

QUANTIFICAÇÃO DE SALICILATO DE METILA EM QUATRO GÊNEROS DE Polygalaceae, POR CLAE-DAD*

José L. C. da Rocha, José F. B. Pastore

Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

Hugo N. Brandão*

Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina, s/n, 44036-900 Feira de Santana – BA, Brasil

Antonio Azeredo

Instituto de Estudos em Saúde Coletiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, s/n, Cidade Universitária Ilha do Fundão, 21941-598 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Juceni P. David e Edlene O. dos Santos

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n, Campus Univ. Ondina, 40170-290 Salvador – BA, Brasil

Jorge M. David

Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo, s/n, Campus Univ. Ondina, 40170-290 Salvador – BA, Brasil

Recebido em 20/5/12; aceito em 22/9/12; publicado na web em 26/10/12

QUANTIFICATION OF METHYL SALICYLATE IN FOUR GENERA OF THE Polygalaceae BY HPLC-DAD. Polygalaceae is represented in Brazil by ten genera and 191 species, of which the *Polygala* is the most representative, characterized by the occurrence of methyl salicylate. Seventeen species of Polygalaceae have been analyzed by HPLC-DAD and the technique proved to be selective, precise, accurate, and with low limits of quantification and detection. The analysis of plant material confirmed the presence of methyl salicylate, with concentration values ranging from 14.1 a 126.9 µg/g.

Keywords: HPLC; Polygalaceae; methyl salicylate.

INTRODUÇÃO

Atualmente a família Polygalaceae Hoffmanns. & Link compreende 22 gêneros e cerca de 1.300 espécies com ampla distribuição no mundo,¹ sendo as regiões temperadas quentes e tropicais seus principais centros de diversidade.² O gênero *Polygala*, responsável pela distribuição cosmopolita da família, compreende atualmente cerca de 725 espécies e 8 subgêneros. No Brasil, essa família está representada por 10 gêneros e 191 espécies, dos quais o gênero *Polygala* é o mais representativo, com 98 espécies.³ Este gênero está representado apenas pelo subgênero típico, uma vez que os outros táxons tradicionalmente reconhecidos como subgêneros estão sendo tratados como gêneros independentes.⁴

Espécies desta família são conhecidas por conter compostos químicos que exibem atividades analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica, entre outras.⁵ A família também tem sido alvo de estudos fitoquímicos, nos quais já foram descritos saponinas, xantonas, derivados de pironas, cumarinas, ácidos graxos, fenóis e alcaloides.⁶ Além desses compostos, as espécies de *Polygala* caracterizam-se também pela presença de salicilato de metila, encontrado principalmente em suas raízes.⁷

O salicilato de metila é utilizado para aliviar dores em geral, principalmente, dores musculares, aplicado externamente na área afetada. Pode ser encontrado em diversas formas farmacêuticas, além de fragrâncias utilizadas em cosméticos, perfumes finos, xampus, papel higiênico, sabonetes e outros artigos de higiene pessoal, bem como em produtos não cosméticos, tais como produtos de limpeza e detergentes domésticos.⁸

A aplicação da cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE) para a análise de compostos voláteis ainda é limitada. Sendo que, nos casos de análise de compostos voláteis, a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é a técnica geralmente utilizada. Porém, em estudo realizado por Villa e colaboradores,⁹ com salicilato de benzila e outros compostos voláteis, foi demonstrado que a CLAE também é eficiente. O estudo de Villa também demonstrou que a CLAE pode ser considerada uma técnica simples, rápida, econômica e reprodutível, mesmo para este tipo de análise. Baseado nos dados obtidos por Villa e na ausência de trabalhos com análise de salicilato de metila por CLAE, assim como de estudos quantitativos desse metabólito em espécies de *Polygala*, o presente trabalho apresenta a metodologia desenvolvida e validada usando CLAE-DAD para quantificação de salicilato de metila em espécies de Polygalaceae. Assim, foi observado que com os parâmetros utilizados de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação, a metodologia aplicada atende a finalidade pretendida. Foi possível quantificar salicilato de metila nas 17 espécies analisadas, o que demonstrou grande variação na concentração de salicilato de metila nas diferentes espécies analisadas, com valores menores que 14,1 µg/g a maiores que 126,9 µg/g.

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta

A coleta foi realizada em áreas do campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, no período da manhã, sendo que a análise do material foi realizada logo em seguida. Ressalta-se que algumas espécies foram coletadas na região de Chapada Diamantina – BA, sendo esse material conservado em saco plástico fechado e analisado

*e-mail: hugo@uefs.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Otto R. Gottlieb (31/8/1920-19/6/2011)

apenas 1 dia após a coleta. As informações de coleta encontram-se na Tabela 1 e estão disponíveis no endereço eletrônico do *species link*, <http://www.splink.org.br/index>. A coleta e identificação dos espécimes foram realizadas pelo especialista nesta família botânica J. F. B. Pastore. Todos os materiais coletados para análise fitoquímica tiveram material testemunho depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana – HUEFS. Foram amostradas espécies de 4 gêneros diferentes, *Asemeia* Raf. emmend. Small, *Bredemeyera* Willd., *Polygala* L. e *Securidaca* L. entre os 7 gêneros de Polygalaceae representados na região da Caatinga.

Materiais e equipamentos

Os materiais empregados foram salicilato de metila Vetec®, dosagem mínima 99%; acetonitrila grau HPLC; água purificada obtida através de Milli-Q para uso em CLAE. Os demais reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico.

Os equipamentos empregados foram sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW Hitachi L-2130, equipado com

injetor e detector UV de arranjo de diodos (DAD) VRW Hitachi L-2455, e forno VRW Hitachi L-2300, coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinada com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5 µm) da Merck.

Preparação das amostras

As impurezas, como terra e folhas de outras plantas, foram retiradas. As raízes foram separadas das partes aéreas para a realização da análise separadamente. Alguns espécimes, devido à pequena quantidade de material vegetal conseguido, foram analisados por inteiro, sem separação das suas partes. Tanto as raízes quanto as partes aéreas foram rasuradas e pesadas. Em seguida, foram transferidas para recipientes, nos quais foi adicionado o solvente extrator (hexano), na proporção de 10 mL para cada 1 g de material vegetal. Os recipientes foram devidamente vedados e submetidos à extração por sonicação durante 1 h, à temperatura ambiente. Após filtração, 1 mL do extrato foi submetido à filtração em cartucho de extração em

Tabela 1. Quantificação de salicilato de metila nas amostras

Material testemunho	Data	Local de coleta	Espécies	Parte da planta	µg salicilato/g planta
Pastore 2683	jun. 2009	UEFS	<i>Asemeia ovata</i> (Poir.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott	Parte aérea	49,33±5,41
Pastore 2683	jun. 2009	UEFS	<i>Asemeia ovata</i>	Raiz	97,72±6,30
Pastore et al. 2682	jun. 2009	UEFS	<i>Asemeia violacea</i> (Aubl.) J.F.B.Pastore & J.R.Abbott	Parte aérea	>126,9
Pastore et al. 2682	jun. 2009	UEFS	<i>Asemeia violacea</i>	Raiz	>126,9
Harley & Pastore 56180	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera hebeclada</i> (DC.) J.F.B.Pastore	Caule	-
Harley & Pastore 56180	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera hebeclada</i>	Folha	-
Pastore et al. 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera martiana</i> A.W.Benn.	Caule	<14,1
Pastore et al. 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera martiana</i>	Raiz	<14,1
Pastore et al. 3205	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Bredemeyera martiana</i>	Folha	-
Harley & Pastore	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala</i> aff. <i>harleyi</i> Marques	Planta inteira	<14,1
Pastore et al. 2687	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala boliviensis</i> A.W.Benn.	Parte aérea	106,12±7,92
Pastore et al. 2687	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala boliviensis</i>	Raiz	>126,9
Pastore et al. 2685	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala glochidiata</i> Kunth	Parte aérea	-
Pastore et al. 2685	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala glochidiata</i>	Raiz	>126,9
Harley & Pastore	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala harleyi</i> Marques var. <i>harleyi</i>	Planta inteira	<14,1
Harley & Pastore 55169	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala harleyi</i> var. <i>intermedia</i> Marques	Planta inteira	<14,1
Pastore et al. 3209	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala obovata</i> A.St.-Hil. & Moq.	Parte aérea	<14,1
Pastore et al. 3209	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala obovata</i>	Raiz	87,76±0,51
Pastore et al. 2686	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala paniculata</i> L.	Parte aérea	24,00±6,96
Pastore et al. 2686	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala paniculata</i>	Raiz	>126,9
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i> Mart.	Brotos	<14,1
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Caule	<14,1
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Flor	<14,1
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Folha	<14,1
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Raiz	<14,1
Harley & Pastore 55802	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala poaya</i>	Ramos velhos	-
Harley & Pastore 55814	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sericea</i> Mart. ex A.W.Benn.	Raiz	40,61±0,22
Harley & Pastore 55814	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sericea</i>	Parte aérea	<14,1
Pastore et al. 3213	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sincorensis</i> Chodat	Parte aérea	<14,1
Pastore et al. 3213	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Polygala sincorensis</i>	Raiz	>126,9
Pastore et al. 2684	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala trichosperma</i> Jacq.	Parte aérea	<14,1
Pastore et al. 2684	jun. 2009	UEFS	<i>Polygala trichosperma</i>	Raiz	18,94±0,17
Pastore et al. 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i> (L.) S.F.Blake	Caule	<14,1
Pastore et al. 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i>	Folha	<14,1
Pastore et al. 3201	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca diversifolia</i>	Flor	<14,1
Harley & Pastore 55584	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca tomentosa</i> A.St.-Hil. & Moq.	Caule	<14,1
Harley & Pastore 55584	set./out. 2010	Chapada Diamantina	<i>Securidaca tomentosa</i>	Folha	<14,1

* (-) – traço

fase sólida (*Solid-Phase Extraction* - SPE), com 4 mL de acetonitrila grau HPLC. 1,5 mL da solução de acetonitrila obtida foi novamente filtrada através de membrana microporosa (0,22 µm) diretamente para vial e, posteriormente, injetada no cromatógrafo.

Condições da CLAE-DAD

O volume de injeção foi de 20 µL e as condições de análise incluíram gradiente de eluição com fase móvel de acetonitrila (ACN) e água (H₂O). Inicialmente, foi testado o método para separação de salicilato de benzila utilizado por Villa. Em seguida, desenvolveu-se o gradiente descrito na Tabela 2. O forno de colunas operou em 25 °C e outras condições estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
0,0	0,7	50,0	50,0
5,0	0,7	50,0	50,0
15,0	1,0	60,0	40,0
15,1	1,0	90,0	10,0
18,0	1,0	90,0	10,0
18,1	1,0	50,0	50,0
22,0	1,0	50,0	50,0

A leitura do detector de arranjo de diodo foi realizada na faixa de 210 a 400 nm e a aquisição cromatográfica definida em 236 nm. A identificação foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e do gráfico de absorbância no UV correspondente com o sinal do padrão de referência.

Método analítico da validação

O método foi validado de acordo com os parâmetros descritos pelo *International Conference on Harmonization* (ICH), pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – Resolução ANVISA RE n° 899, de 29/05/2003 – e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) – documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.¹⁰ Os parâmetros utilizados foram seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação.

A seletividade foi determinada por meio da comparação de picos do padrão e das amostras, levando-se em consideração o tempo de retenção, espectro no ultravioleta e pureza do pico em 3 pontos diferentes.

A linearidade foi determinada pela curva de calibração, levando-se em consideração o coeficiente de correlação (R²). A curva de calibração foi obtida por injeções em triplicata de 7 soluções de diferentes concentrações do padrão externo, em uma faixa de 14,1-126,9 µg/mL. A solução estoque do padrão externo foi preparada pela dissolução em acetonitrila do composto padrão em balão volumétrico à concentração de aproximadamente 10 mg/mL.

A precisão foi determinada pela injeção em triplicata de 3 soluções padrão de salicilato de metila. Esse parâmetro foi expresso como o desvio padrão relativo.

A exatidão foi verificada pelo fator de recuperação. Amostras da matriz foram fortificadas com 3 soluções padrão de concentrações conhecidas (125, 70 e 20 µg/mL). As amostras fortificadas, juntamente com amostra de matriz não fortificada, foram submetidas a todo o processo de extração e injetadas em CLAE.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados pela relação do desvio padrão e da inclinação da curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seletividade

A especificidade do método, bem como a identificação do salicilato de metila, foi verificada pela sobreposição do cromatograma e do espectro no UV obtido para o padrão e para as amostras, comparando-se o tempo de retenção e a absorção no espectro de UV (λ_{max}).

A média dos tempos de retenção do padrão de salicilato de metila foi de 15,56 ± 0,06 min (n = 5), enquanto que para as amostras foi observado o tempo médio de 15,12 ± 0,26 min. A diferença entre os tempos de retenção do padrão e das amostras pode ser atribuída ao efeito de matriz inerente à amostra analisada e às diferentes concentrações dos analitos. Os dados fornecidos pelos espectros no UV corroboram a comprovação de que o composto, nos tempos de retenção em questão, se trata do salicilato de metila. Os espectros no UV apresentaram as mesmas absorções tanto para o padrão quanto para a amostra, o que corrobora a demonstração da especificidade do método.

A pureza do pico também foi estimada para comprovar a especificidade do método. Para isso, foram obtidos os espectros UV em três pontos distintos do pico (15,47; 15,56 e 15,65 min) (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de similaridade

Padrão		Amostra	
Tempo de retenção	Índice de similaridade	Tempo de retenção	Índice de similaridade
15,56 min*	1,0000	14,96 min*	1,0000
15,47 min	0,9965	14,87 min	0,9923
15,65 min	0,9987	15,08 min	0,9932

* ponto de referência

Diante dos espectros e índices de similaridade obtidos, pode-se inferir que o método consegue separar especificamente a substância de interesse.

Linearidade e precisão

O método proposto foi avaliado quanto à sua linearidade por meio do tratamento matemático dos resultados obtidos nas análises realizadas em triplicatas de 7 soluções padrão de concentrações conhecidas, na faixa de 14,1-126,9 µg/mL. A curva de calibração mostrou-se adequadamente linear, como demonstra o coeficiente de correlação de R² = 0,9933.

A precisão do método foi determinada pelo desvio padrão relativo de 3 soluções padrão injetados em triplicata. Os resultados obtidos próximos a 1% demonstram a precisão do método (Tabela 4).

Tabela 4. Desvio padrão relativo

Média das concentrações (µg/mL) ± Desvio padrão	Desvio padrão relativo
17,22 ± 0,21	0,45%
67,88 ± 1,42	1,90%
126,38 ± 1,06	0,73%

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação de salicilato de metila, através da adição de soluções padrão em triplicata de concentrações 125, 70 e 20 µg/mL adicionadas na matriz das partes aéreas. A análise dos dados da exatidão também

contribuiu na comprovação da identidade do composto de interesse, com a coinjeção do padrão adicionado na amostra e a quantidade do próprio salicilato de metila já presente na matriz. As taxas de recuperação são demonstradas na Tabela 5, na qual se verifica, através dos resultados obtidos, a exatidão do método utilizado.

Tabela 5. Taxa de recuperação

Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	μg de salicilato/ g de planta	taxa de recuperação
0	119,57	0
20	123,76	83,8%
70	133,65	80,5%
125	148,03	91,1%

As taxas de recuperação obtidas encontram-se dentro da faixa estabelecida pela ANVISA (80-120%), o que comprova a exatidão do método. As diferenças dos valores obtidos devem-se, principalmente, à integração dos picos de salicilato de metila, a qual foi feita manualmente, o que aumenta o erro associado à própria manipulação.

Limite de detecção e de quantificação

O LD calculado para o método demonstrou que o mesmo se mostra bastante sensível para a detecção do componente de interesse, sendo estabelecido em $4,27 \mu\text{g/mL}$. Da mesma maneira, o LQ também permitiu quantificar concentrações bastante baixas de salicilato de metila, sendo determinado em $14,24 \mu\text{g/mL}$.

Análise das amostras

A análise dos extratos mostrou tempo de retenção do salicilato de metila em aproximadamente 15 min (Figura 1). Os espectros no ultravioleta apresentaram-se característicos do salicilato de metila, com λ_{max} em 237 e 303 nm (Figura 1).

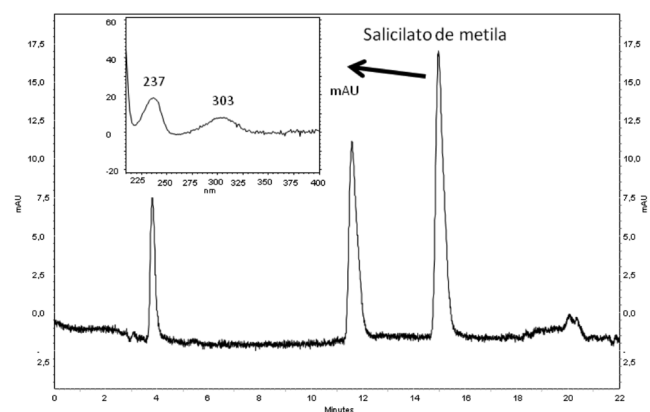


Figura 1. Perfil cromatográfico registrado em 236 nm de amostra das raízes de *Polygala decumbens* e espectro no UV do pico em 15,09

A quantificação do salicilato de metila foi determinada pela média das áreas dos picos das replicatas das amostras, como demonstrado na Tabela 1. A concentração foi determinada a partir do material fresco.

As análises mostraram grande diferença na concentração de salicilato de metila entre as espécies de Polygalaceae e nas diferentes partes das plantas. Estas diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como o tempo de coleta e análise, hábito da planta e parte analisada da planta. A concentração do salicilato de metila no material coletado na UEFS foi maior que no material coletado

na Chapada Diamantina, indicando possível perda deste metabólito durante o processo de armazenagem até a análise. Entretanto, foi observada notável exceção em *Polygala sincorensis*, em que a análise das raízes coletadas na região da Chapada Diamantina resultou na maior concentração de salicilato de metila dentre todas as amostras quantificadas. Outro fator relacionado pode ser o hábito das espécies, sendo que as anuais, com hábito herbáceo e raízes pouco lignificadas, resultaram em maior concentração de salicilato de metila. Nas amostras em que as raízes foram avaliadas separadamente, pode-se observar que, de modo geral, essas partes possuem maior concentração de salicilato de metila em comparação com as demais partes das plantas. Estas informações certamente estão de acordo com o que é verificado em campo, através de análises sensoriais em que o forte odor de salicilato de metila está presente nas raízes das espécies herbáceas e subarborescentes, não cespitosas, de *Polygala* e *Asemeia*.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a utilização de CLAE-DAD também pode ser aplicada em compostos voláteis, sendo este o primeiro relato de quantificação de salicilato de metila por essa técnica. Anterior a esse trabalho, apenas Villa e colaboradores⁹ realizaram estudo semelhante envolvendo identificação de salicilato de benzila por CLAE-DAD. Além disso, no presente trabalho comprovou-se inequivocamente que essa substância é um marcador químico presente nos principais clados da família Polygalaceae.

REFERÊNCIAS

- Marques, M. C. M.; Peixoto, A. L.; *Rodriguésia* **2007**, *58*, 95.
- Furness, S. H.; Stafford, P. J.; *Rev. Palaeobot. Palyn.* **1995**, *88*, 61.
- <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB020541>, acessada em Dezembro 2011.
- Paiva, J. A. R.; *Fontqueria* **1998**, *50*, 346; Pastore, J. F. B.; *Kew Bull.* **2012**, *67*, 2; Pastore, J. F. B.; Cardoso, D. B. S. O.; Aymard C. G. A.; *Novon* **2010**, *20*, 317.
- Lapa, F. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006.
- Hamburger, M.; Gupta, M.; Hostettmann, K.; *Planta Med.* **1985**, *51*, 215; Bergeron, C.; Marston, A.; Wolfender, J. L.; Mavi, S.; Rogers, C.; Hostettmann, K.; *Phytochem. Anal.* **1997**, *8*, 32; Pinheiro, T. R.; Cechinel, V.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B.; Delle-Monache, F.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; *Phytochemistry* **1998**, *48*, 725; Pizzolatti, M. G.; Cunha Jr, A.; Pereira, W. S.; Delle Monache, F. A.; *Biochem. System. Ecol.* **2004**, *32*, 603.
- Coelho, V. P. M.; Agra, M. F.; Baracho, G. S.; *Acta Bot. Bras.* **2008**, *22*, 225.
- Kakker, T.; Mayersohn, M.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1998**, *718*, 69; Davis, J. E.; *J. Emerg. Med.* **2007**, *32*, 63; Lapczynski, A.; Jones, L.; McGinty, D.; Bhatia, S. P.; Letizia, C. S.; Api, A. M.; *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, S428.
- Villa, C.; Gambaro, R.; Mariani, E.; Dorato, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 755.
- ICH; *ICH Guidelines Q 2A, Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology* (CPMP/ICH/381/95), 1995; *ICH Guidelines Q 2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology* (CPMP/ICH/281/95), 1995; Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução n° 899, de 29/05/2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 02/06/2003; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.