

## DETERMINAÇÃO DE 2,5-HEXANODIONA EM URINA EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, APÓS DERIVATIZAÇÃO COM 2,4-DINITROFENIL-HIDRAZINA

Marina Venzon Antunes, Lilian de Lima Feltraco, Fernando Dal Pont Morisso e Rafael Linden\*

Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia RS 239, n. 2755, 93352-000 Novo Hamburgo - RS, Brasil

Recebido em 3/2/10; aceito em 6/6/10; publicado na web em 17/9/10

DETERMINATION OF 2,5-HEXANEDIONE IN URINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER DERIVATIZATION WITH 2,4-DINITROPHENYLHYDRAZINE. A method for quantifying urinary 2,5-hexanedione was optimized and validated. Urine samples were hydrolyzed and derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The analyte was separated in a high performance liquid chromatography system with a diode array detector, using a C18 column (150 x 4.6 mm, p.d. 5  $\mu$ m) and a mobile phase composed of phosphate buffer pH 2.3:acetonitrile (40:60, v/v), at a flow rate of 1 mL/min. The chromatograms were monitored at 334 nm. Retention time was 7.3 minutes. Main validation parameters were: coefficient of determination: 0.9994, accuracy: 96 to 107%; intra-assay precision (RSD): 3.08 to 6.72%; inter-assay precision (RSD): 2.54 to 8.17% and limit of quantitation of 0.19  $\mu$ g/mL.

Keywords: 2,5-hexanedione; HPLC; 2,4-dinitrophenylhydrazine.

### INTRODUÇÃO

O *n*-hexano é um hidrocarboneto amplamente utilizado em diversos processos industriais como solvente orgânico na preparação de tintas, colas, extração de óleos vegetais, bem como diluente na produção de plásticos e borrachas, entre outras aplicações.<sup>1</sup> A exposição ocupacional ou recreacional ao *n*-hexano pode levar ao desenvolvimento de polineuropatias, inicialmente constituídas de disfunção motora e sensorial de progressão lenta, podendo atingir nível sub-agudo, com sintomas predominantemente motores.<sup>2</sup> Na exposição ocupacional, a principal via de introdução deste solvente é através da inalação de seus vapores, embora também possa ser absorvido por via dérmica.<sup>1</sup>

Após a sua absorção, o *n*-hexano é metabolizado por enzimas microssomais a diversos metabólitos, tais como: 2,5-hexanodiona, 2-hexanol, metil *n*-butil cetona e 4,5-dihidroxi-2-hexanona. A neurotoxicidade do *n*-hexano é atribuída à ação do metabólito 2,5-hexanodiona (2,5-HD) (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>).<sup>3,4</sup> Em virtude da alta correlação entre os níveis urinários de 2,5-HD e a exposição ambiental ao solvente, a determinação dos níveis urinários de 2,5-HD é indicada para o monitoramento biológico de exposição ao *n*-hexano.<sup>1,2,5-7</sup>

No Brasil, a Norma Regulamentadora número 7 (NR-7) do Ministério do Trabalho e Emprego estabelece a obrigatoriedade, por parte das empresas e instituições onde trabalhadores são expostos ocupacionalmente ao *n*-hexano, da realização de avaliações periódicas através do monitoramento biológico.<sup>8</sup> A NR-7 determina a quantificação da 2,5-HD em amostras de urina de final de jornada de trabalho e estabelece com Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) a concentração de 5 mg de 2,5-HD por g de creatinina.

Diversos métodos analíticos para a determinação de 2,5-HD em urina, empregando diferentes protocolos baseados em cromatografia a gás, estão descritos na literatura.<sup>1,2,5,9-11</sup> Estes métodos utilizam técnicas de preparação das amostras de urina bastante elaboradas através de processos de extração líquido-líquido ou em fase sólida, frequentemente com etapas de concentração do extrato. Alternativamente foi apresentada por Gori *et al.*<sup>6</sup> uma técnica para determinação de 2,5-HD por cromatografia líquida de alta eficiência

(CLAE), após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH). Esta técnica dispensa etapas de extração e evaporação de extrato, tornando-a atrativa para a utilização na rotina laboratorial. Além disto, considerando que diversos outros indicadores biológicos de interesse na toxicologia ocupacional também podem ser determinados por CLAE,<sup>12</sup> esta alternativa pode reduzir os custos para a implantação de um serviço de monitoramento biológico ao dispensar a necessidade de um cromatógrafo a gás.

O presente trabalho descreve a padronização, otimização e validação de um método baseado no trabalho proposto por Gori *et al.*,<sup>6</sup> para a determinação de 2,5-HD por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD), após etapa de derivatização com DNFH. O método padronizado priorizou a redução do tempo de análise cromatográfica e a diminuição do volume da amostra utilizada. Além disso, considerando a natureza multifatorial da reação de derivatização, foi utilizado um desenho estatístico experimental do tipo Box-Behnken para a otimização dos parâmetros envolvidos nesta etapa da análise.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reagentes e materiais

O padrão de 2,5-hexanodiona foi obtido da Fluka (Buchs, Suíça). Ácido clorídrico 37% e fosfato de potássio monobásico foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, USA). Acetonitrila grau HPLC, ácido fosfórico 85% e hidróxido de potássio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A 2,4-dinitrofenilhidrazina foi obtida da Sigma (Saint Louis, USA). Toda a água utilizada foi purificada através de purificador Pure Lab Ultra proveniente da Elga Lab Water do Brasil (Cotia, Brasil).

#### Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Class VP (Kioto, Japão) composto de um sistema quaternário de bombas LC-10AT, módulo controlador SCL-10A, desgaseificador DGV-14A, forno de coluna CTO-10AS, auto-injetor SIL-10AF e detector de arranjo de diodos SPD-M10A. O sistema de cromatografia foi controlado pelo programa Class VP 6.13 SP2, também fornecido pela Shimadzu.

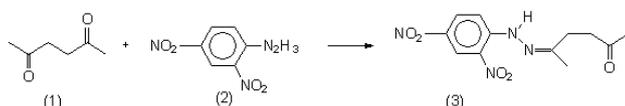
\*e-mail: rafael.linden@feevale.br

### Preparação da fase móvel e condições cromatográficas

A fase móvel foi preparada através da mistura de tampão fosfato pH 2,3 (50 mM) e acetonitrila (40:60, v/v). O tampão fosfato foi preparado através da dissolução de 6,66 g de fosfato de potássio monobásico em 800 mL de água purificada, seguida da adição de 4,8 g de ácido fosfórico 85% (v/v). O volume foi completado para 1000 mL com água purificada e o pH ajustado com a adição de ácido fosfórico ou hidróxido de potássio 0,1 M. O tampão foi filtrado com membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha). Após a mistura com acetonitrila, a fase móvel foi desgaseificada em banho ultra-sônico por 5 min. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. A coluna utilizada foi Shim-Pack RP-18e (150 x 4,6 mm, d.p. 5 µm) da Shimadzu (Kioto, Japão), mantida a 30 °C durante a análise. O volume de injeção foi de 50 µL. A detecção foi realizada a 334 nm, com a aquisição de espectros de varredura entre 200 e 380 nm.

### Otimização da derivatização

A reação da 2,5-HD com DNFH permitiu a obtenção da hidrazona 5-(2,4-dinitrofenil-hidrazinilideno)-hexan-2-ona (DHH), conforme a Figura 1.<sup>6</sup> O nomenclatura proposta para o produto da derivatização seguiu as determinações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).<sup>13,14</sup>



**Figura 1.** Reação de derivatização. (1) 2,5-hexanodiona; (2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina; (3) 5-(2,4-dinitrofenil-hidrazinilideno)-hexan-2-ona

As condições experimentais para a derivatização foram selecionadas através do método de superfície de resposta, que é definido como um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas empregadas para modelar e analisar problemas nos quais uma variável de resposta é influenciada por diversas variáveis operacionais com o objetivo de otimizar esta resposta.<sup>15</sup> Através de um desenho experimental adequado é possível obter uma equação de regressão de 2ª ordem que descreve a relação entre as variáveis do processo e a variável de resposta. Foi selecionado um desenho experimental do tipo Box-Behnken, com as seguintes variáveis experimentais: temperatura de incubação (50, 63 e 75 °C), concentração da função de DNFH (0,3; 1,4 e 2,5 mg/mL) e tempo de incubação (10, 20 e 30 min), com um total de 17 experimentos. A variável de resposta foi a área do pico de DHH (Tabela 1). Os cálculos foram realizados utilizando o programa Design Expert® 7.0 da Stat-Ease (Minneapolis, EUA).

### Preparo das amostras

Em tubo de ensaio com tampa rosca, adicionou-se uma alíquota de 1 mL de urina e 60 µL de ácido clorídrico 37%, que foram mantidos por 30 min em banho-maria com água fervente, para a hidrólise da amostra. Depois de resfriado, 1 mL do hidrolisado foi transferido para tubo de polipropileno de 1,5 mL e centrifugado a 12.000 g por 10 min. Após a centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo com capacidade de 1,5 mL. Posteriormente, foi realizada etapa de derivatização, que seguiu as condições determinadas pelo experimento de otimização. Para tal, foram adicionados 300 µL da solução de DNFH 2,5 mg/mL e 300 µL de acetonitrila, mantendo a mistura protegida da luz, durante a incubação em bloco térmico com temperatura de 65 °C

**Tabela 1.** Desenho experimental de otimização da derivatização da 2,5HD com DNFH

Nº análise	Temperatura (°C)	Concentração de DNFH (mg/mL)	Tempo (min)	Área do pico de DHH (mAU min)
1	50	1,4	10	337.507
2	50	2,5	20	792.196
3	50	0,3	20	247.826
4	50	1,4	30	784.684
5	63	0,3	10	1.055.474
6	63	2,5	10	436.508
7	63	1,4	20	1.006.038
8	63	1,4	20	1.001.225
9	63	1,4	20	930.724
10	63	1,4	20	842.292
11	63	1,4	20	914.471
12	63	2,5	30	1.207.101
13	63	0,3	30	507.219
14	75	1,4	10	650.418
15	75	0,3	20	382.732
16	75	2,5	20	1.011.081
17	75	1,4	30	1.077.567

por 24 min. O derivatizado foi transferido para frasco e inserido no autoamostrador do cromatógrafo.

### Avaliação da seletividade

Amostras de urina de 6 indivíduos não expostos ao *n*-hexano foram processadas e a presença de picos interferentes com o mesmo tempo de retenção do analito foi avaliada, conforme modelo estabelecido em trabalhos prévios para a validação de métodos bioanalíticos.<sup>16</sup> Além disso, foi verificada a pureza espectral do pico de DHH através de rotina própria do programa Class-VP.

### Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração foi utilizada a média de 6 determinações de cada calibrador,<sup>16</sup> nas concentrações 0,35; 0,69; 1,38; 2,75; 5,50; 11,00 e 22,00 µg/mL em mistura de urina de indivíduos não expostos. A curva de calibração foi construída através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, estabelecendo a correlação entre a área dos picos referentes a DHH e as concentrações adicionadas de 2,5-HD (x). A curva foi avaliada com base no coeficiente de determinação (r<sup>2</sup>). A equação de regressão foi obtida empregando o programa Microsoft Excel®.

### Ensaio de precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de análises em três níveis de concentração para cada analito, realizadas em triplicata e repetidas em 5 dias diferentes.<sup>16</sup> Os calibradores utilizados foram preparados em mistura de urina de indivíduos não expostos. As precisões intra-ensaios e inter-ensaios foram calculadas pela análise de variância (ANOVA), usando dia como variável agrupadora. A exatidão foi calculada como percentagem média obtida do valor teórico adicionado na amostra. As concentrações utilizadas no estudo de precisão e exatidão foram 0,72; 5,72 e 15,45 µg/mL.

### Efeito da matriz (recuperação)

Para avaliação do efeito de matriz, foram preparadas soluções padrão de 2,5-hexanodiona em água ultra purificada, que foram derivatizadas e injetadas nos sistema CLAE-DAD em triplicata e em 3 dias, nas mesmas concentrações utilizadas no estudo de precisão e exatidão.<sup>16</sup> Para o cálculo de percentual de recuperação, considerou-se 100 % os valores das médias das áreas da DHH em cada concentração, comparando-se aos valores médios encontrados para as mesmas concentrações no ensaio de precisão e exatidão (preparados em urina).

### Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir do cálculo da concentração correspondente a uma área de pico com 3,3 e 10 vezes, respectivamente, a área do ruído da linha de base produzido pela matriz.

### Amostras de indivíduos expostos ao *n*-hexano

O método foi aplicado no monitoramento biológico de indivíduos expostos ocupacionalmente ao *n*-hexano em análises de rotina do laboratório. Para isto, foram obtidas amostras de urina de 30 indivíduos trabalhadores de indústria calçadista, expostos ocupacionalmente a este solvente através da aplicação de adesivos. As amostras de urina foram colhidas no final da jornada de trabalho do quarto dia sequencial da exposição ocupacional. As análises foram realizadas no dia seguinte a coleta, sendo que as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até o seu processamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização da derivatização

A etapa de derivatização permite a detecção da 2,5-HD por CLAE através da formação de um produto com marcada absorvidade na região espectral do ultravioleta. Entretanto, considerando os diversos fatores que influenciam o rendimento desta reação, as condições experimentais para este procedimento devem ser cuidadosamente avaliadas. A determinação das condições experimentais mais adequadas, propiciando a maior sensibilidade da técnica, apresenta-se como um problema multifatorial, que pode ser abordado por estratégias de tentativa e erro ou, alternativamente, através de experimentos estatisticamente planejados. A segunda abordagem em geral é mais eficiente, minimizando o número de experimentos, e permite modelar matematicamente os processos estudados, permitindo o cálculo de condições otimizadas.

Neste estudo, a otimização da derivatização da 2,5-HD com DNFH foi realizada através de um desenho experimental do tipo Box-Behnken, especialmente devido a sua economicidade (apenas 17 análises) e pela possibilidade de modelar superfícies de resposta e, por consequência, calcular as condições experimentais que maximizam a resposta. As variáveis estudadas foram concentração do agente derivatizante (DNFH), temperatura e tempo de incubação do derivatizado. A variável otimizada foi a área da DHH. Os níveis das variáveis estudadas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. As condições otimizadas foram

avaliadas visualmente através das superfícies de resposta (Figura 2) e calculadas através do programa Design Expert®.

A resposta foi modelada através de uma equação quadrática, incluindo todos os fatores e suas interações. O modelo reduzido, expresso na Equação 1, avaliado através de análise de variância (ANOVA), apresentou adequação de ajuste significativa e falta-de-ajuste não significativa ( $P > 0,05$ ).

$$\text{Área pico} = -4.791.020 + (183.510 \times \text{temperatura}) - (4.570.180 \times \% \text{DNFH}) - (28.255 \times \text{tempo}) + [299.738 \times (\text{DNFH} \times \text{tempo})] - (1391 \times \text{temperatura}^2) \quad (1)$$

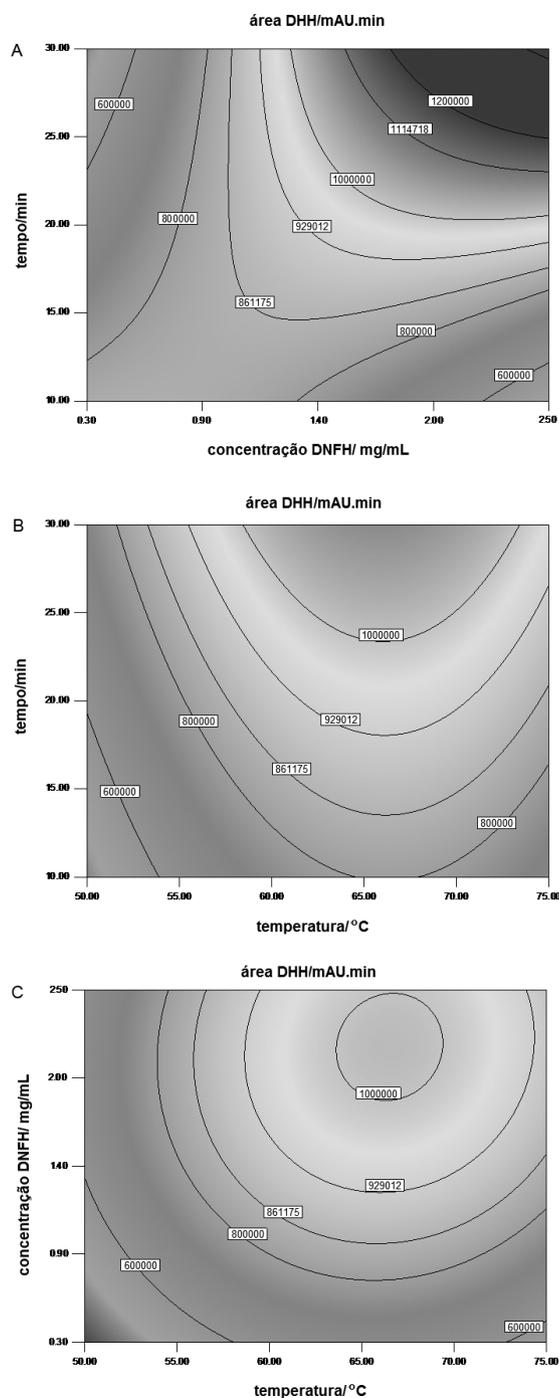
Considerando a adequação do modelo, foi possível calcular condições operacionais otimizadas com base na Equação 1. Dentre as três variáveis estudadas, a concentração de DNFH foi selecionada em seu nível máximo. A eficiência da derivatização aumentou com o aumento da concentração de DNFH até o maior nível avaliado. Por outro lado, o rendimento da reação de derivatização atingiu seu nível máximo na temperatura de 63 °C, conforme gráfico de contornos (Figura 2). Foi observado que, embora houvesse um aumento discreto da resposta em tempos maiores, esta não era significativa. Desta forma, o tempo de incubação foi limitado em 24 min. Portanto, a condição otimizada, selecionada para a obtenção da curva de calibração, para os demais ensaios de validação e para a aplicação do método, empregou solução de DNFH a 2,5 mg/mL, temperatura de incubação de 63 °C e tempo de incubação de 24 min. Gori *et al.*,<sup>6</sup> que determinaram as condições experimentais de derivatização de 2,5-HD empiricamente, utilizaram solução de DNFH a 2 mg/mL, temperatura de incubação de 70 °C e tempo de incubação de 20 min.

### Condições cromatográficas e parâmetros de validação

O tempo total da análise cromatográfica foi de 9 min. O tempo de retenção da DHH foi de 7,3 min. A Figura 3 apresenta cromatograma típico obtido com o método e o espectro do produto formado através da reação de derivatização. O estudo de seletividade com amostras fornecidas por voluntários demonstrou que não há presença de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. Além disso, foi utilizado um sistema de detecção por arranjo de diodos, o que possibilitou a verificação da pureza espectral dos picos, indicando que não estavam presentes outros compostos co-eluindo com a DHH. A curva de calibração, expressa pela função  $y = 95708x - 14510$ , apresentou adequada linearidade, com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9994. Foi possível obter determinações quantitativas com elevada precisão e exatidão, conforme dados obtidos nos experimentos de validação e apresentados na Tabela 2. Os valores obtidos de precisão e exatidão encontram-se dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos preconizados por Shah *et al.* (2000). A técnica apresentou sensibilidade adequada, com limites de detecção e quantificação de 0,07 e 0,19 µg/mL, respectivamente. O método de Gori *et al.*<sup>6</sup> apresentou sensibilidade semelhante, mas com a utilização de amostras com volume cinco vezes maiores que o presente protocolo. A maior sensibilidade obtida pode estar relacionada com a maior eficiência da reação de derivatização, associada ao uso de condições experimentais cuidadosamente otimizadas. A recuperação esteve entre 87 a 93%,

**Tabela 2.** Parâmetros de validação do método

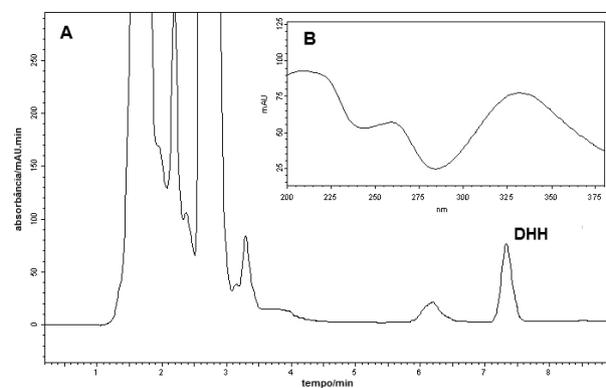
LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)	Concentração (µg/mL)	Intra-dias (C.V. %)	Inter-dias (C.V. %)	Exatidão (%)	Recuperação (%)
0,07	0,19	0,72	6,72	8,17	107	91
		5,72	3,08	2,54	96	87
		15,45	4,05	2,89	99	93



**Figura 2.** Gráficos de contornos. Resposta é a área pico de 5-(2,4-dinitrofenil-hidrazinilideno)-hexan-2-ona, DHH (mAU min). **A:** fatores tempo (min) x temperatura (°C); **B:** fatores concentração DNFH (%) x temperatura (°C); **C:** fatores tempo (min) x concentração DNFH (mg/mL). O terceiro fator sempre foi mantido em seu nível ótimo calculado

demonstrando um pequeno efeito de matriz, aceitável segundo as recomendações usuais para métodos bioanalíticos.<sup>16</sup>

Em comparação ao método proposto por Gori et al.,<sup>6</sup> único relatado na literatura que tal como neste estudo realiza as dosagens de 2,5-HD por CLAE, a partir da sua derivatização com DNFH, a principal vantagem do presente estudo é a redução do tempo de análise cromatográfica, de 25 para 9 min. Trata-se de um ganho considerável de tempo em análises de rotina, além da diminuição de volume de fase móvel empregada em cada análise. Outros aspectos a serem



**Figura 3.** (A) Cromatograma típico de amostra de urina monitorado em 334 nm, (A) Pico 1 (7,3 minutos): 5-(2,4-dinitrofenil-hidrazinilideno)-hexan-2-ona (DHH), 7 µg/mL (B) Espectro ultra-violeta da 5-(2,4-dinitrofenil-hidrazinilideno)-hexan-2-ona

destacados são a redução do volume de urina, de 5 para 1 mL, além da substituição da etapa de filtragem da amostra pela centrifugação em velocidade de 12.000 g, contribuindo para a diminuição dos custos e tempo despendido na processamento das amostras.

Considerando o propósito do método apresentado neste estudo, focada no monitoramento biológico e com valores limiares definidos pela NR-7, os limites de detecção e quantificação são bastante inferiores ao IBMP de 5,0 mg/g de creatinina, considerando níveis usuais de creatinina urinária. Os resultados obtidos através das dosagens de 2,5-HD em 30 indivíduos ocupacionalmente expostos ao *n*-hexano são apresentados na Tabela 3. Os valores encontrados, na faixa de 0,19 a 1,76 µg/mL, estão dentro da faixa de linearidade do método. Também, quando as concentrações de 2,5-HD são relacionadas com a creatinina urinária, nenhum dos indivíduos avaliados ultrapassou os valores do IBMP determinado na NR-7.

**Tabela 3.** Resumos dos resultados das análises realizadas em urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao *n*-hexano

Número de indivíduos	Faixa de valores (µg/mL)	Média ± desvio padrão (µg/mL)
30	0,19 – 1,76	0,45 ± 0,32

## CONCLUSÃO

Foi otimizado, validado e aplicado um método para o monitoramento biológico de exposição ocupacional ao *n*-hexano através de determinação de 2,5-HD urinária empregando CLAE, após derivatização com DNFH. Os parâmetros precisão, exatidão e sensibilidade estão dentro dos critérios de aceitação para métodos bioanalíticos preconizados pela literatura e são adequados para o monitoramento biológico da 2,5-HD. A preparação das amostras é simplificada com relação às técnicas que empregam cromatografia a gás, que exigem processos de extração da amostra. O método desenvolvido utiliza menor volume de urina e possui tempo inferior de análise cromatográfica em comparação com o único outro trabalho publicado que descreve a determinação de 2,5-HD por CLAE.

## REFERÊNCIAS

- Nolasco, D. M.; Gusmão, A.; Siqueira, M. E. P. B.; *Quim. Nova.* **2007**, *4*, 805.
- Prieto, M. J.; Marhuenda, D.; Roel, J.; Cardona, A.; *Toxicol. Lett.* **2003**, *145*, 249.

3. Manini, P.; Andreoli, R.; Mutti, A.; Bergamaschi, I. F.; *Toxicol. Lett.* **1999**, *108*, 225.
4. Kim, M. S.; Park, H. R.; Park, M.; Kim, S. J.; Kwon, M.; Yu, B. P.; Chung, H. Y.; Kim, H. S.; Kwack, S. J.; Kang, T. S.; Kim, S. H.; Lee, J.; *Toxicol.* **2009**, *260*, 97.
5. dos Santos, C. R.; Passarelli, M. M.; Nascimento, S. E.; *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *778*, 237.
6. Gori, A.; Bartolucci, G.; Sturaro, A.; Parvoli, G.; Doretti, L.; Troiano, R.; Casetta, B.; *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1995**, *673*, 165.
7. Oliveira, A. F.; Maia, P.; Paiva, M. J.; Siqueira, M. E.; *J Anal. Toxicol.* **2009**, *33*, 223.
8. [http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_07\\_at.pdf](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_07_at.pdf), acessada em Dezembro 2009.
9. Barroca, M. M.; Silveira, J. N.; Alvarez-Leite, E. M.; *Quim. Nova.* **2003**, *26*, 570.
10. Konidari, C. N.; Stalikas, C. D.; Karayannis, M. I.; *Anal. Chim. Acta.* **2001**, *442*, 231.
11. Strassnig, S.; Gfrerer, M.; Lankmayr, E. P.; *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *813*, 151.
12. Antunes, M. V.; Patuzzi, A. L. M.; Linden, R.; *Quim. Nova.* **2008**, *31*, 1865.
13. [http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/79/r79\\_620.htm](http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/79/r79_620.htm), acessada em Março 2010.
14. [http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/93/r93\\_469.htm](http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/93/r93_469.htm), acessada em Março 2010.
15. Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; *Response Surface Methodology*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-Interscience: New York, **2002**.
16. Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T.; Yacobi, A.; *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1551.