

Desenvolvimento e Validação de Métodos Espectroanalíticos para Quantificação do Corante Sintético Quinizarina

Emiliane R. Araújo, Fernanda B. Almeida & Fernando L. Primo

O controle da qualidade dos resultados de análises químicas tem sido cada vez mais exigido devido ao grande prejuízo que dados analíticos não confiáveis podem gerar. Sem assim, foi desenvolvido e validado um método espectroanalítico para quantificar o corante sintético quinizarina por espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis. Os métodos apresentaram linearidade, os limites de detecção e quantificação se apresentaram dentro da faixa ideal. Além disso, os métodos foram considerados precisos, exatos e seletivos. Comprovando-se então a adequabilidade para a utilização como métodos espectroanalíticos para quantificação de quinizarina.

Palavras-chave: *quinizarina; validação analítica; espectrofotometria; espectrofluorimetria.*

Quality control of chemical analysis results has become increasingly demanding due to the great damage that unreliable analytical data can cause. Therefore, a spectroanalytical method was developed and validated to quantify the synthetic dye quinizarin by UV-Vis absorption and fluorescence emission spectroscopy. The methods showed linearity and the detection and quantification limits were within the ideal range. In addition, the methods were considered precise, accurate, and selective. This proved their suitability for use as spectroanalytical methods for the quantification of quinizarin.

Keywords: *quinizarin; analytical validation; spectrophotometry; spectrofluorimetry.*

Introdução

A validação analítica é um requisito fundamental para o controle de qualidade da indústria farmacêutica, devido ao impacto que os produtos farmacêuticos podem ter na vida dos consumidores, por isso, é necessário comprovar o padrão de qualidade e a segurança desses produtos. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166/2017:¹ a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

Nesse contexto, os métodos espectroscópicos são uma opção para serem utilizados na validação analítica, pois são métodos fundamentados pelo produto da interação da matéria e energia eletromagnética. A seletividade e sensibilidade destes métodos são dependentes da concentração da amostra, assim como da estrutura química e intensidade ou frequência de energia utilizada.²

Existem diversos métodos espectroscópicos, dentre eles a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de emissão de fluorescência, também chamada de espectrofluorimetria.

A espectrofotometria no UV-VIS é uma técnica robusta, com vasta possibilidade de aplicações sendo amplamente utilizada como uma alternativa aos métodos cromatográficos, devido ao baixo custo do equipamento e volume reduzido de solventes orgânicos.^{3,4}

A espectrofluorimetria compreende a medida da fluorescência emitida quando as substâncias ditas fluorescentes são expostas à radiação ultravioleta, visível ou outras também de natureza eletromagnética. As técnicas analíticas baseadas na detecção de fluorescência são muito populares devido à alta sensibilidade e seletividade, superiores inclusive a espectrofotometria no UV-VIS. Entretanto, existe a limitação de aplicação da técnica, já que somente algumas moléculas apresentam fluorescência.^{5,6,7}

A quinizarina é um corante sintético (1,4-di-hidroxi-9,10-antraquinona) pertencente à classe das antraquinonas e apresenta emissão de fluorescência por possuir ligações de hidrogênio intramoleculares assistidas por ressonância, além disso, apresenta uma banda estruturada de emissão,

devido à formação de estruturas tautoméricas causada pela transferência interna de um próton.⁸ A quinizarina possui a capacidade de se intercalar entre as moléculas de DNA, além de ser foto-geradora de espécies oxidativas e possuir propriedades fotossensíveis para a terapia fotodinâmica, por isso trata-se de uma molécula de interesse como marcadores no tratamento do câncer.⁹

Dessa maneira, a utilização de métodos espectroscópicos para a validação analítica desse corante sintético é uma estratégia de interesse para a indústria farmacêutica. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar métodos espectroanalíticos para quantificação do corante sintético quinizarina.

Materiais e Métodos

LINEARIDADE

Para a determinação da linearidade foi preparada inicialmente uma solução estoque de 1,0 mg/mL da quinizarina (QZN) em dimetil-sulfóxido (DMSO). Para o preparo das soluções de diferentes concentrações foi utilizado o método de diluições sucessivas, utilizando-se de cubeta de quarto com 1 cm caminho óptico, contendo 2 mL de acetonitrila (ACN) e adicionando frações da solução estoque empregando-se micropipeta (*Eppendorf*) de 10 µL para obter as concentrações desejadas.

Para estabelecer as linearidades dos métodos propostos foram construídas três curvas analíticas em seis níveis diferentes de concentrações, variando de 1 a 12 µg/mL (n = 18) para espectrofotometria e 5 a 12 µg/mL (n = 18) para espectrofluorimetria. Nas análises espectrofotométricas foi obedecida a Lei de Lambert-Beer. A análise estatística para avaliação do ajuste do modelo linear foi realizada através dos seguintes testes ao nível de significância de 5 %:

- Determinação do Coeficiente de Correlação;
- Análise de Variância (ANOVA);
- Teste de Falta de Ajuste (*Lack of fit*);
- Avaliação da normalidade dos resíduos (Teste Breusch-Pagan);
- Avaliação de valores extremos na resposta (Análise Gráfica);

- Avaliação da homocedasticidade (Teste Shapiro-Wilk);
- Avaliação de Independência (Teste Durbin-Watson).

LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ) da quinizarina para os métodos desenvolvidos foram determinados a partir da curva analítica resultante do parâmetro linearidade. Os LD e LQ foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente:

$$LD = \left(\frac{DP}{b}\right) \times 3,3 \quad (1)$$

$$LQ = \left(\frac{DP}{b}\right) \times 10,0 \quad (2)$$

Onde, DP é o Desvio Padrão do intercepto com relação ao eixo das ordenadas e b o valor da inclinação da curva analítica.

SELETIVIDADE

Para avaliar a possível interferência dos excipientes utilizados na formulação de Nanocápsulas (NC) foram preparadas soluções padrão de QZN adicionadas com NC vazias (120 µL). As soluções padrão contendo 7,00; 10,00 e 12,00 µg/mL (n = 9) e 9,00; 10,00 e 11,00 µg/mL (n = 9) de QZN foram preparadas para os métodos espectrofotométrico e espectrofluorimétrico, respectivamente. Em seguida, foram realizadas comparações entre os resultados obtidos das soluções padrão contaminadas com NC vazias e as soluções padrão de quinizarina “sem contaminação”. A análise dos dados foi realizada utilizando o Teste t de Student (teste bilateral, p = 0,05).

EXATIDÃO

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada pelo método de recuperação do analito. Neste estudo, foram adicionadas alíquotas de (NC) vazias, previamente desenvolvidas em soluções de diferentes concentrações de QZN (n = 9) e previamente analisadas, sendo a concentração total do analito determinada usando os métodos propostos. A porcentagem de QZN recuperada foi calculada de acordo com a equação 3.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_o}{C_t}\right) \times 100 \quad (3)$$

Onde, Co é a concentração obtida de QZN após a adição de placebo e Ct, concentração teórica de QZN na solução padrão previamente analisada.

PRECISÃO

A precisão foi avaliada pela repetibilidade (precisão intra-dia) e pela precisão intermediária. A repetibilidade foi estudada usando três níveis de concentrações diferentes de QZN: baixa, média e alta, correspondendo a 9,00; 10,00 e 11,00 µg/mL (n = 9). Os valores da precisão intra-dia foram obtidos através da análise de soluções da NC contendo QZN preparadas a partir da solução estoque de NC, analisada no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. Já a precisão intermediária foi determinada em dois diferentes dias e com dois diferentes analistas, levando em consideração as mesmas concentrações utilizadas na repetibilidade.

Durante estes dois dias, a precisão intermediária foi avaliada pelas análises de soluções do analito preparadas a cada dia (n = 18). Ambas repetibilidade e precisão intermediária foram avaliadas pela porcentagem do desvio padrão relativo (DPR %).

Resultados e Discussão

LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade do método de apresentar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra. Dessa forma as análises de regressão linear foram realizadas construindo um gráfico da absorbância *versus* concentração da quinizarina em µg/mL para a curva por espectroscopia de absorção, e intensidade de fluorescência *versus* concentração da quinizarina em µg/mL, conforme ilustrado nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

O ajuste por mínimos quadrados para o método espectrofotométrico revelou um excelente coeficiente de determinação (R²), contudo, um valor de coeficiente de correlação muito próximo da unidade (por exemplo, r > 0,99) não é necessariamente o resultado de uma relação linear e, conseqüentemente, um teste de falta de ajuste deve ser empregado.^{10, 11}

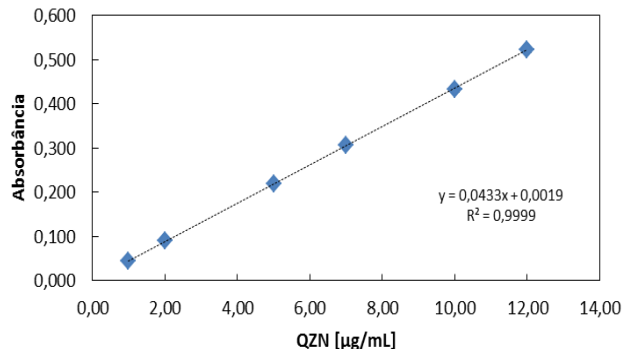


Figura 1. Curva analítica da absorbância em função da concentração de quinizarina na faixa de 1,0 µg/mL a 12 µg/mL (n = 3).

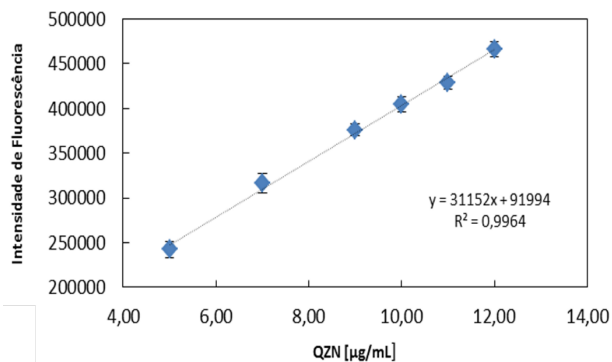


Figura 2. Curva analítica da intensidade de fluorescência em função da concentração de quinizarina na faixa de 5,0 µg/mL a 12 µg/mL (n = 3).

Para confirmar a significância do modelo linear, os dados foram tratados com o auxílio do *software Stat Camp* do Portal *Action*, seguindo como diretriz o Guia para Tratamentos Estatísticos da ANVISA.

A comprovação da significância do coeficiente angular é fundamental para que seja demonstrada a linearidade do método. Essa avaliação é realizada por meio do teste F da Análise de Variância (ANOVA) que permite avaliar se uma determinada reta de regressão estimada explica satisfatoriamente a relação existente entre a concentração e a resposta. Dessa forma, a avaliação da significação do modelo obtido para os métodos espectrofotométrico e espectrofluorimétrico, foi realizada através do

teste F da ANOVA, testando as seguintes hipóteses: H0: coeficiente angular igual à zero; H1: coeficiente angular diferente de zero. As Tabelas 1 e 2 apresentam a ANOVA para o modelo linear dos métodos validados:

Tabela 1. Tabela ANOVA para o método espectrofotométrico.

	gl ^a	SQ ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab}	p-valor
Regressão	1	0,533578	0,533578	44704,90	4,49	0,0000*
Resíduos	16	0,000191	1,2E-05			
Total	17	0,533769	0,533769			

*p ≤ 0,05; a graus de liberdade; b soma de quadrados; c quadrados médios.

Tabela 2. Tabela ANOVA para o método espectrofluorimétrico.

	gl ^a	SQ ^b	MQ ^c	F _{cal}	F _{tab}	p-valor
Regressão	1	9,8988E+10	9,8988E+10	1304,93	4,49	0,0000*
Resíduos	16	1,2137E+09	7,7857E+07			
Total	17	1,0020E+11	9,9064E+10			

*p ≤ 0,05; a graus de liberdade; b soma de quadrados; c quadrados médios.

Como para ambos os métodos, o F calculado da ANOVA foi significativo e maior que o F tabelado, não se rejeitou a significância do modelo linear ao nível de 5 %, Sendo assim, aceitou-se a hipótese alternativa de que o coeficiente angular é diferente de zero e rejeitou-se a hipótese nula.

A avaliação do intercepto (coeficiente linear) pode trazer informação importante a respeito do modelo linear, por isso, este também foi avaliado. É recomendado que seja verificado, por meio do teste t, se o coeficiente linear é ou não estatisticamente diferente de zero. Para a estatística do teste t de *Student* foram testadas as seguintes hipóteses: H0: intercepto (coeficiente linear) igual à zero; H1: intercepto diferente de zero.

As Tabelas 3 e 4 apresentam as estimativas dos parâmetros (coeficientes de regressão) e também a estatística t para os métodos validados:

Tabela 3. Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofotométrico.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	0,001996	0,001503	1,3281	0,2028*
Nível	0,043307	0,000205	211,4353	0,0000*

* $p \leq 0,05$

Tabela 4. Estimativa dos coeficientes e análise do intercepto para o método espectrofluorimétrico.

	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	91993,56	8028,31	11,4586	0,0000*
Nível	31152,38	862,38	36,1238	0,0000*

* $p \leq 0,05$

Como para ambos os métodos, o p-valor do teste t é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese nula (intercepto igual a zero) ao nível de significância de 5%, logo o coeficiente linear é igual a zero.

Para avaliação da homocedasticidade, ou seja, se as variâncias são constantes, foi aplicado o teste de Breusch Pagan para atestar as hipóteses: H_0 : variâncias dos níveis são iguais; H_1 : pelo menos uma variância diferente.

A Tabela 5 apresenta os resultados do teste de Breusch Pagan para os métodos validados.

Tabela 5. Avaliação da homocedasticidade.

Método	Estatística	gl	p-valor
Espectrofotométrico	2,312259	1	0,128357
Espectrofluorimétrico	0,451879	1	0,501444

Como o p-valor do teste de Breusch Pagan, obtido para ambos os métodos foi maior que 0,05, não se rejeitou a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Ou seja, aceitou-se a hipótese nula, a qual diz que o modelo é homocedástico e a variância são constantes para todos os níveis.

Após a verificação do ajuste do modelo linear, foi realizado o diagnóstico dos resíduos. Para averiguar a normalidade foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, conforme apresentado nas Tabelas 6 e 7, assumindo as seguintes hipóteses: H_0 : resíduos seguem uma distribuição normal; H_1 : resíduos não seguem uma distribuição normal.

Tabela 6. Teste de normalidade para o método espectrofotométrico.

	Estatística	p-valor
Shapiro-Wilk	0,954048	0,491977

Tabela 7. Teste de normalidade para o método espectrofluorimétrico.

	Estatística	p-valor
Shapiro-Wilk	0,969718	0,792373

Como para ambos os métodos validados, o p-valor do teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05, não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. Portanto, os resíduos seguem uma distribuição normal.

A verificação dos valores extremos na resposta foi realizada através da avaliação dos resíduos padronizados e dos resíduos *studentizados*. Como critério, normalmente, são considerados valores extremos na resposta as observações com resíduos padronizados e/ou *studentizados* maiores que 3.12

As Figuras 3 e 4 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e *studentizados*, respectivamente, para o método espectrofotométrico.

As Figuras 5 e 6 apresentam os gráficos dos resíduos padronizados e *studentizados*, respectivamente, para o método espectrofluorimétrico.

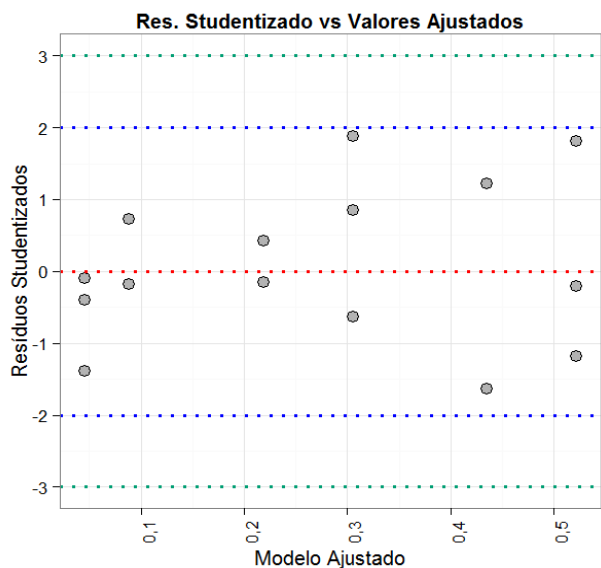


Figura 3. Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofotométrico.

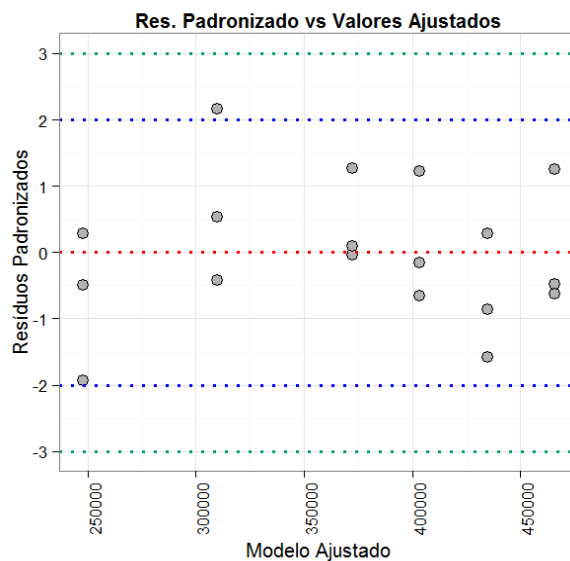


Figura 5. Gráfico dos resíduos padronizados para o método espectrofluorimétrico.

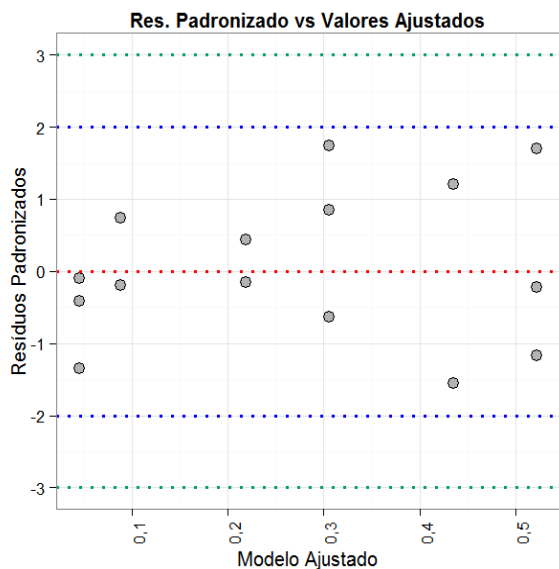


Figura 4. Gráfico dos resíduos studentizados para o método espectrofotométrico.

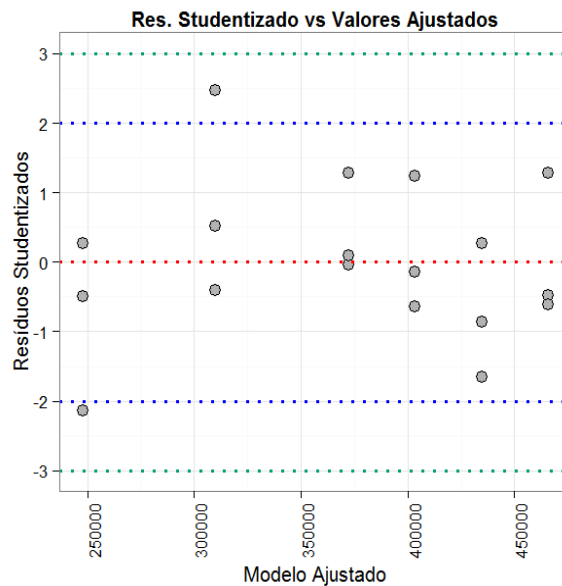


Figura 6. Gráfico dos resíduos studentizados para o método espectrofluorimétrico.

Pela avaliação gráfica das Figuras 3, 4, 5 e 6 não foram detectados valores extremos nos resíduos, portanto, nenhuma observação apresentou grandes afastamentos das demais na série de dados, indicando que o ajuste do modelo foi equivalente para todas as observações em ambos os métodos validados.

A independência das observações foi avaliada através do teste de Durbin-Watson, onde as seguintes hipóteses foram testadas: H_0 : observações são independentes; H_1 : observações não são independentes.

Tabela 8. Avaliação da independência pelo teste de Durbin-Watson.

Método	Estatística	p-valor
Espectrofotométrico	2,139252	0,51464
Espectrofluorimétrico	2,380275	0,716228

Como para ambos os métodos, o p-valor do teste de Durbin-Watson foi maior que 0,05 não rejeitamos a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5 %, logo as observações são independentes.

LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Os métodos demonstraram ser sensíveis com LD de 0,15 µg/mL e 1,35 µg/mL para a espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente. Já o LQ foi de 0,47 µg/mL para o método espectrofotométrico e de 4,10 µg/mL para o método espectrofluorimétrico. Através da determinação dos limites de detecção e quantificação é possível demonstrar que os métodos possuem sensibilidade nas faixas de trabalho de 1 a 12 µg/mL (espectrofotométrico) e 5 a 12 µg/mL (espectrofluorimétrico).

SELETIVIDADE

Para avaliar a possível aplicação analítica dos métodos propostos, foi estudado o efeito dos excipientes comumente usados na preparação de nanocápsulas (NC) sobre os parâmetros espectroscópicos. A

seletividade dos métodos foi confirmada depois de observar que os excipientes não interferiram sobre os espectros de absorção e fluorescência da QZN em 477 e 566 nm, espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente.

Os valores de t calculado (Tabela 9) foram menores do que o valor crítico de t tabelado (2,776 para grau de liberdade 4 e limite de confiança de 95 %). Tais resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das soluções padrão de QZN contaminadas com alíquotas da formulação de NC vazia e a média de soluções padrão do analito sem contaminação ($p > 0,05$). Portanto, ambos os métodos são capazes de quantificar especificamente QZN.

Tabela 9. Estudo de seletividade para os métodos espectrofotométricos (EFO) e espectrofluorimétrico (EFU).

Método	Concentração Teórica de QZN	Concentração* experimental solução padrão de QZN	Concentração* solução padrão de QZN contaminada com NC vazia	t-calculado
EFO	7,00	7,05 (± 0,093)	6,68 (± 0,023)	0,017
	10,00	9,98 (± 0,106)	9,69 (± 0,027)	0,061
	12,00	12,01 (± 0,106)	12,21 (± 0,027)	0,112
EFU	9,00	9,12 (± 0,195)	8,28 (± 0,032)	0,021
	10,00	10,04 (± 0,262)	9,20 (± 0,006)	0,030
	11,00	10,81 (± 0,248)	10,23 (± 0,003)	0,057

*Resultados são concentrações médias (± DP) em µg/mL para três diferentes amostras.

EXATIDÃO

A exatidão dos métodos analíticos foi determinada pela adição de quantidades da NC vazia à quantidades conhecidas de QZN padrão pré-analisadas, ou seja, de concentração conhecida. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 10 e são expressos como a porcentagem de recuperação do analito adicionado e DPR (%).

Tabela 10. Resultados para a determinação da exatidão do método espectrofluorimétrico e espectrofotométrico.

Método	QZN Teórica (µg/mL)	QZN Obtida (µg/mL)*	Recuperação (%)**	DPR (%)
Espectrofluorimétrico	9	9,04	100,5 (± 3,10)	3,1
	10	9,96	99,6 (± 3,23)	3,2
	11	10,73	97,6 (± 2,70)	2,8
Espectrofotométrico	7	7,05	100,8 (± 1,33)	1,3
	10	9,98	99,8 (± 1,06)	1,1
	12	12,01	100,1 (± 0,88)	0,9

*Resultados são concentrações médias (± DP) para três diferentes amostras.

**Resultados são médias (± DP) para três diferentes amostras.

Como pode ser observada, a porcentagem média da recuperação foi de 97,6 % a 100,5 % para o método de emissão e 99,8 % a 100,8 % para o método de absorção, bem como DPR menor do que 5 %. Estes resultados demonstram que qualquer mudança pequena na concentração de QZN em soluções pode ser exatamente determinada pelos métodos analíticos desenvolvidos indicando um excelente acordo entre as quantidades teórica e encontradas.

PRECISÃO

Para o método espectrofotométrico, as análises intra-dia revelaram desvio padrão relativo (DPR) de 2,93 %, enquanto para o método espectrofluorimétrico o DPR foi de 0,72 %, para 9 determinações cada um (n = 9), conforme demonstrado nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Conforme a literatura o limite máximo especificado para o nível de concentração do analito utilizado é de 5 %.¹³

A precisão intermediária foi expressa como a variação intra-laboratorial em dois dias diferentes preparada por

dois analistas. Em ambos os métodos, os valores de DPR foram menores do que 5 %, conforme demonstrado nas Tabelas 11 e 12. O DPR (n = 18) foi de 0,87 % e 2,31 %, em dias diferentes para espectrofotometria e espectrofluorimetria, respectivamente. Portanto, os resultados da precisão indicam a proximidade de acordo entre as várias medidas de quantificação da QZN realizadas sobre as mesmas condições operacionais durante um curto intervalo de tempo, bem como durante um longo período e com diferentes analistas.

Tabela 11. Resultados para a determinação da precisão do método espectrofotométrico.

Precisão	Concentração (µg/mL)	Concentração (%)	DPR (%) (n = 9)
Intra-dia	8,99	99,89	2,93
	9,34	103,78	
	8,79	97,67	
	9,82	98,20	
	10,33	103,30	
	9,73	97,30	
	10,58	96,18	
	11,07	100,64	
	10,54	95,82	
	9,12	101,33	
	9,24	102,67	
Intermediária	10,18	101,80	1,36
	9,87	98,70	
	10,89	99,00	
	11,15	101,36	
DPR (%) (n = 18)			0,87

Tabela 12. Resultados para a determinação da precisão do método espectrofluorimétrico.

Precisão	Concentração (µg/mL)	Concentração (%)	DPR (%) (n = 9)
Intra-dia	7,02	100,29	0,72
	7,1	101,43	
	6,99	99,86	
	10,11	101,10	
	10,01	100,10	
	9,92	99,20	
	12,08	100,67	
	11,98	99,83	
	11,95	99,58	
	7,07	101,00	
	7,14	102,00	
	6,95	99,29	
10,09	100,90		
Intermediária	9,96	99,60	1,05
	9,89	98,90	
	12,13	101,08	
	11,99	99,92	
	11,92	99,33	
DPR (%) (n = 18)			2,31

Conclusão

A partir dos dados obtidos é possível concluir que os métodos espectroanalíticos desenvolvidos possuem linearidade satisfatória, pois, em ambos, o coeficiente de correlação apresentou-se na ordem de 0,99, dessa forma é possível obter a concentração real do composto associado a sistemas nanocarreadores. O ajuste do modelo linear adequado também foi comprovado por meio da análise de resíduos demonstrado através dos testes estatísticos.

Os limites de detecção e quantificação demonstraram que os métodos possuem boa sensibilidade. Ambos os métodos validados foram considerados seletivos tendo em vista que nenhum dos componentes do sistema nanocarreador

apresenta interferência direta nos parâmetros utilizados pelo método.

Os métodos também foram considerados precisos e exatos, haja vista que o DPR não foi superior a 5 % para o ensaio de precisão, em ambos os métodos e a recuperação apresentou-se dentro da faixa de 99,8 % a 100,8 % para o método espectrofotométrico e 97,6 % a 100,5 % para o método espectrofluorimétrico, dentro dos valores especificados na literatura.

Dessa forma, conclui-se que os métodos espectroanalíticos validados são adequados ao uso na rotina de controle de qualidade do corante sintético quinizarina. O desenvolvimento dos métodos espectroanalíticos em substituição aos métodos cromatográficos, comumente utilizados na rotina do controle de qualidade de produtos farmacêuticos, possibilita garantir resultados mais rápidos e com menor gasto de tempo, além da utilização de um menor volume de solventes durante o preparo das amostras.

AVISO DE DIREITOS AUTORAIS

Todos os resultados desse manuscrito foram previamente publicados na forma de Dissertação de Mestrado, intitulada Validação de método espectrofotométrico UV-VIS e espectrofluorimétrico para determinação de corante vermelho de origem biotecnológica associado a nanocarreadores, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) em 2019.

Referências

- BRASIL, 2017. Resolução RDC nº 166/2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 24 de julho de 2017.
- GIL, E. de S. et al. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. São Paulo: Pharmabooks, v. 46, p. 103-104, 2007.
- BARBOZA, F. M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 747-749, 2010.

- WEINERT, P. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafíl em formulações farmacêuticas. *Química Nova*, p. 1112-1116, **2008**.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1. 6ª Ed. Brasília, **2019**.
- VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons, **2012**.
- SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, p. 1755-1774, **2008**.
- SABATINI, C. A. Investigação da hidrólise enzimática de derivados da quinizarina por espectroscopia e microscopia de fluorescência. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MACHATOVÁ, Z. et al. Study of natural anthraquinone colorants by ear and UV/vis spectroscopy. *Dyes and Pigments*, v. 132, p. 79-93, **2016**.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE et al. Is my calibration linear? *Analyst*, v. 119, n. 11, p. 2363-2366, **1994**
- GONZÁLEZ, A. G. et al. The correlation coefficient attacks again. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 11, n. 5, p. 256-258, **2006**.
- PORTAL ACTION. ESTATCAMP – Consultoria Estatística e Qualidade, por DIGUP – Desenvolvimento de Sistemas e Consultoria Estatística. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>. Acesso em out. de **2018**.
- MORETTO, L.D.; CALIXTO, J. *Qualificações e Validações: Guia Sindusfarma para a Indústria Farmacêutica*. Sindusfarma, **2016**.

Emiliane R. Araújo, Fernanda B. Almeida & Fernando L. Primo*

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Engenharias de Bioprocessos e Biotecnologia, Araraquara, Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, CEP 14800-903, Brasil.

*E-mail: fernando.primo@unesp.br