

VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD) EM ESTADO SÓLIDO DE MANCHAS DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD): UM NOVO MÉTODO DE ANÁLISE PARA FITOATIVOS ANTIOXIDANTES

Darlene Gonçalves, Renê O. Couto, Edemilson C. Conceição, Nathasha S. Reis e Eric S. Gil*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74605-220 Goiânia - GO, Brasil

Recebido em 17/3/10; aceito em 3/8/10; publicado na web em 30/11/10

SOLID STATE DIFFERENTIAL PULSE VOLTAMMETRY (DPV) FROM SPOTS OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC): A NEW METHOD FOR ANALYSIS OF ANTIOXIDANT PHYTOACTIVES. A new electroanalytical method coupling TLC-DPV in solid state was developed for quantitative determination of phytoantioxidants with medicinal purpose, e.g. rosmarinic acid (RA) in samples of phytopharmaceuticals, e.g. rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The method showed to be feasible, presenting linearity in concentrations ranging from 0.694×10^{-3} to 9.526×10^{-3} mol L⁻¹ ($r = 0.9945$), good sensibility, selectivity, reproducibility, repeatability, agility and affordable cost. The concentrations of RA in different extracts of rosemary ranged from 0.05 to 0.52 (% w/w), presenting high recovery levels when compared to HPLC.

Keywords: chemically modified electrodes; rosmarinic acid; TLC-DPV.

INTRODUÇÃO

O ácido rosmarínico (AR) é um éster dos ácidos cafeico e 3,4-di-hidroxifenilato, comum nas Boragináceas e na subfamília Nepetoideae das Lamiáceas.¹ Inúmeras atividades biológicas vêm sendo atribuídas a esse marcador, como propriedades antidepressiva,² hepatoprotetora,³ anti-inflamatória,⁴ antiangiogênica,⁵ antitumoral,⁶ antiretroviral⁷ e antimutagênica.⁸ Além disso, é reconhecido como um dos mais potentes fitoativos antioxidantes,⁹ o que justifica uma gama de aplicações, incluindo produtos que vão de conservantes de alimentos e cosméticos, até medicamentos.¹⁰

A identificação e quantificação de marcadores vegetais importantes como o AR garantem autenticidade e qualidade às matérias-primas vegetais e, no caso dos fitoantioxidantes, a eficácia do produto.¹¹ Neste contexto, a análise quantitativa do AR tem sido realizada por meio de métodos cromatográficos demorados e onerosos^{12,13} e o desenvolvimento de métodos mais rápidos, com baixo custo e que também apresentem menor impacto ambiental, tem sido alvo de vários estudos.¹⁴

Os métodos eletroanalíticos pertencem a um grupo de métodos analíticos quantitativos que se baseiam nas propriedades elétricas de uma solução contendo a espécie de interesse (analito) quando este faz parte de uma célula eletroquímica. Assim, a transferência de elétrons ocorre na superfície do eletrodo, sendo dependente do meio da solução eletrolítica e do material do eletrodo. De modo geral, apresentam características analíticas adequadas, como viabilidade, boa seletividade, exatidão, alta sensibilidade, assim como baixos custo e impacto ambiental (baixo consumo de reagentes).^{11,15} Dentre as técnicas mais difundidas destacam-se as voltametrias cíclicas e de pulso diferencial,^{11,15} coulometria e ambas as técnicas acopladas ou indiretas.¹¹ Deste modo, os métodos eletroquímicos apresentam grande aplicabilidade analítica ao estudo dos fitoantioxidantes, já que estes são espécies eletroativas. Estes métodos são, em geral, mais seletivos e sensíveis que os métodos espectrométricos e mais reprodutíveis que os métodos biológicos, como xantina oxidase e peroxidação lipídica.^{16,17}

O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (EQMs) baseia-se, em geral, no uso de espécies que apresentem alguma resposta ou afinidade específica a determinado tipo de ana-

lito. Um grupo de EQMs bastante difundido por sua simplicidade e versatilidade é o dos eletrodos de pasta de carbono (EPCs).¹⁸ Por sua vez, a modificação de EPCs com proporções exatas da espécie eletroativa de interesse pode, segundo a Lei de Faraday, fornecer dados quali e quantitativos.^{11,15}

No caso de fitoterápicos, dada a inerente complexidade química, uma boa alternativa seria proceder a uma separação prévia.¹⁹ Neste contexto, a cromatografia em camada delgada (CCD) é uma alternativa simples, rápida e de baixo custo, que pode ser utilizada para fornecer quantidades exatas de um analito específico. Existem na literatura diversos trabalhos apresentando técnicas envolvendo o acoplamento da CCD com diferentes métodos de detecção,²⁰ incluindo métodos eletroanalíticos.^{21,22} Entre as propostas desenvolvidas para sistemas de detecção eletroquímica em sistemas de cromatografia planar destacam-se aquelas voltadas à determinação quantitativa de íons metálicos.²¹ Nestes sistemas, microeletrodos são colocados diretamente sobre as cromatoplacas e a fase móvel exerce também função de eletrólito suporte.^{21,22} No caso de compostos orgânicos,²² estes dispositivos apresentam além da dificuldade relacionada ao ajuste ótimo do eletrodo de trabalho, maior dificuldade na reprodutibilidade do tamanho das manchas. Estes fenômenos seriam ainda mais evidentes em amostras complexas, como os extratos vegetais. Por sua vez, ainda não foram realizados estudos contemplando o emprego destas duas técnicas na determinação quantitativa de espécies eletroativas em matrizes complexas como insumos fitofarmacêuticos.

Neste artigo, apresenta-se um método eletroanalítico em estado sólido para análise quantitativa do fitoantioxidante ácido rosmarínico, isolado por CCD, em amostras de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), onde a sílica contendo ácido rosmarínico (manchas) foi utilizada no preparo de EPCs, os quais foram analisados por voltametria de pulso diferencial (VPD) e os voltamogramas obtidos permitiram determinar as concentrações deste marcador nas amostras analisadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras, padrões e reagentes

Amostras de tinturas de alecrim foram adquiridas de dois diferentes fornecedores de insumos fitoterápicos no mercado local.

*e-mail: ericsgil@gmail.com

Uma terceira tintura foi obtida, por percolação, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, a partir de uma amostra de folhas coletadas de espécimes localizados no Horto de Plantas Medicinais da Secretaria Estadual da Saúde, Goiânia-Go (863 m, 16°43'50.3" Sul, 49° 14'32.9" Oeste), as quais foram secas à temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas. Ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) foi usado como substância de referência. Etanol (Chemis®, São Paulo, Brasil), óleo mineral (Nujol®, São Paulo, Brasil), grafite em pó (Merck S/A, São Paulo, Brasil), KCl (Synth®, São Paulo, Brasil), HCl (Impex®, São Paulo, Brasil), ácido fórmico anidro (Impex®, São Paulo, Brasil), acetona (Chemis®, São Paulo, Brasil), cloreto de metileno (Chemis®, São Paulo, Brasil), acetonitrila grau CLAE (Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil), metanol grau CLAE (Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil) e água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore®, Bedford, EUA) foram usados como reagentes analíticos.

Cromatografia em camada delgada – CCD

As cromatografias foram realizadas em cromatoplasas de alumínio impregnadas com sílica gel para fluorescência, de 250 µm de espessura (Whatman AL SIL G/UV), sob temperatura ambiente (25 ± 1 °C), utilizando-se cuba cromatográfica apropriada previamente saturada com o vapor da fase móvel composta por acetona:ácido fórmico:cloreto de metileno (25:8,5:85), conforme proposto pela Farmacopeia Portuguesa VIII²³ na monografia de *R. officinalis*. Volumes otimizados de padrões e amostras foram aplicados a 1,5 cm da base da placa e após eluições de 8 cm (tempo médio de 25 min), as placas foram secas à temperatura ambiente em capela. Após 20 min, as manchas correspondentes ao AR eram observadas em luz ultravioleta a 365 nm. A fase móvel e soluções padrão foram preparadas imediatamente antes dos ensaios cromatográficos, sendo todas as análises realizadas em triplicata.

Preparo dos EPCs

As manchas observadas nas cromatoplasas representadas na Figura 1 correspondentes à fração AR das amostras (A1, A2, ... An) e soluções padrão em diferentes concentrações (P1, P2, P3, ... Pn) foram cuidadosamente raspadas com espátulas de plástico para não arranhar a placa de alumínio, recolhidas e guardadas em frasco Ependorff sob refrigeração (4 °C), protegidos da luz e umidade.

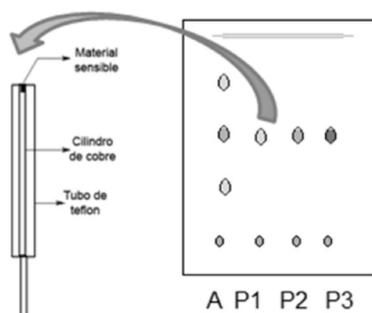


Figura 1. Estrutura do eletrodo de trabalho preparado com manchas de CCD referentes ao AR

As alíquotas de sílica com o analito isolado eram misturadas com grafite em pó e óleo mineral nas proporções de 7-9:25:66-68 (% p/p/p), por no mínimo 10 min. As pastas assim obtidas foram utilizadas no preparo de EPCs (Figura 1) e os mesmos foram submetidos a ensaios eletroanalíticos para a determinação quantitativa do AR. O

preparo das pastas e as análises foram feitos imediatamente após o isolamento das manchas contendo o AR e sílica e nos tempos de 7 e 30 dias após este isolamento.

Voltametria de pulso diferencial – VPD

Para as análises voltamétricas foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato Autolab® III PGSTAT (Eco Chemie®, Utrecht, Holanda) acoplado a um computador equipado com o software PGSTAT 20 versão 4.9 para aquisição de dados e este, conectado a uma célula eletroquímica convencional com sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificado com a sílica contendo o ácido rosmarínico (Ø 2 mm), eletrodo auxiliar de espiral de platina e eletrodo de referência de calomelano. As medidas foram executadas sob temperatura ambiente tendo uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) como eletrólito suporte.

Delineamento experimental preliminar

Para fins de otimização, foram avaliados os efeitos de algumas das principais variáveis envolvidas no método analítico, seguindo um planejamento fatorial completo do tipo Box-Behnken.²⁴ Os níveis dos fatores estudados são apresentados na Tabela 1, que mostra os códigos e valores não codificados de cada fator. Ainda com o mesmo propósito, foram avaliados os efeitos de outros parâmetros da VPD como potencial aplicado, tempo de varredura, velocidade de varredura e amplitude de pulso.

Tabela 1. Fatores codificados e seus níveis no planejamento fatorial Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
V (µL)	5	10	20
T _h (min)	5	10	15
T _a (min)	1	2	4

V = volume aplicado à cromatoplasa; T_h = tempo de homogeneização da pasta; T_a = tempo de acondicionamento do eletrodo no eletrólito suporte.

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

A título de comparação, foram realizados experimentos adicionais visando a quantificação do AR por CLAE. As análises foram realizadas usando um sistema cromatográfico líquido Shimadzu® (modelo LC – 20AT Prominience) equipado de uma bomba quaternária Shimadzu® (LC – 20AT), degaseificador Shimadzu® (DGU – 20A5 Prominience), injetor automático Shimadzu® (SIL – 20A Prominience) e detector PDA Shimadzu® (SPD – M20A Prominience).

As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna Gemini® FR-C18 3 µm (4,6 mm de Ø interno x 250 mm de comprimento) inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato Shimadzu® (CTO – 20A Prominience), empregando como fase móvel uma mistura de acetonitrila a 30% (v/v) e 70% (v/v) de uma solução de acetonitrila: ácido fórmico:água milli-Q (2.5:0.5:97 % v/v)¹² sob fluxo isocrático de 0.5 mL min⁻¹ por 15 min e detecção a 254 nm. A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando-se um módulo controlador Shimadzu® (CBM – 20A Prominience) acoplado a um computador com software Shimadzu® LC Solution.²⁵

Validação da metodologia

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e precisão

intermediária, sendo a análise dos dados realizada seguindo as diretrizes propostas pela Resolução RE 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).²⁶

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento do analito por CCD

Baseado no delineamento desta etapa analítica, o volume de 5 μL mostrou-se o mais adequado, uma vez que possibilitou a obtenção de manchas mais densas e com menor proporção de sílica. No que diz respeito à composição de fases móvel e estacionária, optou-se pelo método oficial, de modo que as tinturas aplicadas nas placas cromatográficas foram devidamente separadas nessas condições. Manchas correspondentes ao padrão de AR em diferentes concentrações (P1, P2, ... Pn) e nas amostras de tinturas (A1, A2, ...An) apresentando Rf de $0,55 \pm 0,02$ foram isoladas para elaboração dos EPCs e análise em estado sólido.

Preparo dos EPCs

O tempo de mistura das pastas de carbono modificadas (PCMs) é, em geral, determinante para uma perfeita homogeneização. Entretanto, não se observaram diferenças significativas nos tempos avaliados, adotando-se o tempo de 10 min. Os eletrodos preparados com material estocado por 7 e 30 dias e analisados por VPD apresentaram perfis voltamétricos bastante idênticos àqueles preparados imediatamente após o isolamento (Figura 2). Tal fato demonstra que o AR permanece estável nas condições de acondicionamento propostas. Também foram avaliadas pastas preparadas com silicone e líquido iônico (cloreto de 1-Butil-2,3-dimetil-imidazol) nas mesmas proporções citadas anteriormente, porém, sem nenhuma alteração significativa. Assim, adotou-se o óleo mineral como agente aglutinante em virtude de seu menor custo que, agregado às inerentes vantagens de EPCS, *i.e.*, baixa corrente de fundo, baixo ruído, amplo intervalo de potencial de trabalho, versatilidade e simplicidade de preparação, fazem destes eletrodos os mais utilizados entre EQMs.²⁷

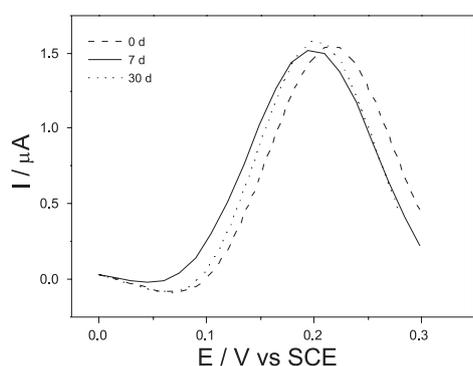


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para eletrodos preparados imediatamente após isolamento da fração cromatográfica contendo AR e após 7 e 30 dias. KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV

Outra grande vantagem desse tipo de EQMs reside na possibilidade de serem realizados estudos quali e quantitativos em estado sólido de espécies eletroativas com baixa ou média solubilidade em meio aquoso.¹⁸ Com base nesta assertiva, sua aplicação pode ser estendida a maioria dos fitocompostos com interesse medicinal, dentre eles os compostos polifenólicos em geral, *i.e.*, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas, entre outros, que frequentemente apresentam

baixa ou média solubilidade em meio aquoso, fato este que limitaria eventuais estudos em soluções desta natureza.

Medidas eletroquímicas

Após preparo das PCMs, verificou-se que o tempo ideal para o acondicionamento deste no eletrólito suporte foi o de 4 min. Tempos menores resultaram em aumento de ruído e da corrente capacitiva, bem como outras distorções relacionadas ao processo de hidratação das pastas. Em contrapartida, tempos excedentes de acondicionamento implicariam em maiores tempos de análise, podendo ainda resultar na lixiviação do analito e consequente redução do sinal. De fato, verificou-se que após 10 min de acondicionamento havia uma queda progressiva dos níveis de corrente, o que pode estar relacionado à moderada solubilidade do AR em meio aquoso. Desse modo, é necessário que se padronize o T_a para PCMs elaborados com material isolado de padrões e amostras.

Em estudos preliminares realizados em nosso laboratório, foi investigado o potencial da redissolução direta de manchas de CCD correspondentes à fração de AR no eletrólito suporte, sendo necessário um tempo mínimo de 20 min (sob agitação) para a lixiviação total (dessorção) do analito da sílica e estabilização dos níveis de corrente (I_{pc}) medidos. Considerando que a maioria dos fitoantioxidantes polifenólicos são tão ou menos hidrossolúveis que o AR, o método aqui proposto (em estado sólido) se mostra mais adequado do que a dissolução direta no eletrólito suporte. Outro aspecto vinculado a fitoantioxidantes diz respeito à adsorção e/ou eletropolimerização de compostos polifenólicos, quando submetidos a potenciais anódicos, resultando em passivação da superfície eletródica e requerendo tempo adicional para renovação da superfície de materiais eletródicos convencionais, *i.e.*, eletrodos de carbono vítreo e platina.^{11,15-18} Outrossim, levando-se em consideração que a análise em CCD é uma prática rotineira no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos,²⁸ a praticidade do método proposto se torna ainda mais evidente. Embora métodos analíticos envolvendo sistemas híbridos com detecção direta,^{21,22} apresentem ainda maior rapidez e praticidade que o procedimento aqui proposto, tais dispositivos apresentam dificuldades operacionais relacionadas ao ajuste ótimo do eletrodo de trabalho sobre a cromatoplaça. Por sua vez, esta dificuldade implica em falta de reprodutibilidade na espessura do filme interfacial de eletrólito suporte (fase móvel), constituindo-se num fator de erro experimental.^{21,22} Outro fator de erro experimental comum em ensaios CCD é a falta de reprodutibilidade do tamanho da mancha, problema este, em geral, maior em compostos orgânicos e bastante comum em cromatogramas de amostras vegetais.^{15,16,22,28} Em contrapartida, o método aqui proposto requer aparatos disponíveis comercialmente, podendo ser executado em qualquer laboratório de controle de qualidade.

Quanto aos parâmetros eletroquímicos, foram investigados aqueles relacionados à velocidade de varredura e amplitude de pulso, constatando-se, respectivamente, valores ótimos de 30 mV s⁻¹ e 50 mV (Tabela 2).

Tabela 2. Ajuste dos parâmetros para VPD

Parâmetros avaliados	Valores investigados	Valores otimizados
Potencial catódico (V)	0,012 e 0,015	0,015
Tempo de varredura (s)	0,4; 0,5 e 0,6	0,5
Vel. de varredura (mv s ⁻¹)	24, 25 e 30	30
Amplitude de pulso (mV)	25, 50 e 75	50

Nas condições otimizadas estabelecidas, obteve-se uma curva padrão linear de $0,694 \times 10^{-3}$ a $9,526 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A equação da reta encontrada foi $I = 3,15869 \cdot C + 1,60309 \cdot r$, onde I é a intensidade de corrente, C a concentração de AR em mol L⁻¹ e $r = 0,9945$. Com

relação aos outros parâmetros de validação avaliados, foram observados limites de detecção e quantificação de $1,2 \times 10^{-5}$ e $3,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, respectivamente, além de boa reprodutibilidade interensaios com coeficiente de variação (CV) de 3,03% e boa repetibilidade intraensaios com CV = 2,2%; todos estes indicadores de qualidade cumprem os requisitos propostos pela legislação vigente.²⁶ A Figura 3 mostra os voltamogramas e a curva correspondente obtidas para eletrodos de pasta de carbono preparados com diferentes proporções de AR.

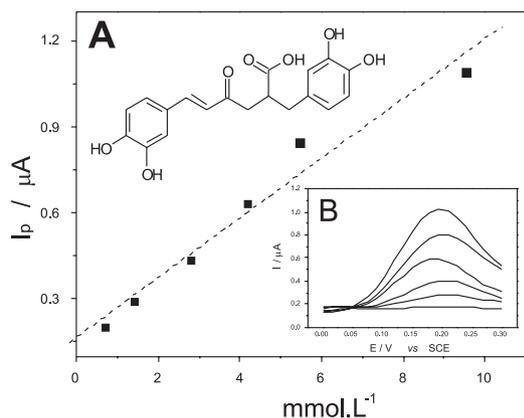


Figura 3. Curva padrão (A) obtida a partir de voltametria de pulso diferencial (B) para pastas elaboradas com diferentes concentrações de ácido rosmarínico ($0,69 \times 10^{-3}$ a $9,52 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. KCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV

Assim sendo, o uso de eletrodos modificados com o analito isolado por CCD mostrou-se eficiente e a voltametria em estado sólido demonstrou ser uma técnica capaz de realizar medidas quantitativas de ácido rosmarínico em amostras comerciais, bem como em amostras preparadas artesanalmente em nosso laboratório (Figura 4).

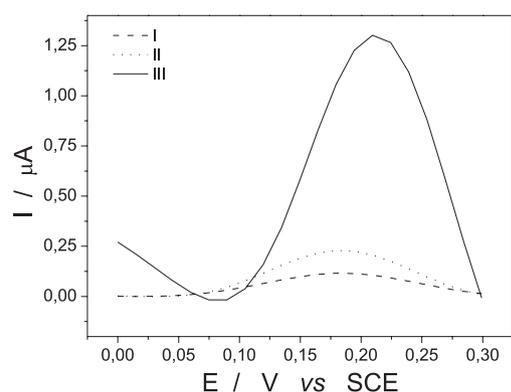


Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial para pastas elaboradas com AR isolado por CCD de diferentes amostras de tinturas de alecrim. I) Tintura comercial, fornecedor A; II) tintura comercial, fornecedor B; III) tintura produção própria. KCl 0,1 mol L⁻¹. pH 7,0. Velocidade de varredura de 30 mV s⁻¹; amplitude de pulso de 50 mV

A partir de cálculos baseados nos dados da curva padrão obtiveram-se concentrações de AR para as diferentes amostras de tinturas, que apresentaram excelente taxa de recuperação quando comparadas a métodos tradicionais como CLAE (Tabela 3). Neste caso, o método apresentou linearidade em intervalos de concentração de 2,5-50 µg/mL, com $r = 0,999$. Nas condições estabelecidas, os tempos de retenção das amostras de padrão de AR em diferentes concentrações e nas amostras de tinturas de alecrim foram de $11,26 \pm 0,03$ e $11,33 \pm 0,07$, respectivamente.

Tabela 3. Taxas de recuperação para método proposto (CCD-DPV) frente a método CLAE, obtidas na análise de diferentes amostras de tintura de alecrim

Amostra	AR / CCD-DPV (% m/m)	AR / CLAE (% m/m)	Taxa de recuperação (%)
Fornecedor A	0,05	0,05	100,0%
Fornecedor B	0,105	0,11	95,5%
Produção própria	0,52	0,54	96,3%

CONCLUSÕES

O híbrido CCD-VPD proposto demonstrou um potencial analítico considerável, uma vez que este apresentou características desejáveis como baixo custo, rapidez e facilidade de execução, linearidade, reprodutibilidade e repetibilidade, além de possibilitar a eliminação do efeito de interferentes, o que culminou no aumento da seletividade e sensibilidade do método, o qual pode ainda ser aplicado a outros fitoantioxidantes em práticas de controle de qualidade de fitoterápicos.

Ademais, estes fatores nos permitem concluir que o método proposto pode ser aplicado com sucesso na quantificação do ácido rosmarínico em insumos fitoterápicos de alecrim, contribuindo na avaliação e garantia da qualidade destes, bem como na manutenção de sua eficácia.

AGRADECIMENTOS

À Arte Pharma Med. Ltda, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (FUNAPE-UFG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Matkowski, A.; *Biotechnology Advances* **2008**, *26*, 548.
- Takeda, H.; Tsuji, M.; Inazu, M.; Egashira, T.; Matsumiya, T.; *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *449*, 261.
- Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Sanbongi, C.; Kato, Y.; Osawa, T.; Yoshikawa, T.; *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *33*, 798.
- Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Yoshikawa, T.; *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 549.
- Huang, S. S.; Zheng, R. L.; *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 271.
- McKay, D. L.; Blumberg, J. B.; *Phytotherapy Research* **2006**, *20*, 619.
- Dubois, M.; Bailly, F.; Mbemba, G.; Mouscadet, J. F.; Debyser, Z.; Witvrouw, M.; Cotellet, P.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2575.
- Furtado, M. A. L.; Almeida, C. F.; Furtado, R. A.; Cunha, W. R.; Tavares, D. C.; *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2008**, *657*, 150.
- Kos, M.; Göger, F.; Can Bas, K. H.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2369.
- Al-Sereiti, M. R.; Abu-Amer, K. M.; Sen, P.; *Indian J. Exp. Biol.* **1999**, *37*, 124.
- Reis, N. S.; Serrano, S. H. P.; Meneghati, R.; Gil, E. S.; *Latin American Journal of Pharmacy* **2009**, *28*, 949.
- Canelas, V.; Costa, C. T.; *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 1502.
- Fecka, I.; Raj, D.; Krauze-Baranowska, M.; *Chromatographia* **2007**, *66*, 87; Almela, L.; Sánchez-Muñoz, B.; Fernández-López, J. A.; Roca, M. J.; Rabe, V.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 221; Troncoso, N.; Sierra, H.; Carvajal, L.; Delpiano, P.; Günther, G.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 20; Fecka, I.; Turek, S.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10908; Kivilompolo, M.; Hyötyläinen, T.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1145*, 155.
- Franzoi, A. C.; Dupont, J.; Spinelli, A.; Vieira, I. C.; *Talanta* **2009**, *77*, 1322; Santhiago, M.; Peralta, R. A.; Neves, A.; Micke, G. A.; Vieira, I.

- C.; *Anal. Chim. Acta* **2008**, *613*, 91; Baskan, S.; Oztekin, N.; Erim, F. B.; *Food Chem.* **2007**, *101*, 1748.
15. Bara, M. T. F.; Serrano, S. H. P.; Asquieri, E. R.; Lúcio, T. C.; Gil, E. S.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 89.
16. Corsino, J.; Silva, D. H. S.; Zandoni, M. V. B.; Bolzani, V. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M.; *Phytotherapy Research* **2003**, *17*, 913.
17. Rapta, P.; Misik, V.; Stasko, A.; Vrabel, I.; *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 901.
18. Gil, E. S.; Serrano, S. H. P.; Bara, M. T. F.; Lucio, T. C.; Gonçalves, A. L. S.; Matos, J. R.; *Br. PI 106048846*, **2006**.
19. De Andrade, C. A.; Costa, C. K.; Bora, K.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; Kerber, V. A.; *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, *17*, 231.
20. Shaw, P. D.; Ping, G.; Daly, S. L.; Cha, C.; Cronan, J. R.; Rinehart, K. L.; Farrand, S. K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6036; Godrich, G. A.; Burrell, H. R.; *Anal. Biochem.* **1982**, *127*, 395; Nicola, A. J.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M.; *Appl. Spectrosc.* **1996**, *50*, 1479; Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; Nakagawa, L. E.; Luchini, L. C.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 196.
21. Smalera, I.; Cheng, I. F.; *Microchem. J.* **1993**, *47*, 182; Petrovic, S. C.; King, D. F.; Dewald, H. D.; *Electroanalysis* **1998**, *10*, 393; Petrovic, S. C.; Dewald, H. D.; *J. Planar Chromatogr. Modern TLC* **1996**, *9*, 269; Aldstadt, J. H.; Dewald, H. D.; *Anal. Chem. (Washington, DC, U.S.)* **1992**, *64*, 3176; Sun, P.; Mirkin, M. V.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8241.
22. Budnikov, G. K.; Kargina, O. Y.; Kargina, N. M.; *Farmatsiya* **1990**, *39*, 60; Brown, G. N.; Birks, J. W.; Koval, C. A.; *Anal. Lett.* **1989**, *22*, 507.
23. *Farmacopeia Portuguesa*, 8ª ed., Infarmed: Lisboa, 2005.
24. Box, M.; Gordon, W.; Hunter, J. S.; *Statistics for experimenters*, John Wiley & Sons: New York, 1978.
25. *Shimadzu High Performance Liquid Chromatography Workstation*; Shimadzu Incorporation, Toquio, 2008.
26. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Resolução RE nº 899*, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial da União 02/07/2003.
27. Souza, M. F. B.; *Quim. Nova* **1997**, *20*, 191; Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1012; Janegitz, B. C.; Marcolino Jr, L. H.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1673; Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 381; Pereira, A. C.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 725; Gorton, L.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 23; Kalcher, K.; Kauffmann, J. M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z.; *Electroanalysis* **1995**, *7*, 5.
28. Gil, E. S.; *Controle físico-químico de qualidade de medicamentos*, Ed. Pharmabooks: São Paulo, 2010.