

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Otimização e validação de método analítico por CLAE para quantificação de dinitrato de isossorbida matéria-prima, comprimidos simples e sublingual

Franciele Tams Gasperin

Porto Alegre, novembro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Otimização e validação de método analítico por CLAE para quantificação de dinitrato
de isossorbida matéria-prima, comprimidos simples e sublingual**

Franciele Tams Gasperin

Trabalho final da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Tércio Paschke Oppe

Coorientador: Msc. Jaison Carlosso Machado

Porto Alegre, novembro de 2015.

“É melhor vencermos a nós mesmos que ao mundo”

Sartre

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Tércio Paschke Oppe pela disponibilidade de orientação, incentivo, confiança, dedicação e revisão crítica. Muito obrigada também pela oportunidade de fazer parte do projeto Revisão de Monografias de Insumos e Especialidades Farmacêuticas da Farmacopeia Brasileira.

Ao meu coorientador Jaison Carlosso Machado pelo apoio e auxílio nos experimentos.

Ao LCQFar-UFRGS, especialmente à Farmacêutica Lorena pelo apoio e ajuda na rotina do laboratório.

À professora Dra. Nadia Volpato pela orientação durante minha iniciação científica, quando obtive os primeiros conhecimentos na área de controle de qualidade de medicamentos e que me direcionaram para área de indústria farmacêutica.

À minha colega e amiga Joanna Wittckind Manoel pela ajuda nos experimentos e análises de dados.

Aos meus queridos irmãos por todo amor, dedicação, cuidado e incentivo. Obrigada por sempre investirem em minha formação acadêmica, por não desistirem de mim, fazendo-me acreditar que este dia chegaria. Amo vocês! <3

APRESENTAÇÃO

Os dados deste Trabalho estão apresentados na forma de artigo científico. Desta forma, os padrões de redação, formatação e demais parâmetros seguiram conforme preconizado pela Revista Química Nova, na qual o artigo será posteriormente submetido. As referidas normas estão listadas no anexo I.

As análises que serviram de base para este trabalho foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FACFAR/UFRGS).

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	7
2. ANEXO I	19

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA
QUANTIFICAÇÃO DE DINTRATO DE ISOSSORBIDA MATÉRIA-PRIMA,
COMPRIMIDOS SIMPLES E SUBLINGUAL**

Franciele Tams Gasperin^{1,a*}, Jaison Carlosso Machado^{1,b}, Tércio Paschke Oppe^{1,c}

¹ Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga 2752 Lab. 403, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

^a Acadêmica da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

^b Aluno de Doutorado no PPGCF – UFRGS.

^c Professor Adjunto do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos – UFRGS.

TÍTULO

Otimização e validação de método analítico por CLAE para quantificação de dinitrato de isossorbida matéria-prima, comprimidos simples e sublingual.

ABSTRACT

A selective, simple and low cost effective high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and enhanced for quantification of isosorbide dinitrate (IDN), a drug of the class of nitrates used as a vasodilator in angina pectoris, for analysis of raw material, simple and sublingual tablets. In the optimization of the method it sought to obtain suitable chromatographic conditions using lower concentrations of buffer, eliminating internal standard and with a fast sample preparation, resulting in the use of Phenomenex[®] C18 Luna (150 x 4.6 mm, 5 μ m) column, mobile phase constituted of 4 mM ammonium acetate buffer pH 4.7 and methanol (50:50, v/v), flow rate of 1.0 mL min⁻¹, injection volume of 20 μ l, detection at 210 nm and retention time about 5.7 min. The new HPLC method developed in this work was successfully validated demonstrating to be specific, precise, accurate, robust and linear in the desired concentration range of 50 - 150 μ g mL⁻¹. Therefore, this method can be used on quality control for quantitative analysis of IDN in commercially available raw material, simple and sublingual tablets.

Keywords: isosorbide dinitrate, HPLC, quality control, raw material, tablets

INTRODUÇÃO

O dinitrato de isossorbida (DNI), representado na Figura 1, é um fármaco antianginoso da classe dos Nitratos sendo um dos mais utilizados para o tratamento e prevenção da angina do peito¹, quadro clínico que se manifesta quando o trabalho cardíaco excede a capacidade sistêmica de fornecimento de oxigênio ao miocárdio.²⁻⁴ O DNI atua como vasodilatador de ação direta sobre o coração, ou seja, não tem mediação por parte de inervações do sistema nervoso autônomo.^{2,4}

Registrado no *Chemical Abstracts Service* (CAS) sob o número 87-33-2, o DNI tem como nomenclatura oficial *1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol dinitrate* e fórmula molecular $C_6H_8N_2O_8$. Apresenta-se na forma de cristais incolores com ponto de fusão de 70 °C, pouco solúvel em água, facilmente solúvel em álcool, acetona e éter, e solúvel em metanol.⁵ É geralmente comercializado na forma de mistura seca, contendo cerca de 25% de DNI (p/p), diluído em excipientes como lactose, manitol ou outro adjuvante que permita sua manipulação segura, uma vez que o pó puro é altamente explosivo se agitado ou submetido a calor excessivo. Pode conter até 1% de estabilizante, como, por exemplo, o fosfato de amônio.^{5,6}

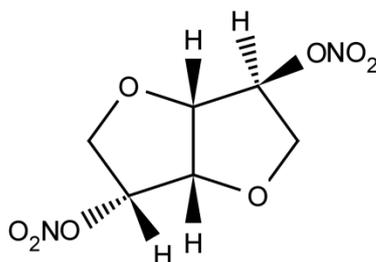


Figura 1. Estrutura química de dinitrato de isossorbida

No Brasil, é produzido por diversos laboratórios sob as formas farmacêuticas comprimido simples e sublingual, além de cápsulas de liberação prolongada, com doses variando de 5 a 40 mg.⁷

A via sublingual é utilizada para impedir e aliviar ataques agudos de angina. Isso se deve à alta vascularização dessa região, que se liga diretamente à veia cava superior e evita o efeito de primeira passagem hepática, proporcionando rápida e completa absorção do fármaco.⁴ Já, o comprimido simples é usado como profilaxia de uso prolongado.^{2,3,8}

Ainda não há monografia na Farmacopeia Brasileira para o DNI.⁹ Nas bases de dados científicas consultadas, não se obtiveram metodologias para doseamento de DNI, seja para a

matéria prima, ou suas inúmeras formas de produto acabado. Entretanto, já estão descritas em alguns compêndios oficiais.^{6,10}

Segundo, PARHAM *et al*, 2001, cerca de 30 trabalhos foram publicados desde 1971 para determinação quantitativa de DNI em comprimidos ou plasma humano por diferentes métodos de análise, tais como cromatografia a gas, cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis). Porém, apenas alguns destes métodos são adequados para análise de rotina com elevada sensibilidade e rapidez.³

A combinação entre CLAE e detectores de UV-Vis é um dos métodos mais utilizados na avaliação de produtos farmacêuticos, fornecendo precisão, exatidão e robustez para análises quantitativas.¹¹⁻¹⁴

Neste contexto, o presente trabalho buscou a otimização e validação de uma nova técnica por CLAE, que contemplasse um ensaio analítico mais econômico e simplificado para a quantificação de DNI para análise de matéria-prima e comprimidos orais e sublinguais.

O método desenvolvido neste trabalho foi validado de acordo com a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), a qual define que o objetivo da validação de um processo analítico é demonstrar a adequabilidade à sua finalidade, incluindo características aplicáveis à identificação e controle de impurezas ou dos procedimentos do ensaio.¹⁵

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Utilizou-se para a preparação da fase móvel uma mistura de metanol grau CLAE (Tedia[®]) e solução tampão acetato de amônio 4,0 mM (grau analítico, Sigma-Aldrich[®]) com pH previamente ajustado para 4,7 utilizando ácido acético grau analítico (Sigma-Aldrich[®]) (potenciômetro Digimed[®], modelo DM-20). A matéria-prima, os comprimidos simples de 10 mg e sublinguais de 5 mg de DNI foram obtidos de fontes comerciais no Brasil. O padrão utilizado foi dinitrato de isossorbida substância química de referência (DNI SQR) com teor de pureza de 25,0% (USP Standard; lote: J0I022). Os excipientes presentes na formulação placebo da matéria-prima foram lactose, manitol, cloreto de amônio e fosfato de sódio monobásico. Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água purificada (Millipore[®], modelo Direct-Q 3 UV).

Preparo do padrão e amostras

As amostras dos comprimidos simples (CS) e sublinguais (CSB) foram preparadas determinando-se o peso médio de vinte unidades posteriormente trituradas em gral com pistilo até a obtenção de um pó homogêneo.¹⁹ A matéria-prima (MP) não necessitou trituração, por já se tratar de um pó homogêneo. Dissolveu-se uma quantidade adequada de amostra, comprimidos ou matéria-prima, em 5 mL de metanol, agitou-se por cerca de 30 segundos, a seguir adicionou-se 5 mL de água ultrapura e agitou-se até completa dissolução por mais 30 segundos. A concentração foi ajustada para 100 µg mL⁻¹ em balão volumétrico com adição de fase móvel. As soluções foram filtradas em membrana com porosidade de 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo. A preparação do padrão seguiu a mesma metodologia partindo-se de 25 mg de DNI SQR. As soluções placebo foram preparadas da mesma forma descrita acima, porém adicionando-se apenas os excipientes das formulações.

Equipamento e condições cromatográficas

O desenvolvimento do método por CLAE foi realizado em um sistema Shimadzu 20A, equipado com controlador CBM-20A, bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20 AC,

forno CTO-20AC e detector SPD-M20A com arranjo de diodos (DAD). O software utilizado para controle e aquisição dos dados foi o LC-solution. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições e adequabilidade do sistema cromatográfico para o método desenvolvido por CLAE para determinação de DNI

Parâmetro	Descrição
Coluna	Coluna Thermo [®] C18 Luna (150 x 4,6mm, 5,0 µm)
Temperatura	25 °C
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 4 mM pH 4,7:metanol (50:50 v/v)
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Detecção	210 nm
Volume de Injeção	20 µL
Tempo de Retenção	5,7 ± 0,2 min
Fator de Cauda	1,20 ± 0,05
Pratos teóricos	> 8000

Procedimento de Validação do método analítico

A seleção dos parâmetros de desempenho analítico para validação do método foi baseada nas recomendações do guia Q2(R1) do ICH, avaliando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, conforme preconizado.¹⁵

Especificidade

A especificidade ou seletividade de um método instrumental é capacidade de diferenciar o analito na presença de outras substâncias que podem estar presentes tais como impurezas, produtos de degradação, excipientes ou matrizes complexas, garantindo que o resultado seja exclusivamente referente ao analito em questão.^{6,15-17} A especificidade do método foi avaliada

pela interferência dos excipientes, produtos de degradação e do mononitrato de isossorbida na análise do DNI. Foram preparadas soluções dos excipientes da matéria-prima (EXC MP), do comprimido sublingual (EXC CSB) e do comprimido simples (EXC CB), além de uma solução contendo mononitrato de isossorbida (MNI). As condições de degradação forçada às quais o fármaco foi submetido foram: hidrólise ácida (HCl 0,1 M) e alcalina (NaOH 0,1 M) durante 24 horas; calor (60 °C) por 48 horas. As amostras foram analisadas e os cromatogramas obtidos foram comparados com o cromatograma da solução padrão DNI. Além disso, foi verificada a pureza do pico através de uma ferramenta do software do cromatógrafo.

Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico corresponde a sua habilidade de apresentar resultados diretamente proporcionais à quantidade do analito na amostra testada dentro de uma determinada faixa de aplicação.^{6,15,18} Recomenda-se que seja estabelecida com, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva devido a possíveis erros associados.^{17,19}

Para este trabalho foram preparadas três curvas padrão com cinco pontos, na faixa de 50% a 150% da concentração de trabalho de DNI. Cada curva foi obtida a partir de uma solução padrão estoque de DNI a 250,0 µg mL⁻¹, seguida de diluições, obtendo-se soluções de concentração 50, 75, 100, 125 e 150 µg mL⁻¹. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), análise de intercepto e dos resíduos padronizados.

Precisão

Representa o grau de concordância entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra homogênea analisada em condições predefinidas e pode ser expressa pela variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas.^{15,17}

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). O ensaio de repetibilidade, precisão sob as mesmas condições operacionais em um curto espaço de tempo, foi realizado com seis repetições a 100% da concentração de trabalho. A precisão intermediária, efeito das variações dentro de um laboratório, foi analisada em três dias consecutivos, através de seis ensaios independentes de doseamento completos, por diferentes analistas. Preparou-se soluções amostra oriundas da MP, CS e CSB a 100 µg mL⁻¹ para a realização desses ensaios e os desvios

padrão relativo (DPR) obtidos a partir dos resultados encontrados serviram para avaliação da precisão.^{6,15,18}

Exatidão

Exatidão avalia o grau de concordância entre os resultados encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Pode ser avaliada pelos métodos: adição do padrão, ensaio de recuperação, comparação de métodos e materiais de referência. O ensaio deve ter no mínimo nove determinações envolvendo, pelo menos, três níveis diferentes de concentração.^{15,17,18}

A exatidão foi avaliada em três níveis, em triplicata, utilizando o método de adição de padrão às soluções amostra e placebo. Foram utilizadas concentrações de 80,0 µg mL⁻¹ (nível baixo), 100,0 µg mL⁻¹ (médio) e 120,0 µg mL⁻¹ (alto), faixa que contempla o intervalo linear do método. O resultado é expresso pela porcentagem de recuperação da quantidade do padrão adicionado.

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

Os limites de detecção (LD), menor concentração de analito detectável pelo método, e o de quantificação (LQ), menor concentração quantificável, foram determinados pelo método matemático, baseado nos parâmetros da curva analítica. A estimativa é feita a partir das três curvas padrão utilizando as equações $LD = 3,3 (SD/S)$ e $LQ = 10 (SD/S)$, onde SD é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é o coeficiente angular da curva analítica.^{14,16,17}

Robustez

O teste de robustez mede a capacidade de um método resistir a pequenas e deliberadas variações em suas condições analíticas e atesta confiabilidade na rotina de uso.^{14,16,17} Os fatores e níveis empregados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Fatores e níveis selecionados para o teste de robustez

Fator	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)
Coluna	C-18 Luna Phenomenex 5 μm (150 x 4,6 mm)	C-18 Eclipse Plus Agilent 5 μm (150 x 4,6 mm)
% Metanol na Fase Móvel	48	52
pH	4,5	4,9
Vazão (mL min^{-1})	0,9	1,1
Comprimento de Onda (nm)	208	212

Com o auxílio da ferramenta estatística – Análise Fatorial – Desenho Experimental de Placket-Burman pode-se avaliar cinco fatores em apenas 12 corridas. O desenho experimental está demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Desenho Experimental de Placket-Burman utilizado no teste de Robustez

Corrida	Coluna	Metanol	pH	Vazão	Comprimento de Onda
1	Phenomenex	52	4,9	0,9	212
2	Phenomenex	52	4,9	1,1	208
3	Phenomenex	48	4,9	1,1	212
4	Phenomenex	48	4,5	0,9	208
5	Phenomenex	48	4,5	1,1	212
6	Phenomenex	52	4,5	0,9	208
7	Agilent	52	4,5	1,1	208
8	Agilent	52	4,5	1,1	212
9	Agilent	48	4,5	0,9	212
10	Agilent	48	4,9	1,1	208
11	Agilent	48	4,9	0,9	208
12	Agilent	52	4,9	0,9	212

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das condições cromatográficas

O método utilizado neste trabalho baseou-se naquele presente na USP 38. No entanto, buscou-se obter condições cromatográficas menos dispendiosas em relação ao tampão na fase móvel com uma redução de três ordens de grandeza na concentração, sem alterar significativamente o uso de solvente orgânico, além da utilização de uma coluna cromatográfica menor, reduzindo de 25 para 15 cm, mantendo a polaridade. Além disso, foi suprimido o uso de um padrão interno a fim de simplificar o método de quantificação. A importância destas alterações refere-se ao potencial dano causado ao CLAE pelo excessivo uso de tampão.²⁰ A preparação da amostra é significativamente mais rápida, com drástica redução do tempo de agitação de meia hora para 1 minuto, já que o uso de ultrassom não foi necessário devido à adequada solubilidade da substância em metanol. A concentração de trabalho foi reduzida objetivando menor uso de amostra e SQR. Nestas condições, a absorvidade foi melhor em um comprimento de onda de 210 nm. A busca de condições cromatográficas para um método mais simples, rápido e econômico, resultou nos parâmetros analíticos descritos anteriormente na Tabela 1. Adicionalmente, as soluções amostra apresentaram estabilidade até sete dias em temperatura ambiente e em geladeira, mantendo os parâmetros de adequabilidade do sistema inalterados.

Especificidade

Os resultados obtidos na avaliação da especificidade demonstraram que não há interferência dos excipientes das formulações e da matéria-prima na análise, já que não foram observados picos na região do cromatograma onde se verifica o pico do DNI (Figura 2).

A avaliação dos possíveis produtos de degradação não resultou em alterações no formato do pico de DNI nem formação de picos adicionais próximos ao tempo de retenção de DNI em nenhuma das condições de estresse testada (Figura 3).

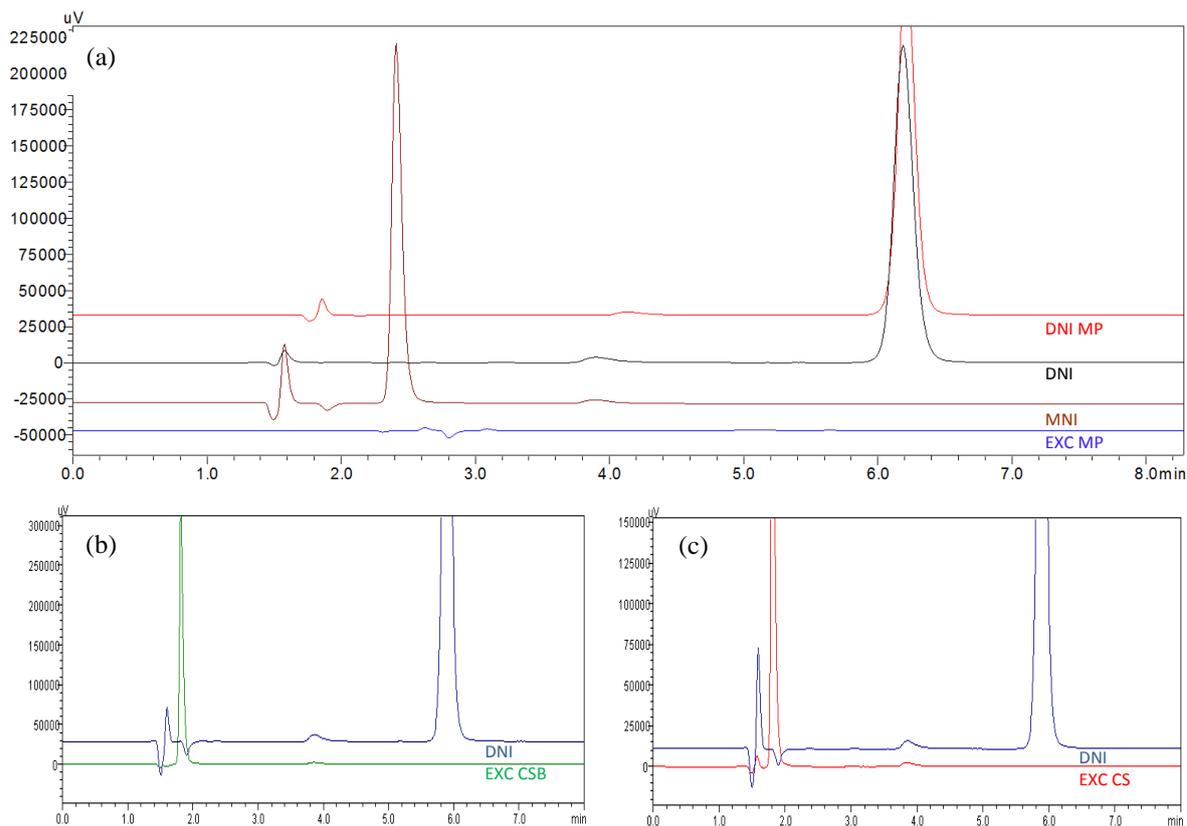


Figura 2. Sobreposição dos cromatogramas obtidos a partir da solução padrão DNI e: (a) solução de DNI MP, solução de MNI e solução placebo EXC MP; (b) solução placebo EXC CSB; (c) solução placebo EXC CS

A exposição ao agente de degradação resultou numa redução da área do pico de DNI na exposição à hidrólise básica (6% após 24 h) e à temperatura de 60 °C (10% após 24 h), conforme pode ser observado na Figura 3.

Adicionalmente, a avaliação da pureza do pico cromatográfico do fármaco, através do sistema de DAD, comprovou que não há interferentes com o mesmo tempo de retenção do analito. Dessa maneira, pode-se inferir que o novo método proposto é específico frente aos excipientes e aos possíveis produtos de degradação estudados na determinação do DNI.

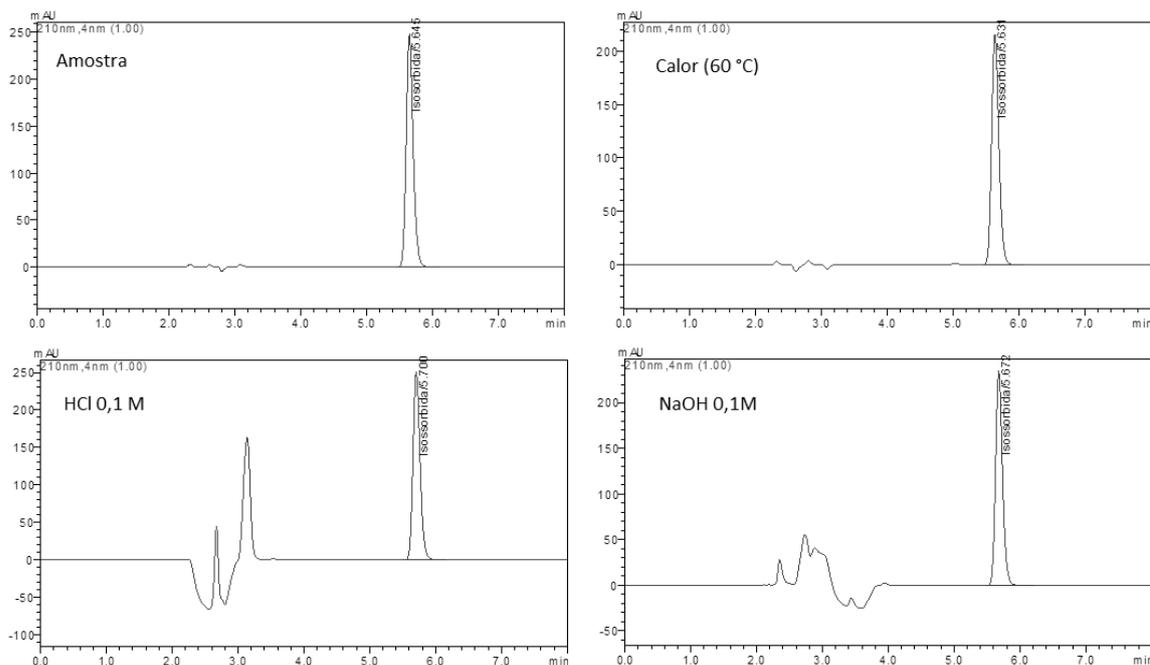


Figura 3. Cromatogramas obtidos com solução amostra de DNI submetida a condições de estresse forçado

Linearidade

Os dados obtidos a partir da análise de linearidade resultaram em um coeficiente de correlação de Pearson de 0,9994 (Figura 4), evidenciando a qualidade da curva padrão obtida, visto que estando próximo da unidade indica baixa dispersão do conjunto de pontos experimentais e reduzida incerteza dos coeficientes de regressão.¹⁸

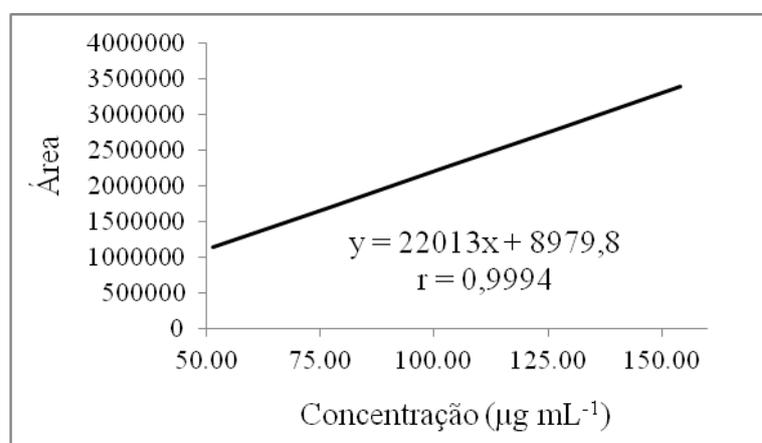


Figura 4. Representação gráfica da curva padrão média obtida para teste de linearidade

Os resultados da ANOVA demonstram regressão linear significativa para um grau de confiança de 95% e ausência de desvio de linearidade ($F_{cal} < F_{tab}$). O gráfico dos resíduos demonstrou a existência de homocedasticidade, não havendo tendência nos resultados. A ANOVA da regressão foi bastante significativa ($F_{cal} > F_{tab}$). Nos resíduos padronizados todos os pontos ficaram dentro do intervalo de - 2,0 a + 2,0 não apresentando valores atípicos, corroborando a capacidade de predição da regressão.

A análise da regressão demonstrou que o método linear simples é adequado para descrever com precisão a relação entre essas duas variáveis. Portanto, o método proposto por CLAE é linear na faixa de concentração testada para o dinitrato de isossorbida.

Precisão

A precisão intermediária resultou DPR de 0,91% para MP, de 0,95% para CS e 1,61% para CSB (Tabela 4). Os baixos valores de DPR ($< 2,0\%$) para a repetibilidade e para a precisão intermediária indicam que o método proposto apresenta repetibilidade quando realizado mais de uma vez no mesmo dia e preciso quando executado em dias e por analistas diferentes.

Tabela 4. Resultados da precisão do método analítico desenvolvido por CLAE para determinação de DNI

Precisão	Dia	Teor médio (%)	Intradia DPR (%)	Interdia DPR (%)
Matéria - prima	1	101,14	0,46	0,91
	2	101,57	0,83	
	3	100,10	0,77	
Comprimido simples	1	99,96	0,76	0,95
	2	100,00	0,78	
	3	99,19	1,18	
Comprimido sublingual	1	99,20	1,75	1,61
	2	98,43	1,66	
	3	98,95	1,62	

Exatidão

O método provou ser exato na faixa de 80 a 120% já que os resultados obtidos mostraram percentual de recuperação média de 98,99 a 100,54% para matéria-prima, de 99,09 a 101,15% para comprimidos sublinguais e de 98,57 a 101,11% para comprimidos simples (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados obtidos no teste de exatidão do DNI por CLAE

Exatidão	Nível	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Recuperação média (%)	DPR (%)
		Teórica adicionada	Média recuperada		
Matéria-Prima	Baixo	80,0	80,15	100,19	0,33
	Médio	100,0	100,28	100,29	0,22
	Alto	120,0	119,11	99,26	0,29
Comprimido Simples	Baixo	80,0	80,89	101,11	0,49
	Médio	100,0	100,25	100,25	0,91
	Alto	120,0	118,29	98,57	1,10
Comprimido Sublingual	Baixo	80,0	80,92	101,15	0,47
	Médio	100,0	100,31	100,31	0,76
	Alto	120,0	118,91	99,09	0,59

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

A estimativa resultou no LD de $3,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ e no LQ de $12,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando a sensibilidade do método.

Robustez

Os resultados referem-se aos níveis encontrados para DNI MP em relação ao padrão sob as mesmas condições de análise. Conforme se observa na Figura 5 nenhum dos fatores avaliados foi significativo ($t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$; $p > 0,05$) o que demonstra a robustez do método frente à possíveis variações em análises de rotina.

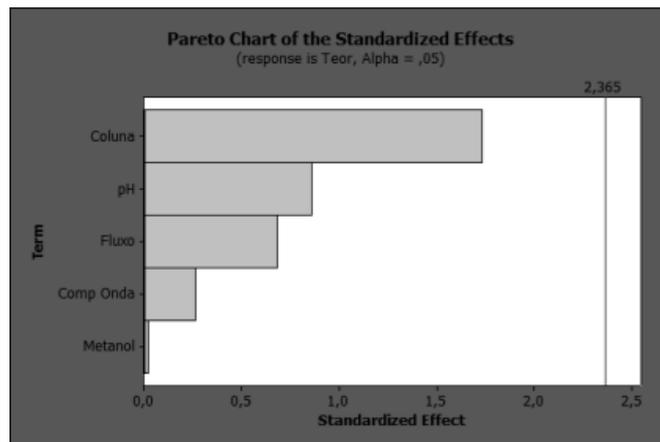


Figura 5. Gráfico de paretos apresentando os resultados do teste de robustez.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação de dinitrato de isossorbida na matéria-prima, comprimidos simples e sublingual foi adequadamente validado demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto. Além de apresentar-se relativamente mais simples, rápido e econômico em relação ao método farmacopeico (USP)⁶, utiliza menor quantidade de tampão na fase móvel, o que reduz possíveis danos ao cromatógrafo e à coluna.

Portanto, pode ser recomendado para o uso em controle de qualidade de rotina em laboratórios farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

1. Kim, H. *et al.* *Chromatographia* **2010**, 71, 595.
2. Korolkovas, A.; França, F. F. de A. C. de; *Dicionário Terapêutico Guanabara*, 16th ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2014.
3. Parham, H.; Zargar, B. *Talanta* **2001**, 55, 255.
4. Brunton, L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12th ed. McGraw Hill: Rio de Janeiro, 2012.
5. The Merck Index, Royal Society of Chemistry, 2013.
6. The United States Pharmacopeia, 38th ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2015.
7. <http://www.anvisa.gov.br>, acesso em Julho de 2015.
8. Drug Information Handbook: A Clinically Relevant Resource for All Healthcare Professionals. 24th ed, Lexi-Comp Incorporated, 2015.
9. Farmacopéia Brasileira, 5th ed., Atheneu: São Paulo, 2010.
10. B.P. British Pharmacopoeia, The British Pharmacopoeia Commission: The Stationery Office, 2015.
11. Watson, G. D.; *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 2nd ed., Churchill Livingstone: London, 2005.
12. Manoel, J. W.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Brasil, 2013.
13. Gobetti, C.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Brasil, 2013.
14. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*, 1st ed., Editora Unicamp: Campinas, 2006.

15. ICH; International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.
16. Vessman, J. *et al.*; *Pure Appl. Chem.* **2004**, 73, 1381.
17. Shabir, G.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 57.
18. Ribani M. *et al.*; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
19. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
20. http://www.ifrj.edu.br/webfm_send/546, acessada em Agosto de 2015.

ANEXO I

Regras para publicação na Revista Química Nova.