of chitosan by UV/visible spectroscopy. The method is based on the formation of purple derivative between nerolidol and vanillin. The validated method was linear (2.5 - 50 mg mL<sup>-1</sup> concentration range,  $r > 0.99$ ), precise (RSD 0.44% for repeatability and 0.32% for intermediate precision), accurate (100.04% recovery), robust and specific. Detection and quantitation limits were 0.74 mg mL<sup>-1</sup> and 2.26 mg mL<sup>-1</sup>, respectively. The method is simple and fast and it was applied successfully. Alternatively, the described method may be applied for the analysis of alcohols and unsaturated lipids.

Keywords: nerolidol; chitosan; spectrometric method for alcohols and lipids.

### INTRODUÇÃO

O nerolidol é um sesquiterpeno acíclico (Figura 1) de origem natural encontrado em muitos óleos voláteis de plantas como *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (capim-limão), *Lavandula officinalis* Chaix (alfazema) e *Jasminum* sp. (jasmim).<sup>1</sup> É um óleo amarelo claro com aroma de flores com reminiscências de rosa e maçã. É utilizado em perfumes, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos não cosméticos de limpeza, com um consumo mundial de 10-100 toneladas/ano.<sup>2</sup> O nerolidol possui atividade antiúlcera, antimicrobiana, anticancerígena e tem atividade biocida para diferentes patógenos, inclusive protozoários.<sup>3-7</sup> Além disso, é utilizado como agente promotor de absorção de fármacos na pele, como por exemplo anti-inflamatórios como os corticosteróides e o dicofenaco de sódio e de anti-hipertensivos como o hidrocloridrato de verapamil.<sup>8</sup>

A utilização do nerolidol como fármaco no tratamento da leishmaniose foi recentemente estudada.<sup>9</sup> A dificuldade relacionada a toxicidade da maioria

dos fármacos disponíveis no arsenal terapêutico para o tratamento dessa doença estimulam o desenvolvimento de novas formas de administração de medicamentos que facilitem a adesão ao tratamento dessa doença, bem como promovam uma menor toxicidade dos mesmos. A volatilidade e a baixa hidrossolubilidade dessa substância estimulam o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada deste ativo na forma de sistemas matriciais poliméricos.

Um polímero bastante utilizado na literatura científica para veiculação de fármacos é a quitosana.<sup>10</sup> Esta substância é a forma desacetilada da quitina, que é o segundo polímero mais abundante na natureza, por isso é uma fonte renovável e de baixo custo, tendo grande importância econômica e ambiental.<sup>11</sup> É um polímero atóxico, biocompatível e biodegradável, características desejáveis e necessárias para veiculação de fármacos, sendo utilizada em diversas formulações farmacêuticas como pós, comprimidos, emulsões e géis, além de ser utilizado em imobilizações enzimáticas.<sup>12-14</sup>

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu formulações na forma de filmes, utilizando a quitosana como

matriz polimérica, para veicular esse princípio ativo e realizar testes de atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*.

A forma farmacêutica de filmes contendo nerolidol não se encontra inscrita, até o presente momento, nos compêndios oficiais, não havendo inclusive métodos de quantificação na literatura desse princípio ativo em formulações. Há descrições da análise do nerolidol em diversos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG/MS)<sup>15,16</sup> e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).<sup>17</sup>

A cromatografia gasosa (detecção por ionização de chama) e a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas são as técnicas mais indicadas para análises quantitativas e qualitativas de substâncias lipofílicas, como os óleos voláteis e seus constituintes isoladamente.<sup>18,19</sup> Trabalhos recentes demonstram análise de óleos essenciais por CLAE e detecção em arranjo de diodos (DAD).<sup>17,20</sup> Esses métodos são sensíveis o suficiente para a determinação de pequenas quantidades de amostra, entretanto, muitas vezes, não são simples, rápidos e de baixo custo para serem adotados em análises de rotina.

Tendo em vista o grande número de métodos espectrofotométricos no UV/visível utilizados, devido à simplicidade, economia, precisão, robustez e rapidez dessa técnica,<sup>21</sup> o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria no UV/visível, baseado nas reações de Komarowsky<sup>22</sup> e da sulfo-fosfo-vanilina,<sup>23,24</sup> para quantificação do nerolidol em filmes poliméricos de quitosana de liberação prolongada, aplicando-o para os ensaios de liberação *in vitro* das formulações desenvolvidas. Além disso, esse método tem potencialidade de aplicação na análise de álcoois e lipídeos não saturados.

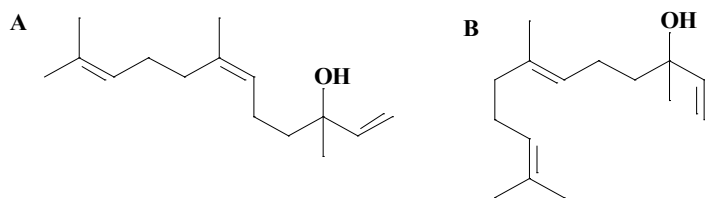


Figura 1

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes

A formulação utilizada foi um dispositivo polimérico de liberação prolongada, cuja matriz hidrofílica é a quitosana e o fármaco é o nerolidol (mistura *cis-trans*, grau de pureza 98%) ambos da Sigma-Aldrich®. Para o estudo dos interferentes foram empregados os excipientes talco, amido e quitosana, os quais foram utilizados para a produção do dispositivo polimérico. A solução tampão foi produzida através de uma mistura dos reagentes difosfato e monofosfato de sódio em água destilada com um pH 7,4, sendo denominado doravante tampão PBS. Todos os reagentes utilizados foram de grau P.A.

### Equipamentos

As medidas espectrométricas foram realizadas no espectrômetro UV/visível Shimadzu, modelo 160 A, fabricado no Japão. Para o estudo da robustez e da precisão intermediária foi utilizado o espectrômetro Hitachi, modelo UV-2900. Para a agitação das amostras foi utilizado o aparelho de Ultrassom Unique, modelo Ultra Cleaner. Para o aquecimento das amostras foi utilizado o banho Maria Fanem. As massas foram medidas em balança digital analítica Sartorius, modelo BP 2215 e os volumes em pipetas automáticas calibradas HTL.

### Desenvolvimento do método

#### Preparo do reagente

Foram adicionados 5 mg de vanilina em 1 mL de ácido sulfúrico 96%. O reagente foi armazenado em frasco âmbar.

#### Estabilidade do reagente

Para a avaliação do tempo de estabilidade do reagente, foram preparados 250 mL da solução reagen-te. O reagente previamente preparado (1 mL) foi adicionado a 1 mL da solução de nerolidol (25,0 mg mL<sup>-1</sup>) em tampão PBS. A mistura foi agitada e submetida a aquecimento de 50 °C por 10 min em banho maria. A medida de absorção no espectrofotômetro foi realizada imediatamente em 542 nm. O branco foi feito, empregando-se 1 mL de tampão PBS com 1 mL do reagente, seguindo-se o mesmo procedimento da solução amostra. Repetiu-se esse procedimento de dez em dez minutos durante quatro horas.

### Validação do método

O método analítico foi validado de acordo com as especificações recomendadas pela Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Anvisa<sup>25</sup> e pelo Guia ICH Q2B.<sup>26</sup> Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intra-corrida (repetibilidade), precisão inter-corrida (intermediária), exatidão e robustez.

#### Preparo da solução de trabalho

Foram pipetados, exatamente, 29,15 mL de nerolidol para balão volumétrico de 250 mL e foram adicionados 230 mL de tampão PBS. Submeteu-se ao ultrassom por dez minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente, obtendo-se solução a 100 mg mL<sup>-1</sup>. A partir dessa solução foram preparadas amostras com diferentes concentrações.

#### Preparo da solução amostra

O preparo da solução amostra foi feito através da adição da solução de trabalho do nerolidol de concentração conhecida em tampão PBS a uma formulação placebo. Foi adicionado o reagente na proporção de 1:1. A mistura foi agitada e submetida a aquecimento de 50 °C por 10 min em banho maria. Foi realizada imediatamente a medida de absorção no espectrofotômetro no comprimento de onda de 542 nm. O branco foi feito, empregando-se a formulação placebo, sem o nerolidol, com o reagente, seguindo-se o mesmo procedimento da solução amostra.

#### Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através de análises comparativas entre as formulações sem nerolidol (placebo) e as contendo nerolidol. Adicionou-se a cada formulação 1 mL do reagente, seguido de 1 mL do tampão. A mistura foi agitada e submetida a aquecimento de 50 °C por 10 min em banho maria. Foi realizada a medida de absorção no espectrofotômetro em 542 nm. Espectros de absorção na região UV/visível foram traçados na faixa de 1 200 a 900 nm.

#### Linearidade

Foi verificada através da construção de uma curva analítica de calibração em quintuplicata, contem-

plando concentrações de 2,5; 5; 10; 15; 25; 50 mg mL<sup>-1</sup>. Foi adicionado a solução de nerolidol em tampão PBS a ser quantificada, 1 mL da solução reagente. A mistura foi agitada e submetida a aquecimento de 50 °C por 10 min em banho maria. Foi realizada a medida de absorção no espectrofotômetro em 542 nm. O branco foi feito, empregando-se 1 mL de tampão PBS com 1 mL do reagente, seguindo-se o mesmo procedimento da solução amostra. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear. Foram feitas duas curvas analíticas em dias diferentes.

#### Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Foram calculados a partir do desvio padrão do intercepto de b (d) e do coeficiente angular (s) da curva analítica de calibração,<sup>26</sup> através das equações 1 e 2, respectivamente:

$$LD = \frac{3,3}{S} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10}{S} \quad (2)$$

#### Precisão

A precisão intra-ensaio (repetibilidade) foi avaliada através da análise de seis soluções de amostra (25 mg mL<sup>-1</sup>) no mesmo dia e com o mesmo analista. A precisão intermediária foi determinada pela análise de seis medidas de soluções na mesma concentração (25 mg mL<sup>-1</sup>) em dias diferentes e em equipamento diferente, e então feita à análise estatística (DPR) dos resultados obtidos nos dois dias (n = 12).

#### Exatidão

Esse parâmetro foi determinado por intermédio da adição da solução padrão de nerolidol a uma mistura dos componentes da formulação. Quantidades conhecidas do padrão nerolidol foram adicionadas ao dispositivo polimérico placebo, de modo a obter soluções com as concentrações baixa, média e alta: 17,5; 25 e 32,5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho, com 3 réplicas cada. Posteriormente o reagente foi adicionado. A mistura foi agitada e submetida a aquecimento (50 °C) por 10 min em banho maria. Foi realizada a medida da leitura de absorção no

espectrofotômetro em 1 542 nm. O branco foi feito empregando-se a formulação placebo sem o nerolidol, seguindo-se o mesmo procedimento da solução amostra.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

(3)

### Robustez

As condições analíticas deliberadamente variadas para avaliação da robustez foram: variação da temperatura de aquecimento da reação (49 °C, 50 °C e 51 °C), variação do pH da solução de nerolidol (pH 7,3; 7,4 e 7,5) e equipamentos diferentes (Shimadzu e Hitachi).<sup>25</sup> A concentração do padrão de trabalho de nerolidol utilizada foi de 25 mg mL<sup>-1</sup> e cada condição foi avaliada com um n = 6.

### Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA, com resultados considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% (p < 0,05), teste t de Student e teste de Tukey com nível de significância  $\alpha = 0,05$ . Os outliers, no estudo de estabilidade do reagente, foram analisados através de boxplot com ajuda do programa Minitab.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desenvolvimento e otimização do método

O nerolidol é um álcool terciário, volátil, com cadeia carbônica de quinze átomos e três insaturações não conjugadas (Figura 1). Explorando-se essas características químicas buscou-se um método para quantificar o nerolidol em baixas concentrações de forma rápida, simples, precisa, e barata e para isso propôs-se um método espectrofotométrico no UV/visível utilizando a derivatização do nerolidol com a vanilina em meio ácido.

Foram feitas também duas propostas mecanísticas para explicar as bases químicas do novo método. Na primeira proposta (Figura 2) a reação pode ser esquematizada em três passos: (a) protonação do grupo aldeído da vanilina (substância 2); (b) ataque nucleofí-

co da hidroxila do nerolidol no carbono carbonílico da vanilina (substância 4); (c) prototropismo, seguido da perda de água, dando origem a substância (6) estabilizada por ressonância e com absorção em torno de 1 542 nm. Uma proposta alternativa que explicaria o fenômeno químico é baseada na reação de Knight<sup>24</sup> em que uma sequência de dois passos são fundamentais (Figura 3): (a) adição eletrofílica do próton, proveniente do meio ácido, na ligação dupla do nerolidol, formando um carbocátion (substância 7); (b) reação do carbocátion com a vanilina, dando origem a substância (6).

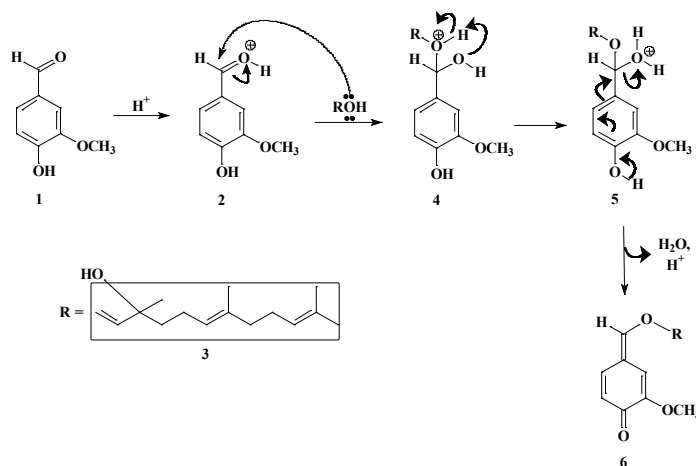


Figura 2

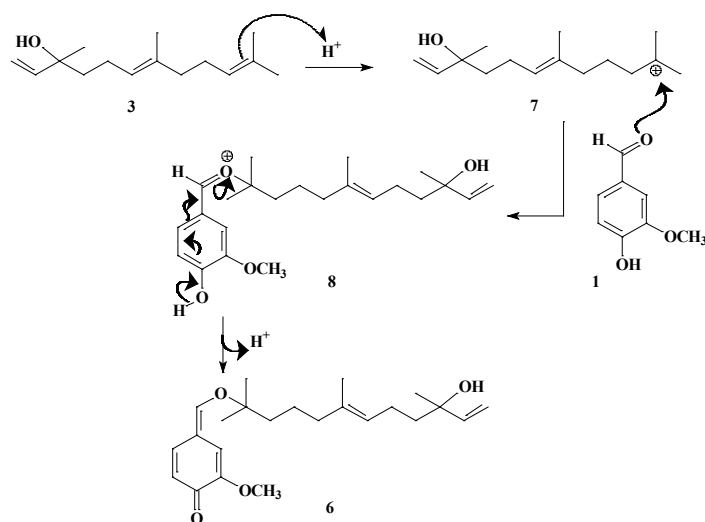


Figura 3

No desenvolvimento do método foram avaliadas várias proporções dos reagentes, uma mistura de vanilina e ácido sulfúrico, e o nerolidol, obtendo-se uma proporção de 1:1 de reagente e solução aquosa do nerolidol. Além disso, avaliou-se também diferentes temperaturas de aquecimento, concluindo-se que a melhor para que a reação de derivatização ocorresse de forma

rápida e que o nerolidol, uma substância volátil, não fosse perdido era um aquecimento a 50 °C por 10 min.

Após o desenvolvimento do método, buscou-se validá-lo, a fim de que o novo método estivesse adequado aos ensaios propostos. Para isso, utilizou-se como formulação modelo o nerolidol em um dispositivo polimérico cuja matriz polimérica é a quitosana (matriz hidrofílica).

#### *Estabilidade do reagente*

A estabilidade do reagente foi avaliada durante 4 horas com leituras sequenciais de dez em dez minutos. Analisou-se os resultados nesse intervalo de tempo através de boxplott do programa Minitab e não se observou outlier. Esse fato demonstrou a estabilidade no intervalo de tempo de 4 horas do reagente proposto.

#### *Validação do método*

Para a especificidade espectros de absorção na região UV/visível da solução amostra de nerolidol (25,0 mg mL<sup>-1</sup>; 100% da concentração de trabalho) e da formulação placebo, em tampão PBS, foram traçados na faixa de 1 200 a 900 nm. Os espectros de absorção obtidos demonstraram que os excipientes presentes na formulação não apresentam absorvidade em 1 542 nm ( $\leq 0,001A$ ), sendo o método específico para o doseamento do nerolidol nesse comprimento de onda.

Para a linearidade foram feitas curvas de calibração em dias diferente. As equações da reta, calculadas por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, podem ser visualizadas na Tabela 1. Os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99. Os resultados da análise estatística indicam ajuste adequado dos dados aos modelos de regressão linear, sendo método linear na faixa de concentração de 2,5 - 50 mg mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Dados referentes à linearidade para o método de doseamento do nerolidol em tampão PBS pH = 7,4 por espectrofotometria no visível

Parâmetros	1° Dia	2° Dia
Faixa de linearidade	2,5 - 50 µg mL <sup>-1</sup>	2,5 - 50 µg mL <sup>-1</sup>
Equação: ax + b	y = 0,0086x + 0,0098	y = 0,00895x + 0,00983
Absorv. = a.conc.-b		
Intercepto (b) ± DP	0,0098 ± 0,00219	0,00983 ± 0,00202
Inclinação (a) ± DP	0,0086 ± 9,11104E-5	0,00895 ± 8,37922E-5
Coefficiente de correlação	0,99843	0,99878
Desvio padrão da curva	0,00803	0,00739
Valor de p	<0.0001	<0.0001

O método demonstrou ser sensível a baixas concentrações, tendo como valor de limite de detecção 0,74 mg mL<sup>-1</sup> e limite de quantificação 2,26 mg mL<sup>-1</sup>.

Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária foram expressos em termos de desvio padrão relativos (DPR) (Tabela 2). Neste ensaio foram utilizadas seis determinações a 100% da concentração de trabalho e observada à diferença entre as repetições. A repetibilidade e a precisão intermediária apresentam DPR de 0,44 e 0,32, respectivamente. Os valores obtidos são inferiores a 5%, limite máximo aceito para esse parâmetro.<sup>25</sup> A análise ANOVA demonstrou que não há diferenças estatísticas entre as análises dos diferentes períodos para p = 0,05. Esses resultados de doseamento de nerolidol obtidos com o método proposto apresentam elevado grau de concordância.

**Tabela 2.** Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o método de doseamento do nerolidol em tampão PBS pH = 7,4 por espectrofotometria

	Concentração (µg mL <sup>-1</sup> )	Média ± DPR (%) (n=6) (µg mL <sup>-1</sup> )
1° Dia	24,36	24,20 ± 0,44
	24,20	
	24,13	
	24,24	
	24,23	
	24,05	
2° Dia	24,16	24,16 ± 0,32
	24,28	
	24,04	
	24,16	
	24,19	
	24,13	
Média ± DPR (%) (n = 12)		24,18 ± 0,38

A porcentagem média para a exatidão foi de 100,04% e o DPR de 0,65% (Tabela 3). Através do teste t de Student, pode-se afirmar que o valor encontrado é estatisticamente igual a 100% com significância de p = 0,05. Além disso, esse resultado demonstra que não há interferências dos excipientes da forma farmacêutica no doseamento do produto final. Portanto, o método é exato.

A avaliação da robustez de um método per-

mite identificar parâmetros críticos do procedimento analítico que possam influenciar negativamente na sua exatidão e precisão. Uma vez identificados, esses parâmetros devem ser controlados e precauções devem ser incluídas no procedimento analítico.

**Tabela 3.** Resultados da exatidão para o método de doseamento do nerolidol em tampão PBS pH = 7,4 por espectrofotometria no visível

Concentração teórica	Concentração experimental ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Exatidão (%)
17,5	17,4540	99,74
	17,4655	99,80
	17,4425	99,67
25	25,2931	101,17
	25,0747	100,30
	25,2586	101,03
37,5	37,3391	99,57
	37,3276	99,54
	37,3161	99,51
Média $\pm$ DPR		100,04 $\pm$ 0,65

Foram avaliadas pequenas e deliberadas variações na metodologia analítica: temperatura de aquecimento da reação, pH do PBS utilizado para dissolução da formulação com nerolidol e leituras de absorbância em diferentes equipamentos. Os dados experimentais obtidos indicaram que estas modificações não influenciaram significativamente os resultados (Tabela 4). Os dados ajustaram-se adequadamente ao modelo ANOVA, teste de Tukey, com significância de  $p = 0,05$ . A partir dos resultados, verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os resultados do doseamento obtido em cada uma das condições avaliadas.

**Tabela 4.** Resultados da robustez para o método de doseamento do nerolidol em tampão PBS pH = 7,4 por espectrofotometria no visível

Parâmetros variados	Concentração média* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) $\pm$ DPR (%)	
Temperatura	49 °C	24,26 $\pm$ 0,69
	50 °C	24,04 $\pm$ 1,42
	51 °C	24,23 $\pm$ 0,87
pH do tampão	7,3	23,97 $\pm$ 0,87
	7,4	24,03 $\pm$ 0,98
	7,5	24,27 $\pm$ 0,85
Equipamento	Shimadzu	24,36 $\pm$ 0,83
	Hitachi	24,07 $\pm$ 2,42

\*(n=6)

## CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível desenvolver um método espectrofotométrico na região do UV/visível para o doseamento do nerolidol em uma matriz hidrofílica de quitosana por derivatização do fármaco com a vanilina em meio ácido.

O método desenvolvido mostrou-se simples, preciso, rápido e sensível a baixas concentrações. A validação comprovou que método é seletivo e robusto com relação à mudança de temperatura, pH e equipamento, podendo ser utilizado no controle de qualidade dessa formulação e de outras formulações que usem como fármaco o nerolidol. Alternativamente, o método descrito pode ser aplicado à análise de álcoois ou lipídeos não saturados.

## AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Dewick M. P., *Medicinal Natural Products – a Biosynthetic Approach*, John

- Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2009.
2. D. McGinty, C. S. Letizia, A. M., *Food Chem. Toxicol.* 48, (2010) S43.
  3. F. C. Klopell, M. Lemos, J. P. Sousa, E. Comunello, E. L. Maistro, J. K. Bastos, S. F. de Andrade, *Z. Naturforsch.* 62, (2007) 537.
  4. S. Lee, J. Han, G. Lee, M. Park, I. Choi, K. Na, E. Jeung, *Model. Biol. Pharm. Bull.* 30, (2007) 184.
  5. L. W. Wattenberg, *Carcinogenesis* 12, (1991) 151.
  6. C. S. de Macedo, M. L. Uhrig, E. A. Kimura, A. M. Katzin, *FEMS Microbiol. Lett.* 207, (2002) 13.
  7. G. H. Rodrigues, E. A. Kimura, V. J. Peres, A. S. Couto, D. F. A. Aquino, A. M. Katzin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, (2004) 2502.
  8. K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y. N. Kalia, R. H. Guy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, (2001) 103.
  9. D. C. Arruda, F. L. D'Alexandri, A. M. Katzin, S. R. B. Uliana, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, (2005) 1679.
  10. M. Amidi, W. E. Hennink, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, (2010) 1.
  11. M. C. M. Laranjeira, V. T. de Fávère, *Quim. Nova* 32, (2005) 672.
  12. A. Giannantoni, S. M. Di Stasi, M. B. Chancellor, E. Costantini, M. Porena, *Eur. Urol.* 50, (2006) 1183.
  13. C. Valenta, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, (2005) 1692.
  14. A. A. Mendes, P. C. de Oliveira, H. F. de Castro, L. R. Giordano, *Quim. Nova* 34, (2011) 831.
  15. A. Rahman, S. C. Kang, *Food Chem.* 116, (2009) 670.
  16. R. Sergio, B. Maurizio, A. Maggio, R. A. Raccuglia, B. Svetlana, F. Senatore, C. Formisano, *Biochem. Syst. Ecol.* 37, (2009) 426.
  17. W. Huang, J. Yanga, J. Zhao, C.-Z. Wang, C.-S. Yuan, S.-P. Li, *Pharm. Biomed. Anal.* 53, (2010) 906.
  18. H. G. Castro, L. O. Oliveira, L. C. A. Barbosa, F. A. Ferreira, D. J. H. Silva, P. R. Mosquim, E. A. Nascimento, *Quim. Nova* 27, (2004) 55.
  19. R. O. Castilho, M. A. C. Kaplan, *Rec. Nat. Prod.* 4, (2010) 31.
  20. C. Turek, F. C. Stintzing, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, (2011) 3109.
  21. R. B. Friedrich, A. Ravello, L. C. Cichota, C. M. B. Rolim, R. C. R. Beck, *Quim. Nova* 32, (2009) 1052.
  22. A. Komarovskiy, *Chemiker-Zeitung.* 27, (1903) 807.
  23. M. R. F. Ashworth, I. Venn, *Anal. Chim. Acta.* 49, (1970) 535.
  24. J. A. Knight, S. Anderson, J. M. Rawle, *Clin. Chem.* 18, (1972) 199.
  25. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
  26. ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human Use: Q2B – validation of analytical procedures: text and methodology, 1996.