

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISE – UM EXPERIMENTO DE FÁCIL APLICAÇÃO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E OS PRINCÍPIOS DA “QUÍMICA VERDE” NA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS EM BEBIDAS

Nádia Machado de Aragão

Departamento de Química e Exatas, Campus de Jequié, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Av. José Moreira Sobrinho, s/n, 45206-510 Jequié – BA, Brasil

Márcia Cristina da Cunha Veloso

Departamento de Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, 40625-650 Salvador-BA, Brasil

Jailson Bittencourt de Andrade*

Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-115 Salvador - Bahia, Brasil

Recebido em 4/9/08; aceito em 13/5/09; publicado na web em 6/11/09

VALIDATION OF CHROMATOGRAPHIC METHODS – AN EXPERIMENT USING HPLC AND GREEN CHEMISTRY IN METHYLXANTHINES DETERMINATION. The validation of analytical methods is an important step in quality control. The main objective of this study is to propose an HPLC experiment to verify the parameters of validation of chromatographic methods, based on green chemistry principles, which can be used in experimental courses of chemistry and related areas.

Keywords: analytical methods validation; methylxanthines; HPLC.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um novo método analítico ou a adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos em rotina, denominado validação.¹⁻¹⁰ O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)⁸ define validação como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. Esta é a definição que consta da NBR ISO 9000. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁹ considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; faixa linear; robustez; limite de detecção e limite de quantificação.¹⁰ Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.¹⁰

Neste trabalho, serão determinados os parâmetros analíticos para validação de um método de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de metilxantinas em amostras de chás e café, a partir de procedimentos simples e rápidos, possibilitando sua aplicação como experimento alternativo nas disciplinas experimentais dos cursos de graduação e pós-graduação em Química e áreas afins.

As metilxantinas são alcaloides naturalmente presentes em plantas utilizadas na obtenção de bebidas alimentícias ou estimulantes, como chás, café, chocolate, mate e refrigerantes. As mais abundantes são a cafeína (1,3,7- trimetilxantina), a teofilina (1,3-dimetilxantina) e a teobromina (3,7- dimetilxantina).

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinação e quantificação de metilxantinas, entretanto, a CLAE tem sido a técnica mais comumente usada na separação e quantificação destas substâncias.¹¹⁻¹⁴

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos e materiais

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Perkin Elmer série 200 equipado com injetor Rheodyne (Cotati, Califórnia, USA) com amostrador de 20 µL; detector UV-Visível modelo PerkinElmer série 200; coluna cromatográfica Lichrospher 100 RP-18 (244 x 4,4 mm, d.i. 5 µm), acoplada com coluna de guarda Lichrospher (4 x 4 mm). Aparelho digital de ponto de fusão, Microquímica – MQAPF-301; Filtros de celulose (Whatman 41, 0,45 µm); balança analítica Sartorius A 120 s; sistema de filtração Millipore para solventes orgânicos HA, 0,45 µm; ultrapurificador de água, Nanopure Diamond, Barnstead Modelo D11911; Freezer.

Reagentes e solventes

Etanol (grau cromatográfico, 99,9%) e ácido acético glacial (Merck). Cafeína (Carlo Erba, Milão, Itália) purificada por sublimação. Teobromina (M&B) purificada por recristalização. Teofilina (Sigma-Aldrich) purificada por recristalização.

Preparo de soluções padrão e soluções de trabalho mistas

Foram preparadas soluções padrão de cafeína, teobromina e teofilina dissolvendo-se, separadamente, 0,040 g de cada metilxantina em uma mistura: água/etanol/ácido acético (75/24/1% v/v/v). Em seguida, as soluções foram avolumadas em balões volumétricos de 200 mL e filtradas em membranas de 0,45 µm. Estas soluções foram estocadas em frascos escuros a 4,0 °C, permanecendo estáveis por 8 meses.

A partir das soluções padrão, foram preparadas soluções de trabalho mistas contendo as três metilxantinas. As concentrações variaram na faixa de 0,2-30 µg mL⁻¹ (n=11 pontos) para as três metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina). Entretanto, as concentrações de teofilina nas soluções de trabalho mistas eram de 2 a 4 unidades menores que as de cafeína e teobromina, tendo em vista que a resposta do detector para teofilina foi de aproximadamente 1,5 vezes maior quando comparada às

*e-mail: jailsong@ufba.br

outras duas metilxantinas. As soluções de trabalho mistas foram mantidas na geladeira em temperatura de 4,0 °C e substituídas a cada 3 meses.

Preparo das amostras

As amostras de chás e café solúvel foram adquiridas em supermercados. Para as amostras de chás, foram feitas infusões, em 150 mL de água fervente, de quantidades informadas na embalagem (geralmente um saquinho), visando reproduzir as condições mais comuns de consumo. Para café solúvel, foi dissolvido em 150 mL de água fervente, cerca de 1,0 g da amostra (aproximadamente 1,0 colher de chá), conforme instruções constantes na embalagem do produto.

Os extratos obtidos foram filtrados em filtros de celulose quantitativos (filtros duplos), diluídos com a mistura água/etanol/ácido acético (75/24/1% v/v/v), quando necessário, e injetados diretamente no sistema cromatográfico.

Procedimentos

As soluções de trabalho mistas e as amostras foram analisadas por CLAE, modo isocrático, em comprimento de onda de 273 nm, utilizando fase móvel água/etanol/ácido acético (75/24/1% v/v/v) em vazão de 1,0 mL min⁻¹. A adição de ácido acético à fase móvel (pH aparente <3) melhorou significativamente a separação entre teobromina e teofilina.^{12,13} A Figura 1 apresenta o cromatograma, por CLAE-UV, de uma solução de trabalho mista com concentração de 10 µg mL⁻¹ para teobromina e cafeína e 8 µg mL⁻¹ para teofilina, obtido nestas condições.

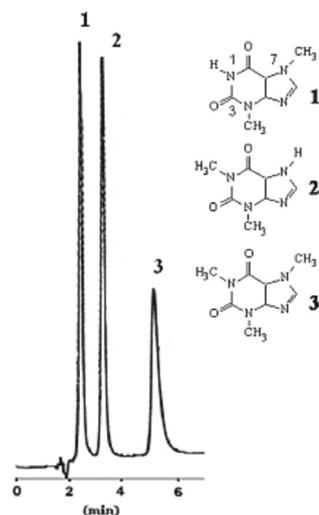


Figura 1. Cromatograma, por CLAE-UV, obtido para solução de trabalho mista (10 µg mL⁻¹ para teobromina e cafeína e 8 µg mL⁻¹ para teofilina) nas seguintes condições: fase móvel água/etanol/ácido acético (75/24/1% v/v/v) em vazão de 1,0 mL min⁻¹. (1-teobromina, 2- teofilina e 3- cafeína)

A quantificação das metilxantinas foi realizada por padronização externa, na qual diversas concentrações dos padrões das substâncias de interesse foram utilizadas para construir curvas analíticas ou através da adição padrão, na qual quantidades conhecidas das substâncias de interesse foram adicionadas às amostras.

Determinação de parâmetros para validação do método

Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.^{8,9}

O método de adição padrão foi aplicado para os estudos de seletividade. Neste caso, foram construídas duas curvas analíticas, uma com as soluções de trabalho mistas adicionadas à matriz e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferências de outros compostos da matriz na determinação da substância de interesse, portanto, o método é seletivo.⁸

Nos estudos de seletividade do método, para cada amostra, foram preparadas duas curvas analíticas: uma com as soluções de trabalho mistas na faixa de concentração de 2 a 30 µg mL⁻¹ (n = 6 pontos, incluindo o zero); e outra contendo 500 µL das soluções de trabalho mistas, nas diversas concentrações, diluídas com 500 µL da amostra. As medidas obtidas, ao se construir a curva analítica com adição da amostra, foram multiplicadas por dois, considerando o fator de diluição. Em seguida, os coeficientes angulares das duas curvas analíticas foram comparados.

Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.¹⁰ A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r², que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA⁹ recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO⁸ um valor acima de 0,90.

Para avaliação da linearidade foram obtidas curvas analíticas de soluções de trabalho mistas, na faixa de concentração de 2–30 µg mL⁻¹ (n = 6 pontos) para teobromina e cafeína e 2–24 µg mL⁻¹ (n = 6 pontos) para teofilina.

Em uma técnica instrumental, a relação linear descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica.¹⁰ A perda de linearidade é característica de cada técnica, portanto, o cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente.¹⁰ Conforme descrito na literatura,¹⁰ para observar se os pontos de uma curva analítica estão inseridos na faixa linear faz-se a razão entre os valores do sinal obtido pelas suas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas. Um gráfico é construído com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo x. Obtêm-se, então, uma linha que deve ser horizontal sobre toda a faixa linear e que corresponde ao valor da média da resposta relativa. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95 e 105% da linha da faixa linear. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105%. A construção da curva com a concentração em escala logarítmica permite melhor visualização da faixa linear

Para determinação da faixa linear de trabalho foram obtidas as respostas em mAU (área de pico) para a faixa de concentração: 0,2 a 30 µg mL⁻¹ (n = 11 pontos) para as três metilxantinas. Os gráficos foram construídos a partir das respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x, para as três metilxantinas.

Robustez

De acordo com o INMETRO,⁸ a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações dos seus valores otimizados. Considera-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando-se o conteúdo de um dos constituintes da fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.¹⁰

Precisão

A precisão foi avaliada em relação aos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para se avaliar a repetibilidade do método, 6 replicatas de cada amostra foram analisadas, sob as mesmas condições e em um mesmo dia de análise, sendo então feita a estimativa do desvio padrão relativo (DPR) destas medidas.

Ao nível de precisão intermediária, a precisão do método foi avaliada a partir da análise de soluções de trabalho mistas de cafeína, teobromina e teofilina em diferentes dias. As análises foram realizadas a partir de soluções com concentração de 2 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, durante 15 dias não consecutivos.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica.¹⁰ Neste método, o limite de detecção (LD) pode ser expresso como na Equação 1:¹⁰

$$\text{LD} = 3,3 \times s/a \quad (1)$$

onde: *s* é a estimativa do desvio padrão da resposta (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e *a* é o coeficiente angular da curva analítica.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado a partir da Equação 2:

$$\text{LQ} = 10 \times s/a \quad (2)$$

Para calcular estes dados, uma curva analítica foi construída utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção. Softwares como Microsoft Excel ou Microcal Origin podem ser usados para calcular os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão relativo destes parâmetros. Portanto, foram obtidas curvas analíticas, na faixa de concentração de 0,2-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*n*=11 pontos), faixa contendo o limite de detecção experimental das metilxantinas e, em seguida, calculados os respectivos parâmetros das curvas.

Exatidão

Os testes de recuperação^{1,8} foram realizados comparando-se os resultados obtidos da análise das amostras puras com os resultados obtidos ao analisar as amostras contendo concentrações conhecidas de padrões.

As quantidades de padrões adicionados foram, aproximadamente, iguais a 1; 1,5 e 2 vezes a encontrada na amostra original. O fator de recuperação (%R) foi calculado subtraindo-se a concentração determinada na amostra adicionada (C_2) da concentração determinada na amostra não adicionada (C_1), dividindo-se pela concentração adicionada (C_3), multiplicando-se por 100, conforme Equação 3:⁸

$$\%R = (C_2 - C_1 / C_3) \times 100 \quad (3)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de seletividade foi realizado comparando-se os valores dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas: a primeira obtida com as soluções de trabalho mistas na faixa de concentração de 2-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*n*=6 pontos, incluindo o ponto zero) e a segunda curva analítica obtida a partir de 500 μL destas soluções diluídas com 500 μL das amostras. Neste caso, quando as inclinações das duas curvas são iguais ou muito próximas e a razão entre os dois coeficientes angulares se aproxima de 1, significa que o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito, ou seja, não há efeito de matriz e, portanto, o método é seletivo.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados obtidos no estudo de seletividade do método para amostra de café solúvel. As razões (r_a) entre os coeficientes angulares das curvas para cafeína, teobromina e teofilina, respectivamente, foram $r_a = 0,99; 1,04; 0,99$. A partir dos valores obtidos de r_a , nenhum efeito de matriz foi observado quando a amostra de café solúvel foi analisada. Os resultados revelam que somente as metilxantinas cafeína e teobromina estão presentes em amostra de café solúvel. A teofilina não foi encontrada.

As curvas analíticas do método com os respectivos coeficientes de determinação, utilizando-se o detector de UV/Vis, na faixa de concentração de 2-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*n* = 6 pontos) para teobromina e cafeína e 2-24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*n* = 6 pontos) para teofilina, estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Curvas analíticas ($y = ax + b$) para determinação de xantinas por CLAE – UV/Vis

Metilxantinas	Curvas analíticas (CLAE – UV/Vis)	r^2
Teobromina	$y = 74569 x - 41763$	0,9983
Teofilina	$y = 74479 x - 26848$	0,9964
Cafeína	$y = 61478 x - 22024$	0,9996

y, área de pico; *x*, concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$); r^2 , coeficiente de determinação.

O estudo da faixa linear de trabalho para cada metilxantina foi feito como complemento ao teste de linearidade, visando a definição do intervalo de concentração no qual fosse possível quantificar de forma segura os analitos. Para isto, foram construídos os gráficos mostrados na Figura 3. Considerou-se como faixa linear de trabalho, os intervalos nos quais os pontos estavam inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico. Para cada metilxantina foram avaliados 11 níveis de concentração.

A análise dos gráficos de resíduos gerados a partir de ajustes de modelos lineares aos dados de calibração revela que os resíduos gerados são pequenos e não apresentam heterocedasticidade e, também, nenhuma tendência que demonstre a falta de ajuste dos modelos, confirmando sua adequação às respostas obtidas.

O teste de robustez foi avaliado realizando-se experimentos com diferentes concentrações de ácido acético na fase móvel, no intervalo de 0,5 a 1,5% e mantendo-se as outras condições otimizadas fixas (vazão da fase móvel de 1,0 mL min^{-1} e composição da fase móvel água/etanol/ácido acético). A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o método apresentou robustez com concentrações de ácido acético no intervalo de 0,8 a 1,2%. Nesta faixa de concentração, as resoluções cromatográficas entre as metilxantinas isoméricas não apresentaram diferenças significativas, no intervalo de 95% de confiança.

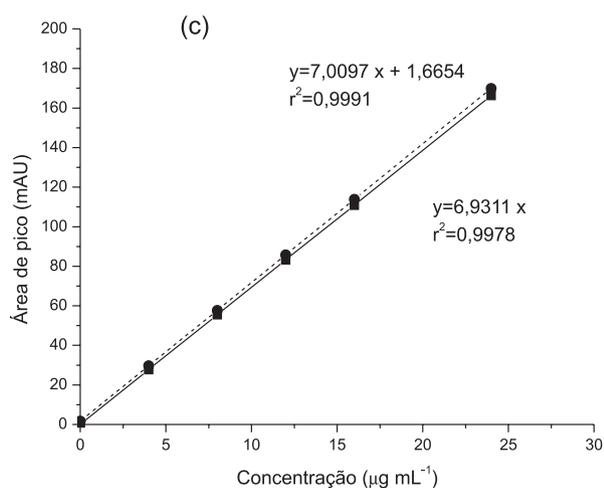
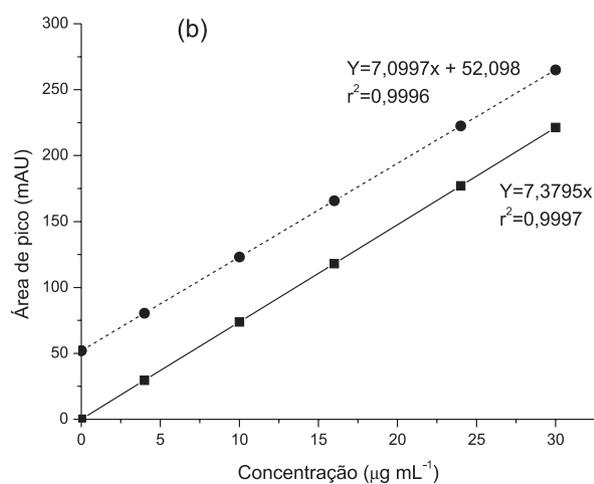
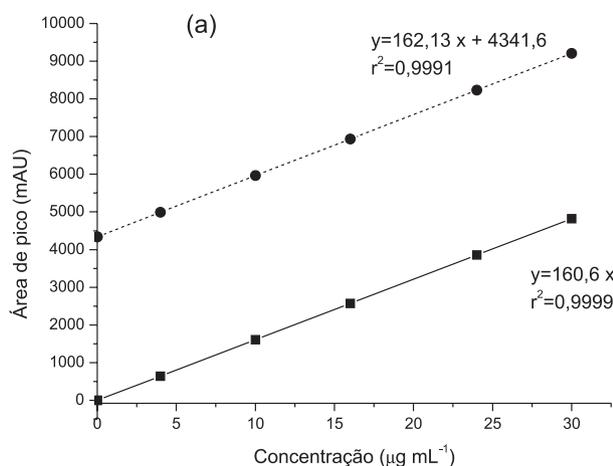


Figura 2. Curvas analíticas das amostras de café solúvel adicionadas de padrões (---●---) e dos padrões puros (—■—). (a) cafeína, (b) teobromina, (c) teofilina

Conforme resultados apresentados na Figura 3, os intervalos lineares de trabalho obtidos neste estudo foram: 0,2 a 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a teofilina; 0,2 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cafeína e teobromina. As curvas analíticas para determinação das metilxantinas devem ser construídas dentro da faixa linear de trabalho obtida e para concentrações mais elevadas devem ser feitas diluições das amostras.

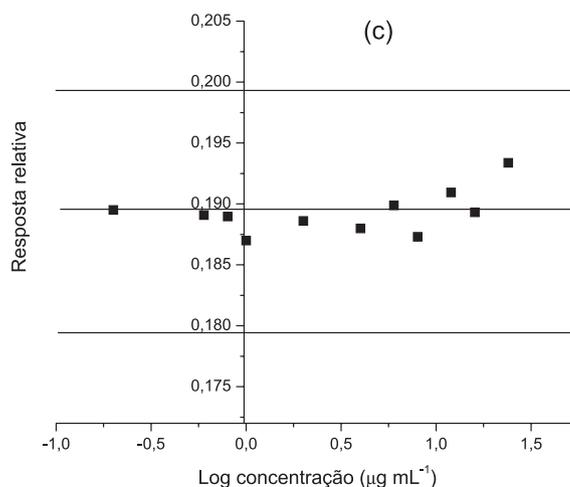
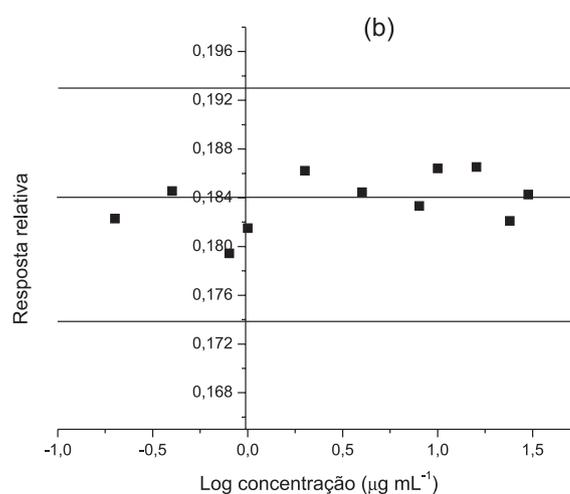
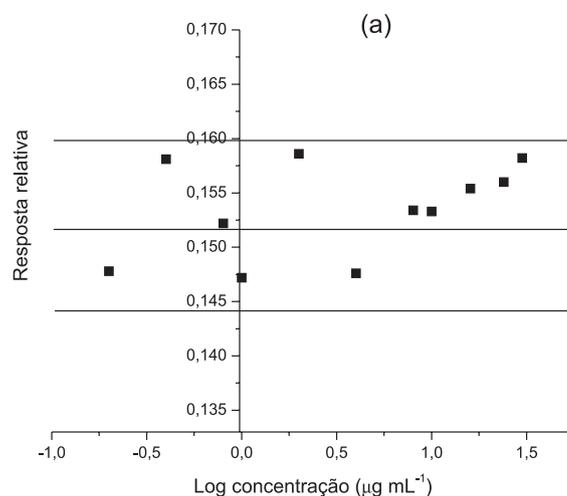


Figura 3. Intervalos de faixa linear de trabalho. (a) cafeína, (b) teobromina, (c) teofilina

Os resultados obtidos nos testes de repetibilidade do método, expressos por meio da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) das medidas de 6 replicatas das amostras, estão apresentados na Tabela 2. Os valores dos DPR obtidos entre 1,1 a 2,5% revelam boa precisão do método.

Tabela 2. Avaliação da precisão, em relação ao nível de repetibilidade do método

Amostras	Cafeína (%DPR)	Teobromina (%DPR)	Teofilina (%DPR)
Café solúvel	2,5	1,8	1,2
Chá verde	1,5	2,2	1,1

(%DPR) – estimativa de desvio padrão relativo (n=6).

A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de soluções padrão mistas de cafeína, teobromina e teofilina em concentração de 2 e 10 µg mL⁻¹, durante 15 dias não consecutivos (n=15 determinações). Os resultados, expressos por meio de estimativa do desvio padrão relativo (DPR), estão apresentados na Tabela 3. Estes resultados revelam que o método fornece resultados com precisão aceitável, em diferentes dias de análise.

Tabela 3. Desvio padrão relativo (%DPR) em diferentes dias de análise

Metilxantina	Padrão	
	2 µg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹
Cafeína	2,6	3,0
Teobromina	1,3	1,4
Teofilina	1,7	2,3

(%DPR) – estimativa de desvio padrão relativo (n=6).

Os resultados para o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), obtidos empregando o detector UV/Vis, estão representados na Tabela 4. Estes resultados revelam detectabilidade elevada do método na determinação de metilxantinas nas amostras em estudo.

Considerando as dificuldades de obtenção de materiais de referência certificados (MRC) para as amostras de chás e café, a exatidão do método foi avaliada a partir das porcentagens de recuperação do analito nas matrizes. Os testes de recuperação são expressos em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, em um determinado número

de ensaios. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e estiveram entre 70 a 105% para as três metilxantinas estudadas e demonstram que o método pode, satisfatoriamente, ser aplicado na determinação de metilxantinas nas amostras em estudo.

Tabela 4. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) na determinação de cafeína, teobromina e teofilina, empregando CLAE-UV/Vis

	Detector UV/VIS	
	LD (µg mL ⁻¹)	LQ (µg mL ⁻¹)
Cafeína	0,20	0,65
Teobromina	0,11	0,38
Teofilina	0,12	0,39

CONCLUSÃO

O presente trabalho propõe um experimento empregando CLAE, para ser utilizado na determinação de metilxantinas em amostras de chás e café, focalizando procedimentos simples para determinação e avaliação dos diversos parâmetros empregados na validação de um método analítico e utilizando reagentes químicos (etanol e ácido acético) menos agressivos para o ambiente e a saúde humana. O experimento terá grande aplicação em cursos experimentais podendo ser utilizando tanto na graduação como na pós-graduação em Química e em áreas afins.

Dentre as diversas vantagens pode-se destacar: o método utiliza amostras de chás e café que são produtos naturais de baixo custo e de fácil aquisição; dispensa tratamento prévio das amostras - tais como técnicas de extração e/ou derivatização, que são etapas que demandariam um maior tempo no experimento - utiliza solventes e reagentes não tóxicos, tais como etanol, água e ácido acético, além de empregar materiais e equipamentos acessíveis em laboratórios de ensino de química analítica instrumental.

Tabela 5. Resultados dos testes de recuperação de metilxantinas em amostras de chá mate e café

	Cafeína (µg mL ⁻¹)				Teobromina (µg mL ⁻¹)				Teofilina (µg mL ⁻¹)			
	C ₁	C ₃	C ₂	%R	C ₁	C ₃	C ₂	%R	C ₁	C ₃	C ₂	%R
Chá Mate ⁽¹⁾	35,62	40,00	77,72	105	10,94	2,00	12,82	94	0,60	2,00	2,21	81
	33,42	60,00	89,98	94	10,45	3,00	13,43	99	0,60	4,00	3,39	70
	35,97	80,00	118,81	103	10,28	4,00	14,06	94	0,60	6,00	6,27	94
Café solúvel ⁽²⁾	27,12	20,00	47,59	101	6,93	8,00	14,78	99	0,43	2,00	1,84	76
	27,12	30,00	55,98	98	6,93	10,00	17,09	101	0,43	4,00	3,59	81
	27,12	60,00	87,99	101	6,93	16,00	23,16	101	0,43	6,00	4,51	70

C₁ = Concentração determinada na amostra não adicionada. C₂ = Concentração determinada na amostra adicionada. C₃ = Concentração adicionada. %R = % Recuperação. (1) fator diluição=2; (2) fator diluição=25 para cafeína e 25/3 para teobromina e teofilina.

AGRADECIMENTOS

Ao PRONEX/FAPESB/CNPq, CAPES e FINEP pelo auxílio financeiro e aos Profs. M. de A. Bezerra (UESB-BA) e W. A. Lopes (UFBA-BA), por valiosas sugestões.

REFERÊNCIAS

1. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
2. Shabir, G. A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 57.
3. Bruce, P.; Minkinen, P.; Riekkola, M. L.; *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 93.
4. Massart, D. L.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B.; *Analysis* **1994**, *22*, M14.
5. Swartz, M. E.; Krull, I. S.; *Pharm. Technol.* **1998**, *2*, 12.
6. Leite, F.; *Validação em Análise Química*, 4ª ed., Ed. Átomo: Campinas, 2002.
7. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2ª ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15.
8. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INIMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.
10. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
11. de Andrade, J. B.; Pinheiro, H. L. C.; Lopes, W. A.; Martins, S.; Amorim, M. M.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 379.
12. Bispo, M. S.; Veloso, M. C. C.; Pinheiro, H. L. C.; De Oliveira, R. F. S.; Reis, J. O. N.; de Andrade, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.* **2002**, *40*, 45.
13. de Aragão, N. M.; Veloso, M. C. C.; Bispo M. S.; Ferreira, S. L. C.; de Andrade, J. B.; *Talanta* **2005**, *67*, 1007.
14. de Maria, C. A. B.; Moreira, R. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 99.