

Validação de Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Análise de Ampicilina em Injetáveis Utilizados em Hospitais Públicos de Recife, Brasil

Ronaldy J.M.C.L. SILVA¹, Tatianne A.L. FARIAS¹, José A.R. FILHO²,
Lúcia FRANCELINO³ & Eduardo J.A. OLIVEIRA*¹

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco- IFPE,
Av. Prof. Luiz Freire, nº. 500, Cidade Universitária- CEP 50740-540- Recife- Pernambuco- Brasil.

² Farmácia de Medicamentos Excepcionais da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco,
Rua Padre Inglês, 288, Boa Vista, CEP 50050-230, Recife-PE, Brasil.

³ Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral -LACEN-PE,
Rua João Fernandes, s/n, Boa Vista, CEP 50050-200 - Recife-PE, Brasil.

RESUMO. Um método de cromatografia líquida de alta eficiência mais econômico devido ao uso de um padrão secundário de ampicilina tri-hidratada foi validado e utilizado para a quantificação de ampicilina sódica injetável em amostras coletadas em seis hospitais públicos da cidade de Recife-PE. A fase móvel foi ajustada com fosfato de potássio monobásico 1M pH 3,0, de forma que a separação dos picos ocorresse em tempo inferior a 12 minutos. As análises foram realizadas em coluna ODS Shim-pack de 250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 µm, em fluxo de 1,5 mL/min e detecção a 254 nm. O método apresentou especificidade, linearidade, exatidão e robustez. Os lotes de ampicilina sódica injetável analisados apresentaram faixa de ampicilina sódica de 96% a 114% da concentração de análise (1,0 mg/mL), atendendo ao especificado na Farmacopéia Brasileira que estabelece um intervalo de aceitação de 90 a 115%.

SUMMARY. "Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Injectable Sodium Ampicillin Used at Public Hospitals in Recife, Brasil". A more economical high performance liquid chromatography method due to the use of a secondary standard of trihydrate ampicillin was validated and used for the quantification of injectable sodium ampicillin in samples collected at six public hospitals of Recife City. The mobile phase was adjusted with 1M monobasic potassium phosphate pH 3.0, so that the separation of the peaks it happened in inferior time to 12 minutes. The analyses were accomplished in column ODS Shim-pack of 250 mm x 4,6 mm, particles of 5 µm, in flow of 1,5 mL/min and detection to 254 nm. The method presented specificity, linearity, accuracy and robustness. The analyzed lots of injectable sodium ampicillin presented range of sodium ampicillin of 96% to 114% of the analysis concentration (1,0 mg/mL), assisting to the specified in Brazilian Pharmacopeia that establishes an interval of acceptance from 90 to 115%.

INTRODUÇÃO

Antibióticos são usados de forma expressiva e algumas classes destes fármacos são inibidoras da formação da parede celular bacteriana. As penicilinas são antibióticos β-lactâmicos inibidores da enzima transpeptidase e constituem uma classe de fármaco de origem natural, ou mais frequentemente semi-sintéticas a exemplo da ampicilina¹ (Fig. 1).

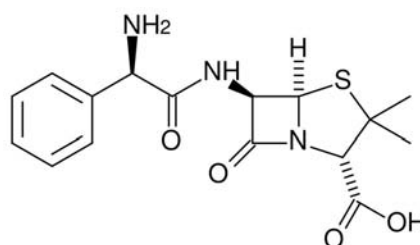


Figura 1. Estrutura química da ampicilina.

PALAVRAS CHAVE: Ampicilina sódica, CLAE, Hospitais, Padrão secundário, Validação.

KEY WORDS: Hospital, HPLC, Secondary standard, Sodium ampicillin, Validation

* Autor a quem a correspondência deve ser enviada: E-mail: edualec@oi.com.br

A ampicilina ainda é considerada de grande importância em tratamentos clínicos de doenças causadas por infecções bacterianas, principalmente em casos graves nos três primeiros meses de vida, sendo utilizada em infecções das vias respiratórias superiores provocadas por *Haemophilus sp.* não produtores de β -lactamase e no tratamento de meningites bacterianas causadas por *Neisseria meningitidis*². É indicada, ainda, para uso terapêutico e/ou profilático nos casos de enteroinfecção, profilaxia cirúrgica, broncopneumonia, infecção neonatal, pielonefrite, e cianose².

A correta concentração do fármaco na forma farmacêutica é de vital importância para que se alcance doses terapêuticas, sem que se atinjam concentrações tóxicas. As penicilinas apresentam neurotoxicidade que adquirem aspectos significativos em crianças menores de dois anos de idade cuja barreira hematocefálica ainda não está completamente desenvolvida³.

Na utilização de um medicamento espera-se que sua ação farmacológica esteja preservada e que a toxicidade mantenha-se em níveis aceitáveis⁴. A sociedade acredita que os medicamentos disponíveis no mercado são de qualidade e que correspondem às suas respectivas fórmulas, proporcionando a atividade terapêutica adequada. No entanto, nem sempre esta é a realidade, como mostram os resultados do Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos - PROVEME realizado no Brasil em 2004. De 551 amostras analisadas, 48 amostras (8,7%) apresentaram resultados insatisfatórios em ensaios físico-químicos. Embora a ampicilina estivesse incluída na relação de medicamentos a serem avaliados, apenas uma amostra de forma farmacêutica injetável foi analisada neste Programa⁵.

A potência da ampicilina pode ser determinada por métodos químicos como a iodometria⁶, físico-químicos como a espectrofotometria de absorção molecular⁸ ou cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE⁹⁻¹³, ou ainda pelo tradicional método microbiológico⁶. A CLAE, por ser um método de separação permite sua utilização como método rápido de análise, ou ainda para o desenvolvimento de estudo indicativo de estabilidade¹².

A utilização de método de ensaio validado, ou seja, capaz de demonstrar que este conduz a resultados confiáveis e adequados à finalidade pretendida de um medicamento, é uma condição essencial para a avaliação da qualidade de produtos farmacêuticos⁷. Na análise de produ-

tos farmacêuticos é preconizado o uso de substâncias químicas de referência (SQR)¹³, material certificado reconhecidamente dispendiosos para análise de rotina e mesmo para as etapas de validação.

O objetivo desse trabalho consistiu em implementar ensaio validado de CLAE-UV simples e acessível, utilizando padrão secundário de ampicilina tri-hidratada, para avaliação da qualidade de ampicilina sódica injetável utilizada em hospitais públicos da cidade de Recife - Pernambuco. O método analítico proposto é bem mais econômico e permite ampliar as análises de controle de ampicilina injetável por CLAE, principalmente para unidades de saúde pública que adquirem seus fármacos por processo de licitação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e matéria-prima

Como substância química de referência (SQR) utilizou-se ampicilina sódica padrão USP, rockville, pureza 100%; Para os testes de eficiência cromatográfica utilizou-se uracil p.a (Sigma®) e cafeína USP. As análises diárias foram realizadas com padrão secundário de ampicilina tri-hidratada (Fluka® pureza $\geq 96\%$). As amostras analisadas foram frascos-ampola de 500 mg e 1g de ampicilina sódica injetável, coletadas pela Farmácia de Medicamentos Excepcionais da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco em seis diferentes hospitais públicos da cidade de Recife-PE. Para a fase móvel foram utilizados acetoneitrila grau HPLC (J. T. Baker®), água ultra pura (C.E. $\geq 18,2$ Mohm.cm), ácido acético (Synth®) e fosfato de potássio monobásico (Synth®). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau pró-análise.

Equipamento

Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Shimadzu® constituído de uma bomba modelo LC-20AT acoplada a degaseificador DGU-20A₅, detector UV/VIS SPD-20AV com módulo controlador CBM-20A. As análises foram realizadas em coluna Shim-pack ODS (250 mm x 4,6 mm, partículas de 5 μ m) e os cromatogramas analisados em programa LC solution versão 1.11 SP1. A fase móvel foi constituída de uma mistura de água:acetoneitrila:fosfato de potássio monobásico 1M pH 3,0: ácido acético 1M (909: 80: 10: 1). A solução de fosfato de potássio monobásico foi preparada dissolvendo-se 13,7g do sal em q.s.p. 100 mL com água ultra pura e o pH ajustado para 3,0 com ácido acético concentrado. A

diluição das amostras e do padrão de ampicilina foi realizada com uma Solução Diluente constituída de fosfato de potássio monobásico 1M, ácido acético 1M e água ultra pura (10:1:989). O fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL/min, o volume de injeção de 20µL e a detecção em comprimento de onda de 254 nm.

Desenvolvimento do Método Analítico

O método analítico fundamenta-se no descrito na USP 32¹³, porém utilizando ampicilina tri-hidratada p.a. como padrão secundário. A fase móvel também foi ajustada para melhores condições de resolução e separação dos picos.

Padrão Secundário de Ampicilina Tri-hidratada

O padrão secundário foi verificado quanto às características de cor e solubilidade de acordo com a Farmacopéia Brasileira¹⁴. A pureza foi determinada através de curva analítica construída com triplicatas de cinco diferentes concentrações de ampicilina SQR-USP (0,752 mg/mL a 1,128 mg/mL). Seis soluções verdadeiras do padrão secundário preparadas na concentração de análise de 1,0 mg/mL foram injetadas em duplicata e a concentração determinada pela equação de regressão da curva analítica.

Validação

A validação do método foi estabelecida seguindo as recomendações da RE 899 da ANVISA⁷, à qual reporta para metodologia de quantificação de fármaco em medicamentos que sejam avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão e robustez.

Especificidade

A especificidade foi demonstrada preparando-se três grupos de soluções. O Grupo 1 foi constituído por quatro soluções amostra de ampicilina sódica na concentração teórica de análise de 1mg/mL em ampicilina; o Grupo 2 constituído por quatro soluções controle padrão na mesma concentração (1mg/mL) e o Grupo 3 Solução Diluente usada em ambos os grupos. As soluções foram filtradas em membrana 0,22 µm e injetadas em volumes de 20 µL. Comparou-se os cromatogramas obtidos com as soluções amostra, padrão e diluente a fim de verificar se não existiam impurezas ou outro interferente na zona de saída do pico de interesse. Realizou-se o teste estatístico "*t*" de Student ($\alpha = 0,05$) para comparação das médias entre amostra e contro-

le, para verificar se as áreas médias não variaram significativamente.

Linearidade

Em dias diferentes foram construídas três curvas analíticas com padrão de ampicilina secundário no intervalo de 80-120% da concentração de análise (0,8 / 0,9 / 1,0 / 1,1 e 1,2 mg/mL). As soluções foram injetadas em triplicata e as curvas construídas com os pontos médios. Em seguida a equação de regressão pelo método dos mínimos quadrados e o valor do coeficiente de correlação (*r*) foram calculados utilizando-se planilha de cálculo Excel®. O teste de significância ANOVA foi aplicado às curvas para verificar possíveis variações estatísticas.

Precisão intra-dia

A precisão intra-dia foi verificada através da avaliação do coeficiente de variação (CV %) da média das áreas dos picos de uma amostra comercial de ampicilina sódica analisada em triplicata, e do CV % da média das injeções em triplicata do padrão secundário de ampicilina tri-hidratada, ambos na concentração de trabalho de 1mg/mL.

Precisão inter-dias

Foi determinada pela repetição das condições do ensaio intra-dia, em um segundo dia de análise, com um número de 10 réplicas para a amostra comercial e de 6 réplicas para o padrão de ampicilina. O CV % da média de todos os pontos analisados foi tomado para avaliação da precisão.

Exatidão

Este parâmetro foi avaliado pelo método de adição de padrão, realizado com três soluções de amostras de ampicilina injetável adicionadas de solução padrão secundário nas concentrações de 80, 100, e 120 % da concentração de trabalho. Inicialmente foram preparadas soluções concentradas da amostra e do padrão secundário, realizando-se diluições de modo a obter soluções das amostras nas concentrações de 40, 60, e 80 %, seguido da adição de 40 % da solução padrão. O parâmetro de avaliação da exatidão foi o cálculo da percentagem de recuperação do padrão de ampicilina adicionada.

Robustez

Alterações deliberadas na composição percentual e pH da fase móvel foram realizadas para avaliar a robustez do método. Uma mistura

de água:acetonitrila:ácido acético 1M:fosfato de potássio monobásico 1 M pH = 3,0 (909:80:1:10) foi submetida inicialmente à condição de solução salina com pH = 2,5, seguido de condição de aumento % da acetonitrila de 50 %. Para cada condição alterada foram avaliados os parâmetros de resolução cromatográficos k' (fator de capacidade) e $FC_{10\%}$ (fator de cauda a 10%), adotando-se $k' < 2,5$ e $FC_{10\%} < 1,4$ como aceitáveis.

Avaliação da Qualidade de Ampicilina Sódica em Uso Hospitalar

Treze amostras de doze lotes diferentes de ampicilina sódica injetável foram coletadas pela Farmácia de Medicamentos Excepcionais da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, em seis grandes hospitais da cidade de Recife-PE. O critério de aceitação para aprovação dos fármacos foi estabelecido com base na concentração analisada e a declarada no rótulo, de acordo com a Farmacopéia Brasileira para ampicilina sódica pó para solução injetável ⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Qualificação do padrão secundário de ampicilina tri-hidratada

A obtenção de padrão secundário utilizando análise por CLAE é uma alternativa para suprir a falta de material de referência ou produtos de valores elevados ¹⁵. O uso de SQR para o processo de validação e análises de rotina de medicamentos torna as análises muito dispendiosas, sendo esta uma oportunidade para verificar as condições de aplicação deste ensaio utilizando um produto pró-análise (p.a) como padrão secundário.

A ampicilina tri-hidratada p.a. padrão secundário apresentou-se como pó cristalino branco, de forma homogênea e sem variações de coloração. O produto dissolveu completamente em solução de NaOH 1M na proporção de 1:30 e a concentração calculada frente à curva com SQR-USP ($y = 3E+06x - 478716$, $r = 0,9951$) foi de 96,9 % (Média = 969 mg/g, DP = ± 21 mg/g, CV = 2,2), confirmando a pureza declarada pelo fabricante (≥ 96 %).

Especificidade

A comparação dos cromatogramas obtidos com o diluente, amostra comercial e o padrão secundário demonstraram ausência de interferentes na zona de saída do pico de interesse (Fig. 2).

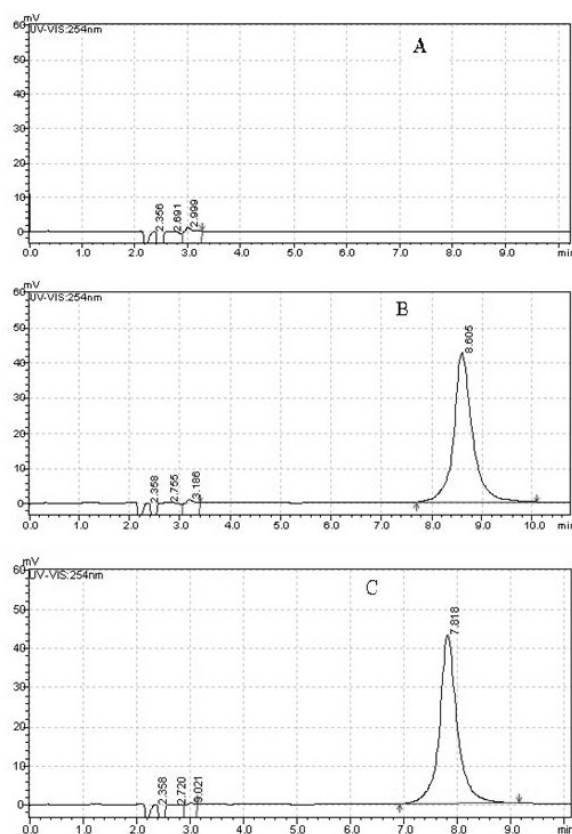


Figura 2. Cromatogramas do Diluente (A), Padrão Secundário (B) e de Amostra de ampicilina sódica comercial (C) em coluna Shim-pack ODS (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m); Fase móvel água:acetonitrila:KH₂PO₄ 1M pH = 3,0: ácido acético 1M (909:80:10:1), vazão 1,5 mL/min, comprimento de onda de 254 nm.

A comparação da média das áreas da amostra comercial frente amostras do padrão secundário não apresentaram diferenças significativas no teste "t" de student ao nível de 5 %, mostrando dessa forma a especificidade do método (Tabela 1).

	Área Média	DP	CV %	$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}
Grupo 1	1053604	48189	4,6	0,7	1,9
Grupo 2	1061350	23177	2,2		

Tabela 1. Análise estatística, teste "t" de Student ($\alpha = 0,05$), utilizada na avaliação da especificidade. Grupo 1 e 2 = amostra comercial de ampicilina sódica (n = 4) e do padrão de ampicilina secundário (n = 4), respectivamente.

Linearidade

A análise de variância (ANOVA) das três curvas analíticas obtidas em dias diferentes não mostrou falta de ajuste ao nível de 2 % ($\alpha = 0,02$; $F = 978,33$; $F_{\text{crítico}} = 7,02$), apresentando um coeficiente de correlação (r) calculado com as médias das três curvas de 0,9999 ($a = 10^{+06}$, $b = +14349$).

Precisão

O grau de concordância dos resultados obtidos com a análise do padrão secundário e de amostras comerciais, tanto nos ensaios intra-dia como inter-dia, encontram-se na Tabela 2. O valor dos CV % em ambos os casos foi menor que 2,5%.

Precisão Intra-dia		
	Ampicilina comercial (n = 5)	Padrão (n = 3)
Área Média	1051667	1038703
DP	6707,70	2260,60
CV %	0,64	0,22
Precisão Inter-dias		
	Ampicilina comercial (n = 10)	Padrão (n = 6)
Área Média	1035095,70	1058341,00
DP	18141,60	21789,40
CV %	1,80	2,06

Tabela 2. Avaliação da precisão intra-dia e inter-dias de amostra comercial de ampicilina sódica injetável e do padrão secundário de ampicilina tri-hidratada na concentração de trabalho (1,0 mg/mL).

Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pela recuperação da ampicilina nas concentrações de 80, 100 e 120% da concentração de trabalho. As recuperações variaram de 95,5 a 103,6% (Tabela 3). A recuperação varia com a substância e o nível de quantificação. Segundo a AOAC ¹⁶ é considerada adequada uma recuperação da ordem de 90 a 108% em análises ao nível de 1000 mg/Kg.

Robustez

A condição de fase móvel escolhida para trabalho foi preparada com fosfato de potássio monobásico 1M/pH 2,5, que proporcionou os

Concentração de ampicilina (%)	Recuperação (%)
80	103,6
	103,1
	101,8
100	99,5
	95,5
	102,3
120	101,1
	101,1
	103,1

Tabela 3. Porcentagem de recuperação da ampicilina nas concentrações de 80, 100 e 120%, na avaliação da exatidão.

seguintes parâmetros de eficiência de separação cromatográfica: k' de 1,17 e $FC_{10\%}$ de 1,0. Quando a concentração de acetonitrila foi aumentada em 50%, foram obtidos valores de k' de 1,4 e $FC_{10\%}$ de 0,97. Em ambos os casos os valores estiveram dentro do critério de aceitação, demonstrando boa separação e simetria dos picos, confirmando a robustez do método.

Avaliação da Qualidade de Injetáveis de Uso Hospitalar Contendo Ampicilina Sódica

O método validado utilizando ampicilina tri-hidratada como padrão secundário foi aplicado na determinação do teor de ampicilina em amostras comerciais de ampicilina sódica injetável (frasco ampola) coletadas em seis grandes hospitais públicos da cidade de Recife-PE, denominados de A, B, C, D, E e F. Das treze amostras, de doze diferentes lotes pertencentes a quatro fabricantes, as concentrações variaram de 96% a 114% (Tabela 4), porém todas estavam dentro do intervalo de aceitação farmacopéico de 90% a 115% ¹⁴.

A verificação da adequação da quantidade do princípio ativo de amostras comerciais torna-se imprescindível, visto que sua ação farmacológica pode assumir um caráter adverso ao qual foi designado ¹⁷, seja por efeitos tóxicos em caso de sobredosagem ou de ineficácia em concentrações subterapêuticas. A expectativa de qualidade de uma forma farmacêutica utilizada em infecções antimicrobianas sistêmicas torna-se ainda maior quando se observa que, na maioria das infecções tratadas com antimicrobianos não são realizadas culturas microbianas ou antibiogramas ¹⁸.

A importância destes resultados pode ser estimada pelos dados de França & Costa ¹⁹ cujos

Hospital	Prouto	Validade	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Real (mg/mL/%)
A	Nova Farma®	mai/09	1,00	1,05/105
	Farmo®	abr/10	1,00	1,14/114
	Amplocilin®	jan/11	1,00	1,05/105
B	Farmo®	out/09	1,00	1,04/104
	Farmo®	set/10	1,00	1,05/105
C	Farmo®	fev/10	1,00	1,03/103
D	Amplocilin®	mar/10	1,00	1,06/106
	Farmo®	mai/10	1,00	0,99/99
	Amplatil®	mai/10	1,00	1,10/110
E	Amplocilin®	set/10	1,00	1,05/105
	Nova Farma®	jun/10	1,00	0,99/99
	Amplocilin®	set/10	1,00	1,09/109
F	Farmo®	mai/10	1,00	0,96/96

Tabela 4. Resultado das análises de ampicilina sódica injetável coletada em seis diferentes grandes hospitais públicos da cidade de Recife-PE.

dados estatísticos para usuários de ampicilina injetável mostraram uma idade média de 4,6 anos, com 37% destes pacientes entre 1 a 3 anos de idade, sendo a ampicilina o antibiótico mais prescrito isoladamente.

Os dados de concentração das ampicilinas injetáveis encontrados neste trabalho mostram teores satisfatórios para todas as amostras, porém com alguns valores próximos aos limites inferior e superior, o que demonstra a necessidade constante de monitoramento das formas farmacêuticas em uso. A utilização de substâncias químicas de referência durante as análises é de fundamental importância, principalmente nas situações em que os produtos apresentam concentrações próximas aos limites inferior ou superior de aceitação. Por outro lado não é incomum encontrar textos científicos sobre validação de métodos analíticos nos quais o uso de SQR ou a etapa de qualificação de padrão secundário não são citados^{8,12,20,21}, inclusive para formas farmacêuticas de ampicilina^{8,12}.

Não é recente a preocupação com a qualidade dos tratamentos clínicos em unidades públicas devido às aquisições de medicamentos baseadas em critério de menor preço, onde cada licitação pode contemplar vencedores distintos com fornecimento de produtos de marcas e lotes diferentes⁴. Os produtos similares analisados neste trabalho espelham esta realidade, dado que de treze amostras colhidas, foram encontrados doze diferentes lotes e quatro diferentes fabricantes (Tabela 4).

CONCLUSÕES

A concentração de ampicilina sódica injetável pôde ser analisada pelo método cromatográfico validado com padrão secundário de ampicilina tri-hidratada. O método apresentou parâmetros de resolução cromatográfica dentro das exigências farmacopéicas, além de atender as recomendações do Guia brasileiro para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - RE 899/2003⁷, demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto.

O uso da ampicilina tri-hidratada como padrão secundário proporciona uma redução nos custos das análises de validação e de rotina.

As amostras de ampicilina sódica injetável analisadas, provenientes de seis grandes hospitais públicos de Recife-PE, apresentaram conformidade nas concentrações declaradas.

REFERÊNCIAS

- Henry, F. & M.D. Chabers (2003) "Antibióticos Beta-lactâmicos e outros Inibidores da Síntese da Parede Celular" em "Farmacologia Básica e Clínica" (Katzung, B), 9ª Ed., Ed. Guanabara Koogan, págs.614-8.
- Romanelli, R.M.C., C.A. Araújo, M.W. Dias, F. Boucinhas, I.R. Carvalho, N.R.L. Martins, H.B.M. Freire. (2008) *J. Pediatr.* **77**: 24-30.
- Janebro, D.I., F.L. Belém, D.S. Pinto, A.C.A. Tomaz, L.M.A. Ximenes (2008) *Lat. Am. J. Pharm.* **27**: 104-9.
- Luiza, V.L., C.G.S.O. Castro & J.M. Nunes (1999) *Cad. Saúde Pública* **15**: 769-76.

5. Brasil, MS, ANVISA (2004) Programa Nacional de Verificação da Qualidade de Medicamentos – PROVEME. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/inspecao/fiscalizacao/proveme/relatorio_dos_primeiros_quadrimestres.htm
6. Farmacopéia Brasileira (2000) 4.ed. São Paulo: Atheneu, Parte II, Segundo Fascículo.
7. Brasil, MS, ANVISA (2003) Resolução nº 899 de 29/05/2003, D.O.U. de 02/06/2003. *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*.
8. Belal, F., H.H. El-Kerdawy, S.M. El-Ashry, D.R. El-Wasseef (2000) *Farmaco* **55**: 680-6.
9. Akhtar M.J., S. Khan, M.A.S. Khan (1993) *J. Pharmaceut. Biomed.* **11**: 375-8.
10. Ishida, M., K. Kobayashi, N. Awata, F. Sakamoto (1999) *J. Chromatogr. B* **727**: 245-8.
11. Brito, R.B. & R.G. Junqueira (2006) *Braz. Arch. Biol. Techn.* **49**: 41-6.
12. Kumar, V., H. Bhutani & S. Saranjit (2007) *J. Pharmaceut. Biomed.* **43**: 769-73.
13. The United States Pharmacopeia (2009) 32th ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention.
14. Farmacopéia Brasileira (2000) 4 ed., São Paulo: Atheneu, vol. 1.
15. Dhooghe, L., K. Mesia, E. Kohtala, L. Tona, L. Pieters, A.J. Vlietinck & S. Apers (2008) *Talanta* **76**: 462-8.
16. AOAC (2002) *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
17. Ruiz, A.M. & C.G.S. Osório-de-Castro (2008) *“Medicamentos: falando de qualidade”*, 1^a Ed. ABIA, páginas 1-54.
18. Meiners, M.M.M.A. & G. Bergsten-Mendes (2001) *Ver. Ass. Méd. Brasil* **47**: 332-7.
19. França, F.B. & A.C. Costa (2006) *RBPS* **19**: 224-8.
20. Silva, G.R., G.P. Lages, G.A. Pianetti, E.A. Nunan, C.D.V. Soares & L.M.M. Campos (2006) *Quim. Nova* **6**: 1159-63.
21. Chaudhari, B.G., N.M. Patel & P.B. Shah (2007) *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 241-6.