

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE-IR PARA DETERMINAÇÃO DE ARTEMISININA EM *Artemisia annua* L.

Renata Maria dos Santos Celeghini\*

Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Ilza Maria de Oliveira Sousa, Ana Paula da Silva, Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues e Mary Ann Foglio

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas, CP 6171, 13081-970 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 19/3/08; aceito em 24/11/08; publicado na web em 6/3/09

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY BY HPLC-IR FOR EVALUATION OF ARTEMISININ ON *Artemisia annua* L. The aim of this work was to develop and validate an analytical methodology for determination of artemisinin used as antimalaric. The method was based on high performance liquid chromatography, using a CN column with mobile phase composed of methanol : H<sub>2</sub>O 50:50 (V/V). The results showed that the method presented linearity from 50 to 1500 µg/mL. It was considered selective, accurate, precise according to the specific resolution from ANVISA, the Brazilian regulatory agency.

Keywords: *Artemisia annua* L.; clean-up; liquid chromatographic.

### INTRODUÇÃO

A *Artemisia annua* L. (Asteraceae) é originária de regiões de clima temperado da Ásia e tem sido utilizada pela medicina tradicional chinesa há vários séculos no tratamento de malária. Pesquisadores chineses estudaram mais de 30 espécies do gênero *Artemisia* para confirmar a atividade antimalárica das mesmas. Somente *A. annua* e *A. apiacea* Hance foram eficazes em combater o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, agentes etimológicos da malária.<sup>1</sup> Entre os metabólitos secundários isolados das diversas espécies do gênero *Artemisia* os mais característicos são as lactonas sesquiterpênicas.<sup>2</sup>

A artemisinina (qinghaosu) (Figura 1), lactona sesquiterpênica, apresenta um grupo endoperóxido na molécula, que demonstrou ser essencial para a atividade esquizotônica e possui fundamental importância no tratamento de formas de malária resistente à terapia convencional com drogas, como cloroquina e mefloquina.<sup>3</sup> A partir da artemisinina, já foram obtidos outros derivados semi-sintéticos com maior potência antimalárica, como o artesunato e o arteméter.<sup>4</sup>

Cerca de 40% da população mundial apresenta risco significativo de contrair a malária. Anualmente, cerca de 250 milhões de pessoas contraem a doença e mais de 1,5 milhões delas, sendo a maioria composta por crianças africanas, morrem vítimas desta doença. Em pacientes com malária grave e complicada, a mortalidade atinge entre 20 e 50% dos casos.<sup>5</sup> No Brasil, de acordo com o Anuário Estatístico de Saúde, editado pelo Ministério da Saúde, dentre as doenças de notificação compulsória, a malária atingiu em 1998, 1999 e 2000, valores de incidência bastante elevados, com 471.892, 637.472 e 615.245 casos notificados, respectivamente, tornando-se, portanto, aquela de maior incidência, seguida pela dengue.<sup>6</sup>

A malária atualmente ainda atinge mais de 500 milhões de pessoas levando a óbito acima de 1 milhão de vítimas anualmente.<sup>7</sup> Apesar destes números, Snow *et al.*<sup>8</sup> citam que o número de casos é 50% maior que os dados oficiais divulgados pela OMS.

Considerando que o teor médio de artemisinina da *A. annua* L., alcançado na espécie híbrida adaptada no CPQBA,<sup>9</sup> é de aproximadamente

1,2% sobre o peso seco da folha, aliado à informação que o gênero *Artemisia* (Asteraceae) possui lactonas sesquiterpênicas com diversas atividades biológicas, foi estudado o aproveitamento do resíduo de extração da artemisinina. Constatou-se que o resíduo gerado no processo de extração da artemisinina apresentava atividade antiulcerogênica, provavelmente devido à presença de lactonas sesquiterpênicas, deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartemenuína b (Figura 1), que parecem aumentar o conteúdo de prostaglandinas na mucosa gástrica.<sup>10,11</sup> Para viabilizar o controle de qualidade do processo descrito acima percebemos a necessidade de uma metodologia de controle de qualidade que permitisse monitorar o princípio ativo antimalárico simultaneamente com as lactonas sesquiterpênicas, deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartemenuína b, contidas no extrato bruto. Diante da semelhança da estrutura química dos compostos 1 e 2 (Figura 1), com exceção do grupo endoperóxido, propusemos determinar uma metodologia rápida e eficiente capaz de monitorar a artemisinina e no futuro, quando estiverem disponíveis padrões analíticos de alta pureza, as outras duas lactonas presentes na planta.

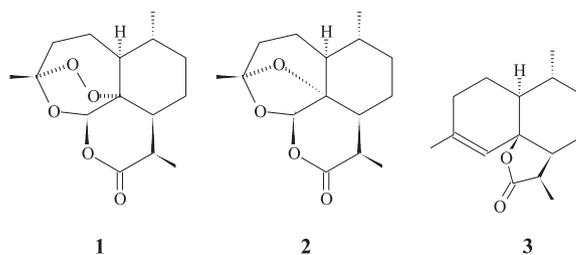


Figura 1. Estrutura das lactonas sesquiterpênicas artemisinina 1, deoxiartemisinina 2 e di-hidroepideoxiartemenuína b 3

A cromatografia líquida de alta eficiência CLAE tem sido amplamente empregada para quantificar a artemisinina e os compostos análogos, utilizando-se vários métodos de detecção. Zhao e Zeng<sup>12</sup> e Qian *et al.*,<sup>13</sup> utilizaram a técnica de derivatização pré-coluna para converter a artemisinina em um composto com absorção no UV, aumentando o coeficiente de excitação para comprimentos de onda mais altos. Green *et al.*<sup>14</sup> utilizaram o detector de quimioluminescência,

\*e-mail: celeghin@fea.unicamp.br

determinando o limite de detecção de 2,5 ng; entretanto, a resposta do detector diminuiu muito para os derivados da artemisinina.

Vários autores utilizaram o detector eletroquímico para quantificar a artemisinina com boa sensibilidade e limites de detecção entre 1-10 ng. A utilização do detector eletroquímico requer que a detecção do analito ocorra em ausência de oxigênio; para isto, a fase móvel deve ser rigorosamente desoxigenada antes e durante a análise. O instrumento também deve ser mantido em condição completamente livre de oxigênio em todas as linhas e junções.<sup>15</sup>

Avery *et al.*<sup>16</sup> analisaram e quantificaram a artemisinina e seus derivados utilizando a cromatografia líquida com detecção de espalhamento de luz, com limite de detecção para os compostos na faixa entre 6 e 60 ng.

Maillard *et al.*<sup>17</sup> foram os primeiros a analisarem artemisinina em amostras de *A. annua* com cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas *termospray*. Sahai *et al.*<sup>18</sup> utilizaram a técnica CLAE-MS com o monitoramento do íon seletivo (SIM) e obtiveram ótimos resultados nas análises de artemisinina. Wang *et al.*<sup>19</sup> modificaram a metodologia desenvolvida por Sahai *et al.*<sup>18</sup> e aplicaram nas análises de quantificação de artemisinina em extratos de *A. annua* com resultados rápidos e sensíveis.

Outros métodos aplicados no estudo para quantificação da artemisinina foram cromatografia líquida capilar, cromatografia com fluido supercrítico,<sup>20</sup> cromatografia em camada delgada,<sup>21</sup> voltametria cíclica<sup>22</sup> e eletroforese capilar.<sup>23</sup> A maioria dos artigos contempla análises apenas com padrões e as referências que descrevem a utilização de extratos não levaram em consideração o número de etapas envolvidas no processo de limpeza e a recuperação do analito durante as extrações.

A etapa de limpeza é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz presentes no extrato, que podem interferir no método analítico a ser manipulado. No caso de análises cromatográficas, além de evitar a interferência de contaminantes da matriz que possam co-eluir com o analito de interesse, a remoção de interferentes em geral é importante para garantir a longevidade das colunas analíticas.<sup>24</sup>

Rehder *et al.*<sup>25</sup> desenvolveram uma metodologia de análise por CLAE com detector de índice de refração para dosagem de artemisinina em folhas de *Artemisia annua* L., sem considerar a interferência da deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartenuína b. Nestas condições de análise não é possível identificar os interferentes citados acima, pois podem co-eluir com a artemisinina, ocasionando aumento do seu teor.

Em trabalho anterior descrevemos uma metodologia de limpeza e separação de amostras provenientes de folhas secas de *A. annua*.<sup>26</sup> As condições de análise utilizadas possibilitaram a separação da artemisinina das demais lactonas sesquiterpênicas, contemplando a substituição dos solventes da fase móvel acetônitrila por metanol e substituição do sistema de tampão fosfato por água.<sup>25</sup>

O objetivo deste trabalho foi validar a metodologia analítica para quantificação de artemisinina em extratos de *A. annua* sem submeter as amostras a modificações químicas, possibilitando estudos posteriores de estabilidade do princípio ativo nos extratos brutos. Optou-se por utilizar o detector de índice de refração por ser universal e possibilitar o monitoramento simultâneo de compostos interferentes como a deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartenuína b, sem necessitar da etapa de derivatização.

Nos últimos anos tem crescido a necessidade de demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos dados analíticos, sendo cada vez mais exigida a validação de métodos analíticos.<sup>27</sup> No Brasil, a ANVISA<sup>28</sup> (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2003, baseada no Q2B da ICH,<sup>29</sup> publicou a Resolução RE nº899 que estabelece parâmetros para validação de métodos bioanalíticos aplicáveis a produtos farmacêuticos. Com o objetivo de assegurar a confiabilidade dos resultados

obtidos, validou-se a metodologia analítica de quantificação de artemisinina em amostras da espécie *Artemisia annua* L.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material vegetal

Foram utilizadas as partes aéreas da espécie vegetal *Artemisia annua* L. híbrido Ch x Viet 55, cultivada no campo experimental do CPQBA/UNICAMP com *voucher* Híbrido CPQBA 2/39xPL5. As coletas foram no período em que foi observado o início de florescimento, (aproximadamente de 16-20 semanas após plantio em campo), quando se observou um pico máximo na produção de artemisinina.<sup>2</sup>

O material vegetal foi seco a 40 °C em estufa com ventilação forçada durante 24 h, moído e armazenado em freezer.

### Reagentes

Os solventes utilizados para as extrações e limpeza das amostras foram grau analítico (Synth, São Paulo, Brasil). Para as análises cromatográficas utilizou-se: padrão de artemisinina (99%, Sigma, Missouri, USA), solventes grau CLAE (Mallincrodt, Kentucky, USA) e água purificada em sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Para a extração em fase sólida utilizaram-se cartuchos Strata FL-PR Florisil (170 µm, 80 Å) (Phenomenex, California, USA).

### Equipamento e condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo líquido Waters (Massachusetts, USA), bomba Waters 515, válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema foi acoplado a um detector de índice de refração Waters 2414; temperatura interna do detector 35 °C; temperatura da coluna 35 °C. Os dados cromatográficos foram analisados usando-se software do equipamento Empower-Waters. Utilizou-se coluna com fase estacionária ciano, Luna CN 5 µm 250 x 4,6 mm (Phenomenex, California, USA); fase móvel metanol:água (50:50 v/v); modo isocrático e vazão 1,0 mL/min.

### Extração

Os extratos foram obtidos a partir de 0,500 g de folhas secas e moídas com 3 extrações com 5 mL de metanol, em Ultra Turrax (Quimis, São Paulo, Brasil), por 3 min, 10.000 rpm à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de placa porosa e evaporado à secura sob vácuo em evaporador rotativo (Büchi, Flawil, Switzerland).

### EFS-limpeza<sup>26</sup>

Os cartuchos de Florisil® (Strata 8B-SO13-HCH, Phenomenex, California, USA), foram conectados ao sistema de extração a vácuo (Manifold) (J. T. Baker, New Jersey, USA) condicionados com 10 mL de hexano; em seguida introduziu-se o extrato dissolvido em 2 mL de diclorometano, eluindo com 3 mL de hexano e 60 mL de diclorometano, coletando-se as frações separadamente. A fração de diclorometano foi evaporada à secura, sob vácuo em evaporador rotativo e ressuspensa em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE. As amostras foram filtradas (membranas Durepore PVDF 0,45 µm, Millipore) e analisadas em triplicata por CLAE/IR.

### Validação do método

O método foi validado de acordo com a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA.<sup>28</sup>

### Verificação de interferentes

Foi realizado todo o processo de extração e limpeza sem a presença da amostra ou padrão, para se observar a presença de interferentes no tempo de retenção da artemisinina.

### Linearidade

A curva de calibração foi obtida com 5 pontos das soluções-padrão em metanol nas concentrações de 50 a 1500 µg/mL. Os padrões foram preparados em triplicata e injetados em quintuplicata (n=5). A linearidade foi avaliada em dias diferentes e foi estimada pela análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados.

### Limite de detecção e de quantificação

A estimativa do limite de detecção (LD) foi feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, por diluições sucessivas do padrão de artemisinina. O limite de quantificação (LQ) foi determinado através do ruído da linha de base e foi considerado como a concentração que produziu a relação sinal-ruído superior a 10:1.<sup>27</sup>

### Recuperação

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação através do método de adição padrão. Este método é usado quando é difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse.<sup>28</sup> Quantidades conhecidas de artemisinina foram adicionadas em triplicata na planta moída em três níveis de concentração baixo (250 µg/mL), médio (650 µg/mL) e alto (1050 µg/mL), em seguida extraídas conforme o procedimento de preparo da amostra. A amostra sem adição de padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado (concentração estimada) foram analisadas e a recuperação foi expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz.

### Precisão

A precisão do método foi avaliada levando em consideração a repetibilidade e a precisão intermediária. Para avaliar a repetibilidade analítica da metodologia empregada na análise, prepararam-se 6 amostras que foram injetadas em triplicata no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. As respostas foram expressas como o coeficiente de variação. No caso da precisão intermediária foram preparadas 6 amostras, avaliadas em 3 dias diferentes por analistas diferentes. As amostras foram injetadas em triplicata e os resultados expressos como coeficiente de variação. Os resultados foram avaliados e checados pelos critérios do teste de Cochran.<sup>30</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas analíticas traçadas por padronização externa para artemisinina demonstraram excelentes linearidade na faixa linear de 50-1500 µg/mL com coeficiente de correlação médio de 0,999. Isto indica a validade do método, pois obedece a uma correlação linear nos intervalos de concentração avaliados. A curva de calibração obtida pelo método dos mínimos quadrados pode ser expressa pela equação  $y = 1326,505 x + 54048,021$ .

O limite de detecção (LD) obtido neste trabalho foi de 2,2 µg/mL e o limite de quantificação (LQ) foi considerado como 10 vezes a relação sinal ruído, portanto, 7,5 µg/mL. Esses resultados demonstram

que o método é sensível para detectar e quantificar artemisinina em amostras de *Artemisia annua* L.

A exatidão do método foi determinada por meio da obtenção da porcentagem de recuperação média avaliada em três níveis de concentrações em triplicata. Os valores obtidos encontram-se descritos na Tabela 1; a amostra sem adição de padrão apresentou concentração de artemisinina de 350 µg/mL, portanto, as amostras adicionadas apresentaram concentrações estimadas de 600, 1000 e 1400 µg/mL.

A determinação da recuperação do analito foi realizada através da sua quantificação na matriz em estudo pelo emprego de um padrão analítico. O grau de recuperação variou entre 102,7 e 103,9%, o que está dentro das especificações esperadas para matrizes complexas (80-120%).<sup>28</sup>

**Tabela 1.** Porcentagem de recuperação de artemisinina no processo de extração e limpeza em três níveis de concentração

Concentração estimada (µg/mL)	Média concentração Experimental CLAE (µg/mL)	Recuperação clean-up (%)	CV (%)
600,00	623,40	103,90	1,21
1000,00	10029,00	102,90	1,68
1400,00	1437,80	102,70	1,57

CV- coeficiente de variação; n=6

A precisão do método (Tabela 2) foi avaliada através da repetibilidade envolvendo várias medições realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. A precisão intermediária foi avaliada por analistas diferentes em 3 dias diferentes. Os resultados da repetibilidade e precisão intermediária encontram-se na Tabela 2, como média das concentrações e dos desvios padrões encontrados e expressos como coeficiente de variação.

**Tabela 2.** Repetibilidade e precisão intermediária do método cromatográfico para determinação de artemisinina

Analista	A	B
	Repetibilidade <sup>a</sup>	Precisão intermediária <sup>b</sup>
Média (% p/p)	0,829	0,849
Desvio padrão	0,005	0,006
DPR	0,007	0,007
CV (%)	0,658	0,656

CV- coeficiente de variação; a= mesmo dia, mesmo analista e mesmo equipamento; b= três dias diferentes, analistas diferentes e mesmo equipamento.

Os valores do coeficiente de variação demonstrados na Tabela 2 confirmam que os resultados estão dentro dos critérios aceitáveis (CV ≤ 5%). Segundo a ANVISA,<sup>28</sup> o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, concentração do analito na amostra, tipo da matriz, não se admitindo valores superiores a 5%.

A variância entre os dois analistas foi verificada através da aplicação do método de Cochran,<sup>30</sup> apresentando valor calculado menor que o valor tabelado ( $C_c = 0,510$ ,  $C_{tab1\%} = 0,793$  e  $C_{tab.5\%} = 0,707$  para n=6) indicando que não há variação significativa entre os resultados.

O método proposto apresentou boa seletividade, como pode ser observado na Figura 2, pois os compostos interferentes deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartemisinina não coeluem com a artemisinina, demonstrando a especificidade do método em relação ao analito citado.

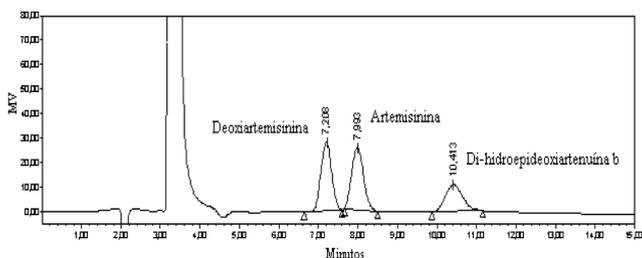


Figura 2. Perfil cromatográfico da separação da artemisinina dos compostos interferentes deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartemisinina b

## CONCLUSÕES

O método analítico proposto para determinação de artemisinina em amostras de *Artemisia annua* L., utilizando coluna com fase estacionária ciano e detecção por índice de refração, pode ser considerado como método alternativo, seletivo, exato, preciso, rápido e econômico quando comparado com a metodologia descrita por Qian *et al.*<sup>13</sup> que utiliza detector UV e requer a etapa da derivatização para quantificação da artemisinina. A metodologia desenvolvida mostrou-se reprodutível e linear na faixa de concentração de 50 a 1500 µg/mL, sendo adequada à avaliação da qualidade de amostras que contêm artemisinina.

Os resultados deste estudo permitirão um melhor acompanhamento da extração em planta piloto, possibilitando a quantificação simultânea da artemisinina, deoxiartemisinina e di-hidroepideoxiartemisinina b em extratos brutos de *Artemisia annua* L. e também poderão auxiliar no desenvolvimento do estudo de estabilidade destes extratos.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), financiadora da bolsa de Pós-doutorado (01/09660-6) e do projeto Auxílio à Pesquisa (2002/03004-2).

## REFERÊNCIAS

- Dias, C. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1997.
- Rodrigues, R. A. F.; Foglio, M. A.; Boaventura Jr. S.; Santos, A. S.; Rehder, V. L. G.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 368.
- Meshnick, S. R.; Yang, Y.; Lima, V.; Keypers, F.; Kamchon, W. S.; Yuthavong, Y.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1108.
- Borstnik, K.; Paik, I.; Shapiro, T.; Posner, G. H.; *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1661.
- Balint, G. A.; *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 261.
- <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm>, acessada em Fevereiro 2007.
- Jiang, L.; Liu, Q.; Chen, P.; *Sci. China, Ser. C: Life Sci.* **2007**, *50*, 251.
- Snow, R. W.; Guerra, C. A.; Noor, A. M.; Myint, H. Y.; Hay, S. I.; *Nature* **2005**, *437*, 7056.
- Ferreira, J. F. S.; Lauglin, J. C.; Delabays, N.; de Magalhães, P. M.; *Plant. Genet. Resour.* **2005**, *3*, 206.
- Dias, C. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
- Foglio, M. A.; Dias, P. C.; Antonio, M. A.; Possenti, A.; Rodrigues, R. A. F.; Silva, E. F.; Rehder, V. L. G.; Carvalho, J. E.; *Planta Med.* **2002**, *68*, 515.
- Zhao, S. S.; Zeng, M. Y.; *Planta Med.* **1985**, *51*, 233.
- Qian, G.; Yang, Y.; Ren, Q.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 705.
- Green, M. D.; Mount, D. L.; Todd, G. D.; Capomacchia, A. C.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *695*, 237.
- Sandrenan, N.; Sioufi, A.; Godbillon, J.; Netter, C.; Donker, M.; van Valkenburg, C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *691*, 145.
- Avery, B. A.; Venkatesh, K. K.; Avery, M. A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *730*, 71.
- Maillard, M. P.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; *J. Chromatogr.* **1993**, *647*, 147.
- Sahai, P.; Vishwakarma, R. A.; Bharel, S.; Gulati, A.; Abdin, M. Z.; Srivastava, P. S.; Jain, S. K.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3084.
- Wang, M.; Park, C.; Wu, Q.; Simon, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7010.
- Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.; *Methods Biotechnol.* **2000**, *13*, 135.
- Gupta, M. M.; Jain, D. C.; Verma, R. K.; Gupta, A. P.; *J. Med. Aromat. Plant Sci.* **1996**, *18*, 5.
- Jiang, H. L.; Chen, K. X.; Tang, Y.; Chen, J. Z.; Li, Y.; Wang, Q. M.; Ji, R. Y.; Zhuang, Q. K.; *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1997**, *36*, 154.
- Dhulst, A.; Augustijns, P.; Arens, S.; VanParijs, L.; Colson, S.; Verbeke, N.; Kinget, R.; *J. Chromatogr. Sci.* **1996**, *34*, 276.
- Lanças, F. M.; *Extração em fase sólida (SPE)*, Editora Rima: São Carlos, 2004.
- Rehder, V. L. G.; Rodrigues, M. V. N.; Sartoratto, A.; Foglio, M. A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*, 116.
- Celeghini, R. M. S.; Silva, A. P.; Sousa, I. M. O.; Foglio, M. A.; *Rev. Bras. Plantas Med.* **2006**, *8*, 119.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, RE n° 899, de 29 de maio de 2003.
- International Conference on Harmonisation (ICH); *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 6 November 1996.
- International Organization for Standardization, ISO/DIS 5725; *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results. Part 2: A basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement of method*, Geneva: Switzerland, 1990.