

## Desenvolvimento de técnica analítica para validação de corticosteroides em CLAE-UV

### Development of an analytical technique for corticosteroid validation in HPLC-UV

#### RESUMO

**Objetivos:** Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de corticosteroides. **Material e Métodos:** Foram preparadas soluções dos corticosteroides hidrocortisona, dexametasona e betametasona com metanol obtendo-se as concentrações de 400 µg/ml. Em seguida preparou-se a partir das mesmas, soluções com metanol/água de concentração entre 5 e 60 µg/ml e então realizou-se os testes para validar a metodologia. A leitura foi realizada com sistema cromatográfico de injeção manual, composto por 2 bombas, 1 controlador, sistema degasser e detector UV-Vis; fase estacionária: coluna cromatográfica Kinetex Phenomenex C18 150 x 4,6 mm x 5µ; fase móvel 70% metanol e 30% água ultra purificada, fluxo de 1 mL/min e comprimento de onda em 250 nm. **Resultados:** A validação apresentou respectivamente para os corticoides hidrocortisona, dexametasona e betametasona: linearidade:  $r = 0.997$ ;  $r = 0.997$ ;  $r = 0.996$ ; precisão com coeficiente de variação máximo de 1,8; 1,72 e 2,70; exatidão máxima de 3,55; 3,25 e 2,76. A metodologia mostrou-se robusta e seletiva. **Conclusão:** O método apresentou resultados satisfatórios, possibilitando sua utilização para validação e determinação dos fármacos em estudo.

**Palavras-chaves:** Corticoides, cromatografia, cromatografia líquida

#### ABSTRACT

**Objectives:** To develop and validate a high performance liquid chromatography method for the determination of corticosteroids. **Material and Methods:** Solutions of corticosteroids hydrocortisone, dexamethasone and betamethasone were prepared with methanol to obtain concentrations of 400 µg / ml. Then, solutions with methanol / water of concentration between 5 and 60 µg / ml were prepared therefrom and then the tests were carried out to validate the methodology. The reading was performed with a manual injection chromatographic system, consisting of 2 pumps, 1 controller, degasser system and UV-Vis detector; stationary phase: Kinetex Phenomenex C18 chromatography column 150 x 4.6 mm x 5µ; mobile phase 70% methanol and 30% ultra purified water, flow 1 mL / min and wavelength at 250 nm. **Results:** The corticosteroids hydrocortisone, dexamethasone and betamethasone were respectively validated: linearity:  $r = 0.997$ ;  $r = 0.997$ ;  $r = 0.996$ ; precision with a maximum coefficient of variation of 1.8; 1.72 and 2.70; maximum accuracy of 3.55; 3.25 and 2.76. The methodology was robust and selective. **Conclusion:** The method presented satisfactory results, allowing its use for validation and determination of the drugs under study.

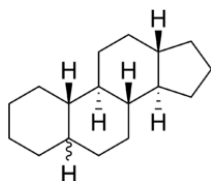
**Keywords:** Corticoids, chromatography, liquid chromatography

## INTRODUÇÃO

Os glicocorticoides (GC) são agentes esteroides que possuem ação antiinflamatória e imunossupressora, por essa razão são utilizados para inúmeras finalidades em terapias de reposição hormonal, imunossupressão, antialérgica, antiinflamatória, e também em tratamentos anticâncer, principalmente associados a outros medicamentos (BAVARESCO, BERNARDI & BATTASTINI, 2005).

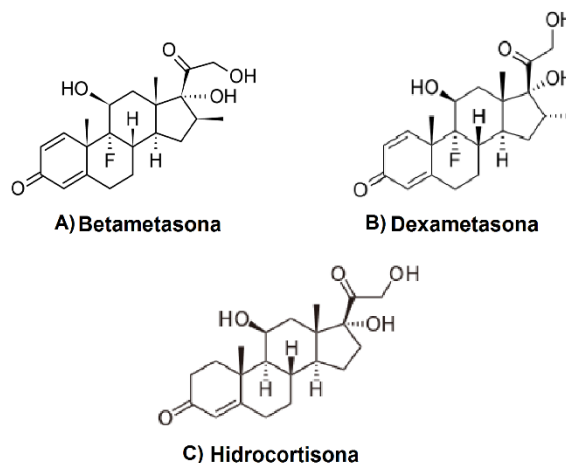
A estrutura molecular básica dos glicocorticoides consiste em 3 anéis hexano e 1 anel pentano (Figura 1), o ciclopentanoperidrofenantreno, derivado do colesterol. Os glicocorticoides são variações dessa estrutura básica, sejam eles naturais ou sintéticos, e suas diferenças de potência, meia vida, metabolismo e efeitos mineralocorticoides são ocasionadas pela variação do grupo 11-hidroxilo, estrutura necessária para eficácia dos mesmos (PEREIRA, *et al*, 2007).

**Figura 1 – Ciclopentanoperidrofenantreno**



A classificação dos GC pode ser de acordo com a meia vida, potência ou duração de ação. A duração de ação, classifica-se como curta, intermediária e longa, e tem como base a duração da supressão do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). A cortisona e a hidrocortisona (Figura 2) são classificados como GC de ação curta, pois suprimem o ACTH por 8 a 12 horas; GC de ação intermediária são a prednisona, a prednisolona, a metilprednisolona e a triancinolona, estas suprimem o ACTH por 12 a 36 horas; já a dexametasona e a betametasona (Figura 2) são classificados em GC de ação longa, pois promovem supressão do ACTH por 36 a 72 horas. A potência dos GC é avaliada pela sua afinidade aos receptores citoplasmáticos e pela duração de sua ação (ANTI, GIORGI & CHAHADE, 2008).

**Figura 2 – Estruturas químicas – A) Betametasona; B) Dexametasona; C) Hidrocortisona**



Durante a formulação e fabricação de fármacos é necessário a utilização de métodos analíticos para um adequado controle de qualidade, métodos que possuam capacidade de detectar produtos de degradação conhecidos ou não (SILVA, 2012). E assim, garantir e promover segurança dos fármacos produzindo resultados dentro das especificações preestabelecidas, reduzindo perdas, nível de falhas e manter os padrões de qualidade e base para melhoria contínua. As mesmas podendo ser realizadas através de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, não cromatográficos, testes imunológicos ou microbiológicos (BRASIL, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, sólida, contida em uma coluna cilíndrica. (BRASIL, 2016).

Diferentes métodos de CLAE utilizando fases móveis têm sido desenvolvidos e aplicados em amostras de urina, plasma e formulações farmacêuticas para separação de compostos e misturas complexas de corticosteroides, constatou-se que nesses métodos comumente abordados houve a necessidade de um pré-tratamento da amostra empregando técnicas de extração, em fase sólida ou por solventes (TOLEDO PINTO, MENEZES & PEREIRA, 2010).

As normas para validação de procedimentos analíticos estão descritas na RE 899/2003, a qual cita quais os métodos devem ser seguidos para atender as exigências das aplicações analíticas, assegurando assim, a confiabilidade dos resultados. O objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-qualitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

Com isso, o presente artigo busca desenvolver e validar um método para determinação de fármacos corticoides mais simples, de fácil realização, rápido e reprodutivo, com a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Matéria-prima, reagentes e equipamentos

Para validação do método analítico foram utilizados padrões dos corticoides betametasona (Fragon, Lote: AM20213250), dexametasona (Fragon, Lote: 21200031SC) e hidrocortisona (Fragon, Lote: 17A2199032HD); metanol (MeOH) J. T. Baker, lote M04C00, metanol (MeOH) Sigma-Aldrich, lote DCBD1711V, para uso em cromatografia líquida a 99,9% de pureza; água ultra purificada no sistema Milli-Q; balança analítica AR3130BR; vortex kasvi-basic K45-2820; micropipeta de volume variável faixa de volume 10 a 100 µL e 100 a 1000 µL, Peguepet; ponteiras; e vidrarias entre tubos de ensaio e balões volumétricos; Sistema Cromatográfico Shimadzu de injeção manual, composto pelos seguintes módulos: 2 bombas LC-20AD, controlador CBM-20A, sistema degasser DGU-20A<sub>3</sub> e detector SPD-10A VP (UV-Vis Detector); coluna cromatográfica Kinetex Phenomenex C18 150 x 4,6 mm x 5µ.

### 2.2 Preparo das soluções

Para validação da metodologia pesou-se exatamente 10 mg dos padrões de betametasona, dexametasona e hidrocortisona, separadamente, e transferiu-se os mesmos para balões volumétricos de 25 mL com o auxílio do metanol. Em seguida completou-se o volume do balão (25 mL) com metanol, solubilizando os padrões dos fármacos, agitando vigorosamente para alcançar uma solução homogênea. A partir destas soluções transferiu-se alíquotas das três solubilizações para tubos de ensaio, de modo que os três fármacos estivessem na mesma preparação, ajustou-se o volume com metanol/água (1:1) para 10 mL e assim obter amostras com os respectivos corticoides nas concentrações 60, 40, 20, 10, e 5 µg/mL, em seguida agitamos as soluções vigorosamente com auxílio do vórtex e posteriormente conduzimos as amostras para a injeção.

### 2.3 Seleção do comprimento de onda

Estabeleceu-se as condições do ensaio e foi determinado o espectro de absorção de acordo

com os dados descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (ANVISA,2010), onde adotamos o comprimento de onda de 250nm, valor adequado para detecção dos corticoides analisados.

### 2.4. Metodologia analítica

Foi utilizado Sistema Cromatográfico Shimadzu de injeção manual, composto pelos seguintes módulos: 2 bombas LC-20AD, controlador CBM-20A, sistema degasser DGU-20A<sub>3</sub> e detector SPD-10A VP (UV-Vis Detector); fase estacionária: coluna cromatográfica Kinetex Phenomenex C18 150 x 4,6 mm x 5 µ; fase móvel: 70% metanol (MeOH) e 30% água ultra purificada no sistema Milli-Q; fluxo de 1 mL/min; volume de injeção 20 µL; comprimento de onda (λ) de 250 nm.

### 2.5. Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo critérios estabelecidos na "Farmacopeia Brasileira 5ª edição" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2010) e no "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" - ANVISA (BRASIL, 2003).

### 2.6. Seletividade / Especificidade

Com a finalidade de verificar a possível interferência dos demais componentes das fórmulas no método e determinar sua especificidade, prepararam-se amostras simuladas isentas de corticoides que foram submetidas ao método proposto.

### 2.7. Linearidade

Para o estudo do intervalo foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 5 a 60 µg/mL de soluções com os corticoides analisados. Realizou-se leitura das soluções em 250 nm, utilizando-se metanol / água para ajuste do zero. Construiu-se a curva analítica nas concentrações de 5, 10, 20, 40, e 60 µg/mL. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados. Com os resultados obtidos, calculou-se o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do método.

#### 2.7.1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir da curva analítica e calculados pela relação:  $3 \times \sigma/S$  e  $10 \times \sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio

padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica.

## 2.8. Precisão

Pesou-se exatamente 10 mg dos padrões de hidrocortisona, dexametasona e betametasona, separadamente, e transferiu-se os mesmos para balões volumétricos de 25 mL com o auxílio do metanol. Posteriormente completou-se o volume do balão (25 mL) com metanol, solubilizando os padrões dos fármacos, agitando vigorosamente para alcançar uma solução homogênea. A partir destas soluções transferiu-se alíquotas das três solubilizações para tubos de ensaio, de modo que os três fármacos estivessem na mesma preparação, e ajustou-se o volume para 10 mL com metanol/água (1:1). Isto para obter amostras com os respectivos corticoides na concentração 40 µg/mL, procedimento realizado por dois analistas. Obteve-se precisão intermediária e exatidão através da análise da amostra em dois dias diferentes, por dois analistas, onde as mesmas foram realizadas em seis replicatas, na concentração de 40 µg/mL. Com os resultados obtidos calculou-se o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

## 2.9. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Foi preparado 9 soluções contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações, 10, 40 e 60 µg/mL, em triplicata. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

## 2.10. Robustez

Realizou-se o estudo da robustez utilizando o comprimento de onda de 250nm e diferentes marcas dos solventes, fornecedor 1 (F1): Metanol J.T. Baker, lote M04C00; fornecedor 2 (F2): Metanol Sigma- Aldrich, lote DCBD1711V.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### Seletividade / Especificidade

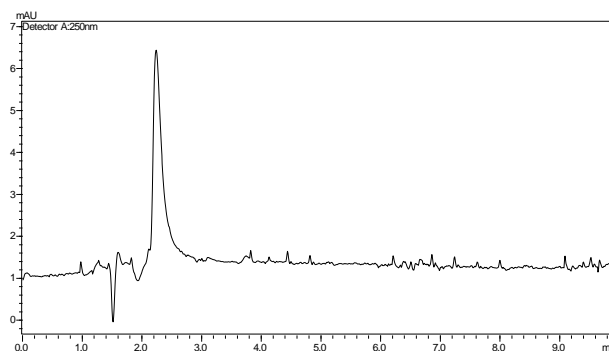
A seletividade do método foi o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, na qual foi observado que para hidrocortisona, dexametasona e betametasona, o comprimento de onda adequado

seria de 250 nm, o mesmo não apresentou interferentes com as amostras sem a presença dos fármacos citados acima.

A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico. Este parâmetro deve ser avaliado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2010). A legislação preconiza que o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz, sem o fármaco, apresentar absorvância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

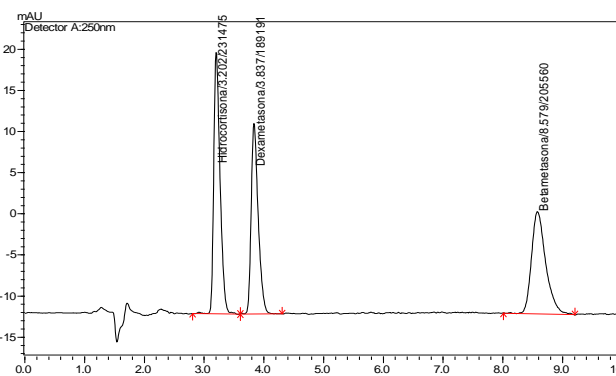
Portanto, a metodologia proposta para quantificação da betametasona, dexametasona e hidrocortisona demonstrou ser seletiva, uma vez que não houve interferência dos componentes nos tempos de retenção dos fármacos analisados nas condições cromatográficas em estudo. O tempo de retenção dos fármacos hidrocortisona, dexametasona e betametasona, foi respectivamente, 3,20; 3,83 e 8,57 minutos. No tempo de retenção dos fármacos não apareceu nenhum interferente nos cromatogramas, como exposto nas Figuras 3 e 4.

Figura 3 – Cromatograma seletividade - Branco



Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

Figura 4 – Cromatograma seletividade – Hidrocortisona, Dexametasona e Betametasona

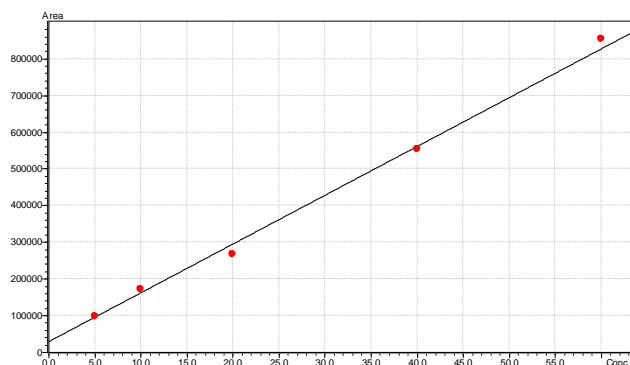


Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

## Linearidade

As amostras foram submetidas a testes para avaliar a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado conforme demonstrado na Figura 5, onde temos a linearidade da hidrocortisona, seguindo os mesmos padrões para a dexametasona e betametasona.

**Figura 5 – Curva Calibração Linearidade Hidrocortisona**



Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

O método proposto por cromatografia líquida de alta eficiência apresentou linearidade em uma faixa de 5 a 60 µg/mL. As curvas analíticas, obtidas em triplicata, puderam ser descritas através das seguintes equações: Hidrocortisona  $y = 13,299,2x + 29625,1$ ; Dexametasona  $y = 10531,2x + 27289,1$ ; e Betametasona  $y = 11592,7x + 26772,7$ ; obtidas pelo método dos mínimos quadrados, apresentando coeficientes de correlação (r), respectivamente:  $r = 0,997$ ;  $r = 0,997$ ;  $r = 0,996$ . O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade e linearidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (NUNES et al., 2005).

O limite de detecção dos corticosteroides hidrocortisona, dexametasona e betametasona foram respectivamente de 0,01; 0,001 e 0,05 µg/mL e seus limites de quantificação 0,025; 0,005 e 0,15 µg/mL.

As Tabelas 1 a 3 apresentam os dados obtidos durante a determinação da linearidade. Os valores de coeficiente de variação - CV(%) - e exatidão, obtidos durante a avaliação foram inferiores a  $\pm 5,0\%$ , com isso atendendo os critérios estabelecidos na RE 899 de 2003.

**Tabela 1 – Linearidade Hidrocortisona.** Valores correspondentes (n=3) do método validado.

Conc (ug/mL)	Média (n=3)	DP	CV (%)	Exatidão (%)
5	4,961	0,072	1,44	-0,77
10	10,045	0,223	2,22	+ 0,45
20	19,508	0,215	1,10	-2,46
40	39,363	1,072	2,72	-1,59
60	62,022	1,755	2,83	+ 3,37

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 2 – Linearidade Dexametasona.** Valores correspondentes (n=3) do método validado.

Conc (ug/mL)	Média (n=3)	DP	CV (%)	Exatidão (%)
5	5,010	0,108	2,16	+ 0,21
10	10,203	0,409	4,01	+ 2,03
20	19,988	0,392	1,96	- 0,06
40	41,012	0,706	1,72	+ 2,53
60	61,485	0,808	1,31	+ 2,48

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 3 – Linearidade Betametasona.** Valores correspondentes (n=3) do método validado.

Conc (ug/mL)	Média (n=3)	DP	CV (%)	Exatidão (%)
5	4,949	0,074	1,50	- 1,01
10	10,123	0,175	1,73	+ 1,23
20	19,967	0,668	3,35	- 0, 17
40	40,641	1,055	2,60	+ 1,60
60	60,677	0,471	0,78	+ 1,13

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

## Precisão e Exatidão

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os dados obtidos durante a determinação do parâmetro precisão e a Tabela 7 a exatidão do método por cromatografia líquida de alta eficiência. Para ambos, os valores de CV (%) obtidos durante a avaliação da precisão foram inferiores a 5,0%. Na determinação da exatidão, demonstrou-se proximidade entre os valores de concentração obtidos pelos métodos e os seus valores teóricos.

**Tabela 4 – Precisão da Hidrocortisona.** Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) do método validado.

Parâmetro	Conc.	Conc.	Precisão	Exatidão
-----------	-------	-------	----------	----------

	teórica	Obtida	(%)	(%)
Precisão				
Repetitividade	40	40,347	2,70	+0,87
Precisão Intermediária (Dia 1)				
Analista 1	40	40,347	2,70	+0,87
Analista 2	40	39,825	1,58	-0,44
(Dia 2)				
Analista 1	40	40,639	1,76	+1,60
Analista 2	40	40,334	1,46	+0,83

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 5 - Precisão da Dexametasona.** Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) do método validado.

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão				
Repetitividade	40	40,077	0,83	+ 0,19
Precisão Intermediária (Dia 1)				
Analista 1	40	40,077	0,83	+0,19
Analista 2	40	40,186	1,61	+0,46
(Dia 2)				
Analista 1	40	39,602	1,72	-0,99
Analista 2	40	40,094	1,22	+0,23

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 6 - Precisão da Betametasona.** Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) do método validado.

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão				
Repetitividade	40	40,208	0,62	+ 0,52
Precisão Intermediária (Dia 1)				
Analista 1	40	40,208	0,62	+0,52
Analista 2	40	40,215	1,80	+0,54
(Dia 2)				
Analista 1	40	39,533	1,78	-1,17
Analista 2	40	40,096	1,16	+0,24

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 7 - Exatidão da Hidrocortisona, Dexametasona e Betametasona.** Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Exatidão(n=3) do método validado.

Fármaco	Exatidão (%) n=3		
	10 µg/mL	40 µg/mL	60 µg/mL
Hidrocortisona	+ 3,55	+ 2,22	+ 1,82
Dexametasona	- 0,57	+ 3,25	+ 1,09
Betametasona	- 2,76	+ 1,33	+ 1,91

Então, nas condições estudadas demonstrou-se que os resultados de exatidão e precisão para o método desenvolvido e validado estão de acordo com o preconizado pela RE 899 de 2003.

### Robustez

As amostras testes foram submetidas para avaliar a robustez, medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções de leitura utilizando metanol proveniente de diferentes fornecedores (F1: J.T. Baker, lote M04C00; F2: Sigma- Aldrich, lote DCBD1711V); leitura das soluções foi realizada em comprimento de onda de 250 nm. Foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em quatro replicatas, em meio às variações realizadas. As Tabelas 8, 9 e 10 mostram os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método.

**Tabela 8 Robustez Hidrocortisona –** Valores, em µg/mL, correspondentes a determinação da robustez do método cromatográfico validado (n=6).

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	40	40,347	2,70	+ 0,87
B	40	40,224	1,77	+ 0,56

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 9 Robustez Dexametasona –** Valores, em µg/mL, correspondentes a determinação da robustez do método cromatográfico validado (n=6).

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	40	40,077	0,83	+ 0,19
B	40	40,309	2,06	+ 0,77

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

**Tabela 10 Robustez Betametasona –** Valores, em µg/mL, correspondentes a determinação da robustez do método cromatográfico validado (n=6).

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	40	40,208	0,62	+ 0,52
B	40	40,300	1,50	+ 0,75

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

### Legenda:

A = Solução em Metanol (fornecedor 1, 250 nm);  
B = Solução em Metanol (fornecedor 2, 250 nm).

## CONCLUSÕES:

O método analítico desenvolvido para quantificação dos corticoides betametasona, dexametasona e hidrocortisona nas amostras em estudo por meio de cromatografia líquida de alta eficiência apresentou especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequados, atendendo os critérios estabelecidos na RE 899 de 2003. O método desenvolvido e validado permitiu a detecção e quantificação simultânea dos fármacos e apresentou as características fundamentadas a partir dos resultados encontrados e de acordo com os objetivos deste trabalho, sendo adequado a utilização em ensaios de determinação e quantificação dos fármacos hidrocortisona, dexametasona e betametasona.

## REFERÊNCIAS

- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Anti-inflamatórios Hormonais: Glicocorticoides. **Einstein**, São Paulo; Vol. 6, n. 1: S159-S65, 2008
- ANTONOW, D. R.; MONTEIRO, G. A.; ARAUJO, M. C. S. Glicocorticoides: uma meta-análise. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria**, v. 8, n. 1, p. 51-68, 2007.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, L.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma** v.17, nº 7/9, 2005.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5ª Edição, Brasília, DF: Anvisa, 2010.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira – Primeiro Suplemento**. 5ª Edição, Brasília, DF: Anvisa, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa. Resolução n.º 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF; 2003. 29 maio.
- BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**. v. 13, 2003.
- BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.C.K. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica** de Goodman & Gilman. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- GAYATHRI, P.; JAYAVEERA, K.N.; SASIKIRANGOUD; REDDY, N.S. RP-HPLC Method development and validation for simultaneous estimation of imipramine and alprazolam in pharmaceutical dosage forms. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.3, n. 10, 2014.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES – **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. Geneva: ICH; 2005. Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005)
- NUNES R.S.; SENNA, B.A.A.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 86, n.3, 2005.
- PEREIRA, A.L. C.; BOLZANI F.C.B.; STEFANI, M.; CHARLIN, R. Uso sistêmico de corticosteroides: revisão da literatura. **Med Cutan Iber Lat Am** 2007;35:35-50.
- SILVA J.A.; BEDOR, D.C.G.; SOUSA, C.E.M.; SANTANA, D.P.; EGITO, E.S.T. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.31, n. 1, 2010.
- SILVA, J.A.; GUIMARÃES, G.P.; PATRIOTO Y.B.G.; SILVA, N.E.S.; Sousa, C.E.M.; JUNIOR, F.J.B.M.; SANTANA, D.P.; Damasceno, B.P.G.L. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 35, n. 4, 2014.
- SILVA, M. R. M.; **Formulação líquida oral do acetato de hidrocortisona incluso em ciclodextrina: desenvolvimento e validação da metodologia analítica**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2005.
- SILVA, Z. L.; JACINTO, M.; COELHO, L.; AMORIM, A. ALVAREZ LEITE, E. M. Determinação

simultânea dos ácidos hipúrico e metil-hipúrico urinários por métodos cromatográficos: comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa capilar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 38, n. 2, abr./jun., 2002.

SOLON, L; G. S. **Qualidade analítica baseada no projeto como ferramenta de desenvolvimento de métodos em cromatografia líquida de alta eficiência**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª Edição. Porto Alegre: Editora Bookman, 2009.

TOLEDO PINTO, E. A.; MENEZES, M.L.; PEREIRA, O.C.M. Desenvolvimento de um método analítico rápido e eficiente para a determinação de corticosteróides plasmáticos por injeção direta em coluna cromatográfica ISRP-C18 por CLAE. **Eclética Química**, São Paulo, 35 - 2: 51 - 61, 2010.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002.



