



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

ALISSON ALAMO PEREIRA NERY

**ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENOBARBITAL
EM URINA, PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INTOXICAÇÕES
HUMANAS**

**CAMPINA GRANDE – PB
2011**

ALISSON ALAMO PEREIRA NERY

**ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENOBARBITAL
EM URINA, PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INTOXICAÇÕES
HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sayonara Maria Lia Fook

CAMPINA GRANDE – PB
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

N443a Nery, Alisson Alamo Pereira.
Ensaio cromatográfico para identificação de fenobarbital em urina, para o diagnóstico laboratorial de intoxicações humanas.[manuscrito] / Alisson Alamo Pereira Nery. – 2011.
27 f.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

“Orientação: Profa. Dra. Sayonara Maria Lia Fook, Departamento de Farmácia”.

“Co-Orientação: Saulo Rios Mariz, Departamento de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande”.

1. Intoxicação humana. 2. Fenobarbital.
3. Cromatografia líquida. I. Título.

21. ed. CDD 615.9

ALISSON ALAMO PEREIRA NERY

**ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENOBARBITAL
EM URINA, PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INTOXICAÇÕES
HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de Artigo Científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 24 / 11 / 2011.

Sayonara maria Lia Fook

Prof.^a. Dr.^a. Sayonara Maria Lia Fook / UEPB
Orientadora

Nícia Stellita da Cruz Soares

Prof. Msc. Nícia Stellita da Cruz Soares / UEPB
Examinadora

Vera Lúcia Meira de Moraes Silva

Prof.^a. Dr.^a. Vera Lúcia Meira de Moraes Silva / UEPB
Examinadora

AGRADECIMENTOS

À Deus por sua imensa bondade, lealdade e por cada vitória alcançada durante toda a minha vida.

Aos meus pais e irmãos por acreditarem no meu sucesso profissional e por todo investimento depositado ao longo desses cinco anos de graduação, sempre tão presentes. Não mediram esforços.

À minha orientadora e grande amiga Sayonara Maria Lia Fook pela confiança e por aceitar-me como seu orientando. Agradeço por seus ensinamentos, força e amizade, que levarei por toda minha vida.

A toda minha turma de Farmácia 2007.1, pelos momentos de amizade, união e alegria ao longo do curso. São mais que uma família.

Aos meus professores de forma geral, por suas contribuições na transmissão de conhecimentos, com o objetivo de nos tornarmos profissionais qualificados.

Aos funcionários da UEPB, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

A todos aqueles, que apesar de não terem sido citados acima, contribuíram direta ou indiretamente na conclusão da minha graduação, os meus sinceros agradecimentos.

DEDICATÓRIA

A toda minha família, pelo investimento, dedicação,
confiança e amizade.

“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem acusá-la de egoísta, interesseira.
Seja gentil assim mesmo.
Se você é vencedora, terá alguns falsos amigos e inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.
Se você é honesta e franca as pessoas podem enganá-la.
Seja honesta e franca assim mesmo.
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.
Veja você que no final das contas é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as pessoas”.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor”.

(Madre Teresa de Calcutá)

ENSAIOS CROMATOGRÁFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENOBARBITAL EM URINA, PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INTOXICAÇÕES HUMANAS.

NERY, Alisson Alamo Pereira¹; CARTAXO, Nathália Alexandra de Oliveira²; FOOK, Sayonara Maria Lia³; Mariz, Saulo Rios⁴

RESUMO

A resposta do organismo aos medicamentos, quando em doses excessivas, resulta em exposições tóxicas. Entretanto a existência de um serviço de saúde especializado no atendimento de urgência possibilita o tratamento imediato do paciente. No entanto requer meios para auxiliá-lo no prognóstico de intoxicações humanas. Assim, buscou validar um método analítico para identificação e quantificação do Fenobarbital, em urina humana. O ensaio utilizou um Cromatógrafo Líquido Ultra-Fast (UFLC), operando com uma coluna RP-18 com detector de ultravioleta a 220nm e fase móvel constituída por uma mistura de metanol/água (90:10, v/v), fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e binário. Os parâmetros utilizados na otimização foram: linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez. O método demonstrou ser seletivo, robusto e linear no intervalo de 50 a 400 µg mL⁻¹ ($r = 0,9973$), de acordo com os parâmetros especificados pela RDC n°. 899, de 23 de maio de 2003. Os Limites de detecção e quantificação foram 37,0 126,40 µg mL⁻¹, respectivamente. No entanto, a exatidão e a precisão do método provaram ser insuficientes, necessitando reavaliação desses parâmetros.

PALAVRAS-CHAVE: Método analítico. Validação. Cromatografia líquida de alta eficiência.

1 INTRODUÇÃO

O Fenobarbital, apresentado na Figura 1, é um fármaco com propriedades antiepilépticas, hipnóticas e sedativas. O Fenobarbital é obtido a partir do ácido barbitúrico pela substituição do hidrogênio do carbono da posição 5 por um radical fenila. Este fármaco liga-se ao sítio alostérico no receptor de GABA α , potencializa a ação do GABA endógeno ao aumentar acentuadamente a duração de abertura dos canais de Cl⁻. Eficaz em muitas formas de epilepsias, entretanto, não possui atividade no controle das crises de ausência (GUERREIRO, 2006).

¹ Aluno de graduação do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB. nery.eualamo@hotmail.com.

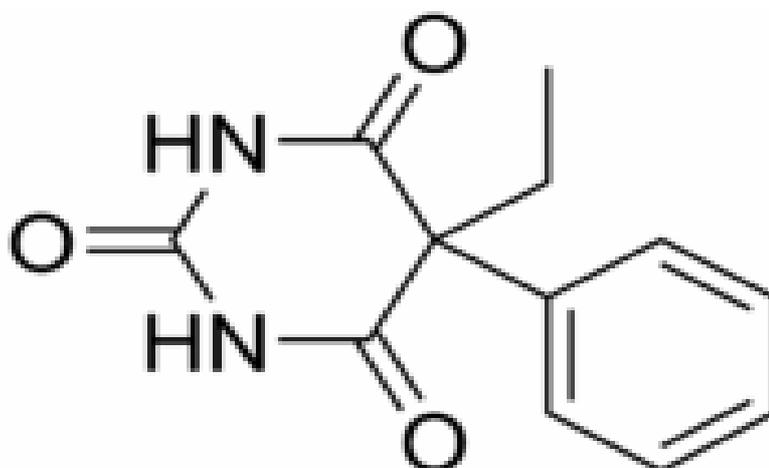
² Aluno de graduação do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB. nathalia_cartaxo@hotmail.com.

³ Professor Doutor do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB. sayonarafook@yahoo.com.br.

⁴ Professor Doutor do Departamento de Medicina da Universidade Federal da Paraíba, UFCG. sjmariz22@hotmail.com.

É bem absorvido e cerca de 50% do fármaco liga-se a proteínas plasmáticas, essencialmente a albumina. Apresentam 25% de eliminação na forma inalterada através da urina. O restante, 75%, são metabolizados por oxidação e conjugação via enzimas hepáticas. A faixa de concentração terapeuticamente efetiva dessa droga varia entre 15 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PASTORE; OFUCHI; NISHIYAMA, 2007). O Fenobarbital é um potente indutor de enzimas hepáticas, como o citocromo P450, causa marcada interferência na ação de outros fármacos, podendo causar exposições tóxicas graves.

Figura 01. Estrutura química do Fenobarbital.



Fonte: Dalmora, 2010.

Na exposição tóxica aguda pelo Fenobarbital, o quadro clínico varia conforme a intensidade, sendo caracterizada por depressão respiratória, coma e hipotensão, vindo a ocorrer no uso terapêutico, na automedicação, ou ainda de forma acidental ou intencional.

Nos atendimentos de urgência, à pacientes acometidos pelo histórico de exposição tóxica por medicamentos, o tempo de tomada de decisão é crucial para cura ou melhoria de seu quadro clínico. Nesses eventos envolve geralmente compostos desconhecidos, tornando um grande desafio identificar o agente responsável. Nesse sentido a cromatografia, destaca-se por ser um método físico-químico de separação, portanto útil, para analisar, identificar e/ou separar os componentes de uma mistura em amostras biológicas (KARP, 2005).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), dentre todas as técnicas analíticas de separação e quantificação, é a mais usada. Trata-se de um método sofisticado, de alta resolução (em escala de tempo de poucos minutos), eficiente e sensível, além de fácil adaptação para determinações quantitativas (TÔRRES, 2009).

Dentre as matrizes biológicas, onde são investigados os agentes tóxicos, considera-se a urina o material de escolha, por apresentar elevada concentração dos fármacos e por esses serem eliminados através da excreção renal, em sua forma intacta ou ainda sob a forma de metabólitos, produtos de sua biotransformação (KARP, 2005).

Entretanto, a urina pode ser considerada uma matriz complexa, pois é rica em constituintes que podem comprometer o resultado analítico. Havendo necessidade desta, ser submetida a um pré-tratamento, que consiste em livrá-la de possíveis interferentes, possibilitando a seleção dos analitos de interesse. Para tanto, faz-se uso do método de Extração Líquido-Líquido (ELL). A ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra. Caracteriza-se pela partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sendo a eficiência da extração dependente da afinidade do analito pelo solvente de extração, bem como da razão das fases e do número de extrações que são realizadas (QUEIROZ; COLINS; JARDIM, 2001).

Os métodos utilizados para análise quantitativa de fármacos devem ser validados, objetivando garantir a qualidade dos resultados obtidos. Desse modo, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

Neste sentido, o presente estudo aborda o desenvolvimento de um método, que possibilite identificar e quantificar o fármaco Fenobarbital em amostras de urina humana usando Cromatografia Líquida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Alguns fatos históricos marcam acidentes com medicamentos. Em 1937 mais de cem crianças morreram nos Estados Unidos pelo uso de um elixir sulfanilamida, que continha como veículo o dietilenoglicol. Em 1938, como consequência deste evento, foi aprovada, nos Estados Unidos, a lei que criou a “Food and Drug Administration” (FDA), obrigando as indústrias farmacêuticas a fornecer em informações a esta instituição dados clínicos sobre novos medicamentos. Um dos acidentes marcantes relacionado ao uso de medicamentos aconteceu na Alemanha Oriental em 1961, pelo uso da Talidomida, um hipnótico não barbitúrico, prescrito na época para tratar náuseas e vômitos em mulheres grávidas, mais de 10.000 crianças nasceram com focomelia (termo Grego que significa membro de focas e

caracteriza um processo de deformidade dos membros). Através de estudos epidemiológicos, foi comprovado o efeito teratogênico da Talidomida, e como consequência entre 1961 a 1962 foi retirada do mercado em quase todo o mundo.

O uso desnecessário, assim como a utilização de medicamentos em situações contraindicadas, pode acarretar diversas consequências para a saúde, como reações adversas, efeito subterapêutico, resistência bacteriana, reações de hipersensibilidade, farmacodependência, sintomas de retirada, e intoxicações medicamentosas (VILARINO et al., 1998).

No Brasil, como na maioria dos países, os medicamentos vêm preocupando as autoridades e os profissionais de saúde, pois se apresentam como o principal agente tóxico responsável pelos casos de intoxicações humanas, constituindo, portanto, um grande desafio para os que trabalham com a Saúde Pública (BORTOLETTO et al., 1996; BERTOLDI et al., 2005; SINITOX, 2011).

Inúmeras razões contribuem para a manutenção de índices elevados de intoxicações por medicamentos, entre elas, destacam-se: a existência de uma grande variedade de fármacos de segurança e eficácia duvidosas, a proliferação de farmácias e drogarias onde se adquirem medicamentos livremente, erros de prescrição médica e dispensação farmacêutica, incremento da propaganda por parte da indústria farmacêutica, aliada a uma fragilidade nas medidas preventivas e da capacidade de fiscalização e controle por parte das autoridades (AMARAL; BARCIA, 2008; MARGONATO; THOMSON; PAOLIELLO, 2008).

O uso irracional de medicamentos, também contribui de forma significativa para o aumento dos riscos de intoxicações. A sociedade moderna se rende ao uso indiscriminado de medicamentos e de associações de fármacos, o que aumenta a morbi-mortalidade da farmacoterapia devido aos eventos adversos e à toxicidade desses produtos, originalmente elaborados para atuarem como promotores da saúde humana. Toda essa situação redundando em um custo elevado para o sistema público de saúde (NEGREIROS; CASTILHO, 2006; SILVA; GIUGLIANI, 2004).

2.1 Medicamentos e classificação

Os medicamentos podem ser classificados de diversas maneiras em categorias terapêuticas. Uma delas pode ser feita de acordo com o *Anatomical-Therapeutic-Chemical Classification System* (ATC). Este sistema de classificação divide os fármacos de acordo com o órgão ou sistema sobre o qual ele atua, segundo as suas propriedades químicas, farmacológicas e terapêuticas. O grupo principal é representado por uma letra e corresponde

ao grupo anatómico, é o caso dos medicamentos que atuam no sistema nervoso central, que é representado pela letra N e pertence ao nono nível dessa classificação. Neste nível estão incluídos os antiepilépticos: barbitúricos e derivados (N03A), psicodislépticos: ansiolíticos (N05B), antipsicóticos (N05A), hipnótico-sedativos (N05C) e os psicoanalépticos: antidepressivos (N06A) e estimulantes/psicoestimulantes (NO6B). Os que atuam no trato respiratório pertencem ao décimo segundo nível da classificação e são representados pela letra R. Neste nível estão incluídos os medicamentos de uso nasal (R01), os de uso faríngeo (R02), os antiasmáticos (R03), os contra tosse e resfriados (R05), os anti-histaminico para uso sistêmico (R06), e outros medicamentos para o aparelho respiratório (R07). Os que atuam no sistema reprodutor e nos hormônios pertencem ao quarto nível e é representado pela letra G, neste nível destacam-se as hormonais sexuais e moduladores do sistema genital (G03). No oitavo nível se encontra os que atuam no sistema músculo-esquelético, representado pela letra M, se destacando os anti-inflamatórios e anti-reumáticos (MO1) (QUADRO 01).

QUADRO 01 - Classificação de fármacos de acordo com <i>Anatomical-Therapeutical-Chemical Classification System</i> (ATC)	
A	Aparelho digestivo e metabolismo
B	Sangue e órgãos hematopoiéticos
C	Aparelho cardiovascular
D	Medicamentos dermatológicos
G	Aparelho geniturinário e hormônios sexuais
H	Preparações hormonais sistêmicas, excluindo hormônios sexuais e insulinas
J	Anti-infecciosos gerais para uso sistêmico
L	Agentes antineoplásicos e imunomoduladores
M	Sistema musculoesquelético
N	Sistema nervoso
P	Produtos antiparasitários, inseticidas e repelentes
Q	Uso veterinário
R	Aparelho respiratório
S	Órgãos dos sentidos
V	Vários

2.2 Antiepilépticos - barbitúricos e derivados (N03A)

Rang et al (2007) afirmam que os barbitúricos são compostos derivados de ureídas cíclicas derivadas do ácido barbitúrico ou maloniluréia, composto heterocíclico resultante da condensação da uréia com o ácido malônico. As propriedades de indução do sono dos barbitúricos foram descobertas no início do século XX, com centenas de compostos tendo

sido produzidos e testados. Até a década de 1960 formava o maior grupo de hipnóticos e sedativos de uso clínico. Substituições na cadeia lateral determinam as características dos diferentes agentes usados na terapêutica.

São subdivididos em quatro grupos, de acordo com o tempo de duração do efeito: Barbitúricos de efeito prolongado (4 a 12 horas) usados principalmente no tratamento da epilepsia e para a manutenção da sedação em estados de ansiedade e tensão são exemplos desse grupo o barbital, fenobarbital, metabarbital; Barbitúricos de efeito intermediário (2 a 8 horas), pertencem a este grupo o amobarbital, talbutal, butobarbital; Barbitúricos de efeito curto (até 3 horas) ciclobarbital, pentobarbital, secobarbital; Barbitúricos de efeito ultracurto (menos de 3 horas), consistem principalmente nos anestésicos intravenosos para anestesia basal - hexobarbital, metoexital, tiamilal, tiopental. Os barbitúricos de ação intermediária e de curta são empregados basicamente como hipnóticos e sedativos em casos de insônia e na pré-anestesia. Os barbitúricos de ação curta são mais potentes e, conseqüentemente, mais tóxicos que os de ação prolongada (GILMAN, 2006).

Os barbitúricos facilitam as ações do GABA em múltiplos locais no SNC, pois eles promovem o aumento das correntes de cloreto GABA-induzidas prolongando os períodos durante os quais ocorrem surtos de abertura do canal, ao invés de aumentar a frequência desses surtos, conforme fazem os benzodiazepínicos. Em concentrações elevadas, os barbitúricos podem também ser GABA-miméticos, ativando diretamente os canais de cloro (RANG, et al, 2007; SILVA, 2006).

As interações farmacológicas mais freqüentes envolvendo barbitúricos, estão relacionadas com outras drogas depressoras do sistema nervoso central, resultando em efeitos aditivos. É possível prever efeitos aditivos com o uso concomitante de bebidas alcoólicas, analgésicos opióides, anticonvulsivantes, fenotiazinas, anti-histamínicos, anti-hipertensivos e drogas antidepressivas da classe dos tricíclicos (RANG, et al, 2007; SILVA, 2006).

Apesar de o coma ser o principal sinal da intoxicação aguda por barbitúricos, não é característico, sendo necessário o diagnóstico laboratorial. Mesmo numa intoxicação severa, a recuperação geralmente ocorre sem seqüela neurológica. Logo no início do coma, os barbitúricos abolem o centro respiratório, sendo a depressão respiratória a causa mais comum de óbito em pacientes sem suporte ventilatório. O óbito ocorre por parada cardiorrespiratória. Em cerca de 6% dos casos de intoxicação aguda, os pacientes apresentam lesões na pele que são caracterizadas pela presença de bolhas grandes (FORSAN, 2010).

Além do risco de super-dosagem perigosa, produzem um elevado grau de tolerância e de dependência e induzem acentuadamente a síntese do citocromo P-450 hepático e de enzimas que fazem parte das reações de conjugação (RANG et al., 2007).

2.3 Métodos Cromatográficos

A cromatografia, derivado do grego do grego *Chroma* com o significado de cor e “grafia” também do grego *Grphe*, significando escrever. Teve início a partir da apresentação pelo russo Michael Tswett, em 1903, de um trabalho à Sociedade de Ciências de Varsóvia, no qual descreveu os resultados preliminares de suas pesquisas com extratos de folhas, utilizando uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio, separando os constituintes do extrato pela passagem de éter dietílico (COLLINS, 2006).

Segundo Karp (2005), a cromatografia é um método físico-químico, utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. A separação de dois ou mais compostos, está fundamentada na distribuição diferencial dos componentes entre duas fases, uma estacionária e outra móvel, imiscíveis. A técnica baseia-se no princípio da migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre as duas fases imiscíveis.

A distribuição dos compostos ocorre durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes. As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, por exemplo, a forma física do sistema cromatográfico, classificação pela fase móvel e pela fase estacionária empregada, além do diferente modo de separação (DEGANI; QUEZIA; VIEIRA, 1998).

Peres (2002), afirma que na cromatografia plana, a fase estacionária encontra-se contida em uma camada sobre uma superfície plana. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária encontra-se contida em uma coluna. Se a fase móvel for um gás, a técnica é conhecida como cromatografia gasosa; se for um líquido é chamada de cromatografia líquida.

Quando uma coluna de alto desempenho é usada na cromatografia líquida, a técnica é chamada de cromatografia líquida de alto desempenho. Quando um espectrômetro de massa é acoplado a um cromatógrafo a gás ou líquido, a técnica combinada é conhecida, respectivamente, como cromatografia gasosa-espectrometria de massa ou cromatografia líquida-espectrometria de massa (PERES, 2002).

Existem basicamente quatro tipos principais de métodos cromatográficos: cromatografia em papel, cromatografia de camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (DEGANI; QUEZIA; VIEIRA, 1998).

2.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) recebeu esse nome, pois apresenta como fase móvel um solvente líquido. Como fase estacionária utiliza-se sólidos ou semi-rígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar (PERES, 2002).

O solvente da fase móvel deve atender as exigências desse método. A principal característica dessa técnica é que a fase móvel dissolve a amostra sem qualquer interação química. Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Os solventes mais usados são três, a água, o metanol e a acetonitrila (PERES, 2002).

Silva (2009), afirma que o método CLAE possui uma extensa aplicabilidade como em pesquisas científicas, análise química, teste de controle de qualidade de medicamentos, do ar e da água, entre outras. Por ser uma técnica altamente sensível, de alta resolução, mesmo se a amostra possuir misturas complexas de componentes e por ser um método mais rápido e preciso, apresenta uma grande preferência. A eficiência da CLAE é tanta, que esse método cromatográfico pode detectar a maioria dos compostos e analisar traços de compostos em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos e petróleo.

As análises de fluidos biológicos por meio da separação, identificação e quantificação de determinados compostos em amostra de sangue, urina, conteúdo gástrico, em geral é possível determinar resíduos de medicações em leite e carne de animais para consumo, auxiliar no diagnóstico de intoxicações, uma vez que é possível identificação de venenos em amostras biológicas, e estudar os metabólitos gerados por administração de drogas, dentre outras inúmeras aplicações (TÔRRES, 2009).

2.4 Validação de Metodologia Analítica

A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado com o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual foi indicado (USP, 1999).

A validação é utilizada na determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (LIMA et al., 2006). Para que os resultados obtidos através de estudos experimentais sejam confiáveis, a validação deve apresentar: especificidade, linearidade, intervalo, sensibilidade, limite de quantificação, precisão e exatidão (PRADO et al., 2006).

A seletividade e a especificidade são dois parâmetros da validação que estão relacionados. No entanto, existem órgãos regulatórios que fazem distinção entre ambos os conceitos. A Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) determina que a seletividade é aplicada quando o método é capaz de determinar um analito específico em uma mistura complexa sem interferentes dos componentes da mesma; ao passo que a especificidade é definida como a eficaz seletividade para um analito ou grupo de analitos. Já o ICH (International Conference on Harmonisation), profere que especificidade e seletividade são termos sinônimos e os definem como a capacidade do método de medir com exatidão um analito em presença de impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (GRAEF, 2007; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

Pode ser demonstrada através de testes de identificação, comparando os resultados das amostras contaminadas, com quantidades apropriadas do analito de interesse, frente às amostras sem interferentes, partindo-se de um padrão analítico de referência. Garantir a pureza dos picos cromatográficos consiste no ponto crítico na Cromatografia Líquida, pois esse deve ser atribuído a um só componente. Para tanto, faz-se uso de analitos com elevados níveis de pureza (RIBEIRO, 2004).

Segundo Nunes et al (2007), a linearidade é um parâmetro utilizado para verificar se os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra estudada em um intervalo de concentração apropriada. Ela pode ser representada pela curva de calibração (relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito), e é recomendado pela análise de no mínimo cinco concentrações diferentes.

Intervalo de aplicação de um método corresponde ao intervalo, incluindo Limite Inferior e Superior de Quantificação, no qual o procedimento é satisfatório do ponto de vista da exatidão, fidelidade e linearidade (LANÇAS, 2004). O mesmo autor supracitado afirma que a

sensibilidade é importante para a validação de determinado método analítico porque é capaz de discriminar com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito.

O limite de quantificação corresponde a menor quantidade de um analito que é possível ser determinado com precisão e exatidão. É empregado em ensaios quantitativos de impureza, produtos de degradação em fármacos e em formas farmacêuticas. É expressa em porcentagem, sendo obtida através da relação entre o desvio padrão e a inclinação da curva de calibração, ou a partir do ruído. O limite de quantificação é aquele que produz relação sinal ruído superior a 10:1 (RIBANI, et al, 2004).

A precisão de um método analítico avalia a proximidade dos resultados em uma série de medidas e pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade; onde a primeira consiste na concordância entre os resultados usando o mesmo método, no mesmo laboratório, usada pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo, já na reprodutibilidade, os resultados são obtidos utilizando o mesmo método, analista, sendo que é realizada em diferentes laboratórios. A partir desses valores obtidos, são calculados a média e o Desvio Padrão (DP), determinando-se o Coeficiente de Variação (CV), expresso em termos de porcentagem (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007; LANÇAS, 2004).

A exatidão é determinada a partir do uso de uma amostra certificada cuja concentração do analito de interesse é conhecida, é expressa em porcentagem, sendo determinada através da relação da concentração média experimental com a concentração teórica. Ela mostra a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. É utilizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da especificidade do método, realizado após o intermédio de no mínimo nove determinações, sendo feito em triplicata (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007; MÜLLER, 2006).

Müller (2006), afirma que podem ser empregadas duas importantes estratégias para inferir a exatidão de um determinado método analítico, são elas: comparação de métodos e ensaios de recuperação. A primeira consiste na comparação dos procedimentos entre dois testes, do qual a exatidão é definida e o resultado é 100%. Lanças (2004) define o termo recuperação como sendo o parâmetro utilizado para medir a eficiência do processo de isolamento do analito a ser estudado da matriz onde se encontra presente, ou seja, mede a eficiência da extração de um método analítico de soluções padrões extraídos com soluções padrões não extraídos. Seu valor é encontrado em porcentagem e é a relação entre o valor obtido e o valor encontrado.

Apesar de todos esses parâmetros que levam à qualidade do método analítico, a validação não deve ser vista como um processo em que é 100% eficiente e eficaz e que pode ser usado indiscriminadamente pelo analista, porém, gera informações estatísticas confiáveis, promovendo o uso adequado do método que foi validado.

3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

Delineamento do estudo

A pesquisa tratou-se de um estudo experimental quantitativo. Foi desenvolvido no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) no período de agosto a novembro de 2011.

Material

Substâncias e Reagentes:

Fenobarbital 100 mg, com número de lote 11053558, metanol grau HPLC (Paerac, lote 218014) e água purificada. Os demais reagentes como clorofórmio (Fmaia, lote 38923) e o álcool isopropanol (Vetec, 0902593), aprestam grau PA (pureza analítica).

Equipamentos:

Sistema de Cromatógrafo Líquido Ultra-Rápido - Ultra-Fast LC (UFLC) da marca Shimadzu munido de duas bombas (LC - 20AD), com DGU 20A₃, que oferece opções de reboque para desgaseificar. Além disso, o equipamento apresenta: Forno de coluna (CTO - 20A), detector UV-VIS SPD - 20A, com lâmpada de Deutério, controlado pelo sistema (Interface CBM - 20A) e monitoração pelo Software LC-Solution. Utilizou-se uma coluna analítica tipo Shim-Pack XR-ODS (C18 50 x 3,0 mm) da Shimadzu.

Métodos

Preparo das amostras e solução padrão

A solução padrão foi preparada partindo-se de um comprimido de 100 mg do Fenobarbital, triturado a pó fino e homogeneizado. Em seguida, dissolvido em metanol/água (9:1 v/v), obtendo-se uma solução padrão de 2,0 mg mL⁻¹.

Extração Líquido-Líquido das amostras

Para os ensaios foram utilizadas amostras de urina. As amostras foram contaminadas em três concentrações, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (baixa), $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média) e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (alta). Estas foram submetidas ao processo de Extração Líquido-Líquido (ELL) pelo método de *Stas-Otto*, que considera o caráter ácido/base de cada substância, do meio em que essa se encontra bem como o seu grau de ionização, como fatores influentes em sua solubilidade em solventes orgânicos. Para a ELL, o pH da amostra foi previamente ajustado entre 4,0 – 5,0, com uma solução diluída de ácido clorídrico (HCl a 10%). Submetendo-a em seguida, à mistura de solventes Clorofórmio/Álcool Isopropanol (95:5, v/v).

A mistura era centrifugada por 05 minutos a 3.500 rotações por minuto (rpm). Por volatilização o solvente orgânico é removido. Após a evaporação, os resíduos secos de cada extração foram ressuspensos com a fase móvel (mistura metanol-água, 9:1 v/v).

Ensaio de validação

Para a validação do método, os parâmetros ensaiados devem obedecer a Resolução de número 899 de 23 de maio de 2003, que regulamenta a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Foram respeitados os parâmetros de seletividade, exatidão e precisão, limite de quantificação e detecção, linearidade e robustez.

Seletividade

A capacidade seletiva do método foi demonstrada pela análise de amostras positivas, contendo o fármaco e amostras negativas, que não o continham, ditas amostras branco, estas foram então comparadas com o material de referência, a solução padrão do analito. O ensaio foi realizado em cinco repetições das amostras branco.

Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção de uma curva de calibração, a partir de uma solução padrão de Fenobarbital, foram preparadas soluções diluídas em 5 (cinco) concentrações diferentes: $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, com três réplicas cada concentração (n=3). Segundo critério da RDC 899/2003, o coeficiente de correlação (r) aceitável deve ser no mínimo igual a 0,99.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da análise de amostras em três níveis de concentrações, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (baixa), $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (média) e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (alta), com três réplicas para cada concentração (n=3). A exatidão foi determinada pelo percentual de

recuperação, expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Precisão

O parâmetro precisão foi avaliado a partir de 6 (seis) determinações de igual concentração teórica, 200 µg/mL, concentração média no teste de exatidão. Demonstrou-se o grau de repetibilidade (precisão intra-corrída), concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, executado pelo o mesmo analista e mesma instrumentação e reprodutibilidade (precisão inter-corrídas) para garantir a equivalência entre os resultados, quando obtidos em dias diferentes e com analistas diferentes. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação percentual (%CV), obtidos pela relação: $\%CV = DP \times 100 / CMD$, em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (BRASIL, 2003).

Limite de detecção e quantificação

Segundo Brasil (2003), os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as equações $LD = DP \times 3/IC$ e $LQ = DP \times 10/IC$, em que DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com três curvas analíticas e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas.

Robustez

A robustez do método cromatográfico foi ensaiada por análises das amostras sob diferentes condições. Mudanças no fluxo (0,7 – 0,9 mL min⁻¹) e variando-se a temperatura do forno de coluna (39 - 41 °C). Os efeitos nos parâmetros tempo de retenção e área dos picos foram observados, para demonstração da resistência do método às pequenas variações.

Ensaio cromatográfico e condições analíticas

Utilizou-se de um método binário, em que a fase móvel foi constituída de uma mistura metanol/água (90:10, v/v), bombeado a uma vazão de fluxo eluente de 0,8 mL min⁻¹ e isocrático. O volume da amostra injetado foi de 25 µL. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 220 nm, com tempo de corrida total de 7,5 minutos.

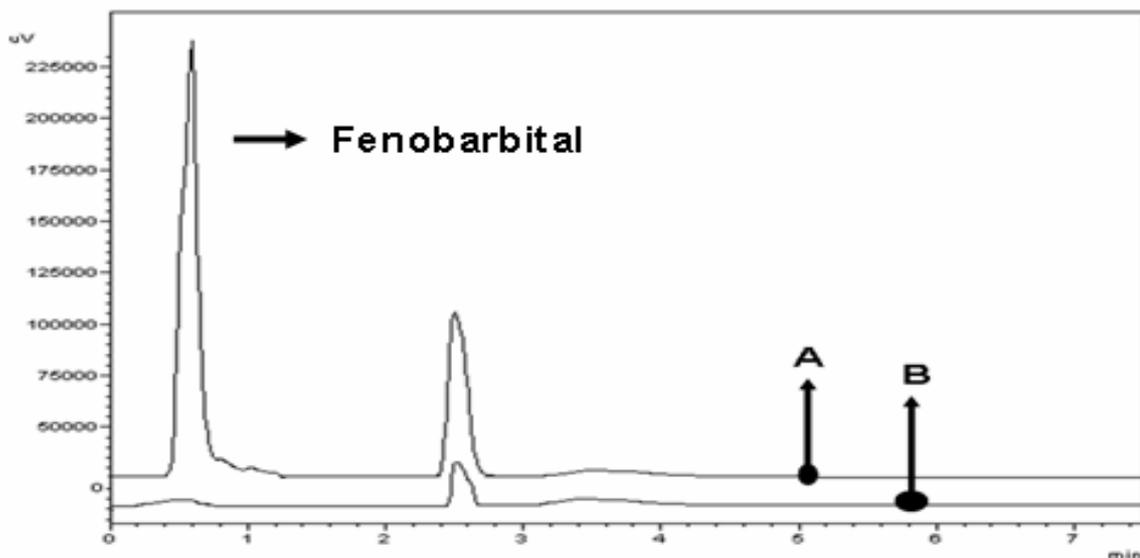
4. DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

Em metodologias analíticas, para garantir a confiabilidade de suas informações, se faz necessário que essa seja submetida a uma avaliação, designada por validação. Consiste em um

processo contínuo e tem início com o planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento do método (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2004). Então com um tempo de análise intra-corrída de 7.5 minutos, para o Fenobarbital, obteve-se um tempo de retenção equivalente à 0,456 minutos (Figura 02).

Por ser a técnica mais interessante desenvolvida nos últimos anos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE pode ser utilizada para a identificação, quando a amostra é comparada a um padrão de referência, através de seu tempo de retenção (MARTINS, 2007). Sendo assim um parâmetro de desempenho analítico, a seletividade, fez-se uso desse artifício para promover a confiabilidade do resultado. Essa se revelou estar em conformidade, para o analito em estudo, pois amostras de urina, sem o fármaco, não apresentaram nenhum pico interferente no seu tempo de retenção.

Figura 02. Representação do cromatograma do Fenobarbital em urina (A) e da amostra branco de urina (B) para obtenção da seletividade do método.



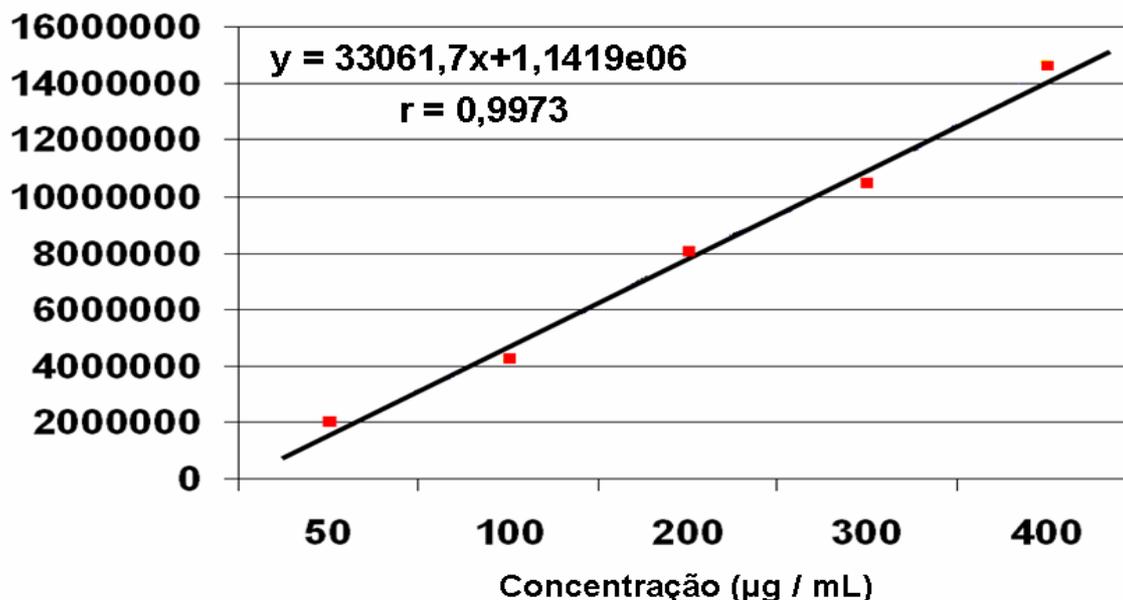
Fonte: Dados da pesquisa.

No entanto, a seletividade, por ser o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico, essa deve ser continuamente reavaliada, pois caso essa não seja assegurada, compromete a linearidade, a exatidão e a precisão do método analítico (RIBANI, et al., 2004).

A faixa de linearidade do método proposto foi de 50 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Partindo-se de três curvas padrão de calibração (Tabela 01), obedecendo à curva analítica ($y=33061,7x+1,1419e^{06}$), representada pela Figura 03, essa obtida pelo método dos mínimos quadrados, que procura minimizar o efeito da diferença entre o valor estimado e os dados

observados. Os resultados obtidos demonstraram ser diretamente proporcionais às concentrações do fármaco presente na matriz.

Figura 03. Curva de calibração do Fenobarbital pelo método Ultra-Fast LC (UFLC).



Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração é de 0,99 (BRASIL, 2003), sendo no experimento obtido um valor médio, das três curvas, 0,9973 (Tabela 01), o que atende as especificações impostas pela legislação vigente, indicando que o método proposto apresenta linearidade significativa no intervalo especificado. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de $37,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $126,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 01. Resultados das áreas dos picos e coeficientes de correlação

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
50,0	1705412	1969481	2573246
100,0	4027830	4441638	4372429
200,0	7974163	8054704	8167933
300,0	10058522	9918278	11557704
400,0	14865385	15065293	14041266
	$r = 0,9940$	$r = 0,9908$	$r = 0,9946$
	Média $r \pm dp = 0,99 \pm 0,00204$		Coef. Variação = 0,21

Fonte: Dados da pesquisa.

Nos experimentos da exatidão, o ensaio deve ser realizado, após a avaliação da linearidade e seletividade. Foi testado a partir de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, com três réplicas de uma concentração baixa ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), média ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e alta ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$) conforme descrito na Tabela 02.

Tabela 02. Exatidão do método

Ensaio	Concentração Normal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Encontrada Média \pm DP (n=3)	Exatidão (%)
Exatidão	100,0	$50,38 \pm 0,81$	50,38
	200,0	$132,04 \pm 5,54$	66,02
	300,0	$219,81 \pm 7,27$	73,27

Fonte: Dados da Pesquisa.

Na Tabela 03, partindo-se da sextuplicata (n de 06), concentração teórica ($200\mu\text{g mL}^{-1}$), avaliou-se a precisão intra-corrída, o grau de repetibilidade do ensaio, precisão inter-corrídas e nível de reprodutibilidade do método.

Tabela 03. Precisão intra-corrída e precisão inter-dia

Analista	Dia	Concentração Normal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Encontrada Média \pm DP (n = 6)	Precisão (%)
Analista 1	Dia 1	200,0	$137,30 \pm 13,38$	7,54
	Dia 2	200,0	$142,50 \pm 11,64$	6,43
Analista 2	Dia 1	200,0	$166,52 \pm 11,69$	7,02
	Dia 2	200,0	$153,68 \pm 7,76$	4,47

Fonte: Dados da Pesquisa.

Com os resultados obtidos, o método não demonstrou precisão nem exatidão. Os valores médios do desvio padrão relativo é de 6,4% para a precisão, sendo não aceitável, pois a legislação vigente não aceita valores superiores a 5,0%. Para a exatidão, a média de recuperação variou de 63,0%, tendo como ponto de partida, a preparação das amostras com a partição líquido-líquido.

Entretanto, por se tratar de uma etapa manual, a preparação das amostras, exige habilidade do analista, bem como da técnica empregada no método, assim a preparação da amostra consiste no ponto crítico da análise, fazendo com que a precisão e exatidão do método fiquem estritamente dependentes dos procedimentos de partição das matrizes biológicas (GIL *et al.*, 2010). Assim, também, segundo Ribani et al. (2004), para o método de

extração, a taxa de recuperação não precisa ser necessariamente 100%, desde que a extensão da recuperação do analito e do seu padrão seja consistente e reprodutíveis.

O rendimento do processo de Extração Líquido-Líquido (ELL) está relacionado diretamente com a escolha do solvente orgânico, quanto maior a afinidade desse pelo analito, maior a eficiência. O ajuste do pH da amostra deve ser considerado, principalmente quando se trabalha com substâncias de caráter ácido ou básico. Faz-se necessário sua correção, a fim de impedir a ionização do analito, deixando-o mais solúvel na fase orgânica, assegurando uma boa recuperação (QUEIROZ; COLINS; JARDIM, 2001).

Observa-se nas Tabelas 04 e 05, os ensaios de robustez, para avaliação das variações no fluxo e na temperatura. Os valores da área e tempo de retenção de uma solução de Fenobarbital, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, diluída em fase móvel, mostrou variações tanto para o fluxo quanto para a temperatura. Entretanto, o método demonstrou ser mais resistente às variações na temperatura, indicando que o método é robusto de acordo com as condições analisadas. Assim a faixa de temperatura ensaiada, poderá ser adicionada ao método, sem maiores danos.

Tabela 04. Resultados da variação de fluxo no ensaio de robustez

Fluxo	Área	Tempo de Retenção
0,7 mL min ⁻¹	197362,5	0,513
0,8 mL min ⁻¹	174075,5	0,456
0,9 mL min ⁻¹	157396,2	0,412

Fonte : Dados da Pesquisa.

Tabela 05. Resultados da variação de temperatura no ensaio de robustez

Temperatura	Área	Tempo de Retenção
39 °C	1736335,1	0,457
40 °C	1760332,6	0,458
41 °C	1733586,3	0,455

Fonte: Dados da Pesquisa.

A robustez consiste na avaliação do nível de reprodutibilidade dos resultados, mediante análises de algumas amostras, quando submetidas a uma variedade de condições normais de teste, tais como mudanças no lote de reagentes, temperatura, fluxo. Se mesmo com estas mudanças, o método resistir, e os resultados estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI et al., 2004).

5 CONCLUSÃO

Finalizando os ensaios, o método proposto, foi desenvolvido a fim de disponibilizar um procedimento analítico, para identificação e quantificação do Fenobarbital em amostras de urinas humana, para auxílio no diagnóstico às exposições tóxicas ao barbitúrico. Os parâmetros avaliados garantiram seletividade, linearidade e, robustez, no entanto não houve exatidão e precisão, obrigando assim que a otimização do método seja revista, conforme exige a RDC 899/2003 (BRASIL, 2003).

ABSTRACT

The body's response to medication, when in excessive doses, resulting in toxic exposures. However the existence of a health service that specializes in emergency care provides immediate treatment of the patient. However resources are required to assist in the prognosis of human poisoning. Therefore, we attempted to validate an analytical method for identification and quantification of Phenobarbital in human urine. The test used an Ultra-Fast Liquid Chromatograph (UFLC) using an RP-C18 column with UV detector at 220 nm and mobile phase consisting of a mixture of methanol / water (90:10, v/v), flow 0,8 ml min⁻¹ and binary. The parameters used in the optimization were: linearity, selectivity, accuracy, precision, detection limit and quantification limit and robustness. The method proved to be selective, robust and linear in the range 50 to 400 mg mL⁻¹ (r = 0.9973), according to parameters specified by the RDC. 899 of May 23, 2003. Limits of detection and quantification were 37.0 126.40 mg mL⁻¹, respectively. However, the accuracy and precision of the method proved to be insufficient, requiring re-evaluation of these parameters.

KEYWORDS: Analytical method. Validation. High performance liquid chromatography.

REFERÊNCIAS

AMARAL, D. A.; BARCIA, S. A. D. Intoxicações por medicamentos. In: Oga S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p.369-79, 2008.

AMÉRICO, M. A.; MOSSIN, S. A. G.; NISHYAMA, P. Perfil de fármacos por espectrofotometria no ultravioleta. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 257-9, 2008.

BERTOLDI, A. D.; BARROS, A. J. D.; HALLAL, P. C.; LIMA, R. C. Utilização de medicamentos em adultos: prevalência e determinantes individuais. **Revista de Saúde Pública**, Pelotas, v. 38, n. 2, p. 228-38, 2004.

BORTOLETTO, M. E.; MARQUES, M. B.; BEZERRA, M. C. C.; SANTANA, R. A. L.; BOCHNER, R. Análise Epidemiológica dos casos registrados de intoxicação humana no Brasil no período de 1985-1993. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 2, n. 9, p. 11-12, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 899 de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União 02 de junho de 2003.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 889-90, 2006.

DALMORA S. L.; SANGOI, M. S.; NOGUEIRA, D. R.; D'AVILA F.B.; SVERDLOF, C. E.; BORGE, N.C.; MORENO, R. A. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. **Química Nova**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 124-9, 2010.

DEGANI, A. L. G.; QUEZIA B. C.; VIEIRA, P. C. Cromatografia, um breve histórico. **Química Nova**, São Paulo, n. 7. p. 21-5, 1998.

FORSAN, M. A. O uso indiscriminado de benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado. 26 f. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização (Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais. Campos Gerais, 2010.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; SERRANO, S. H. P.; FISCHER, D. C. H.; MACHADO, S. A.S.; MATIAS, R.; BARA, M. T. F.; CIRILO, H. N. C.; FIGUEIREDO, G.; BARBOSA, W. G. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, p.41-51, 2010.

GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006, 1821 p.

GRAEF, L. E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

GUEIRREIRO, C.A.M. História do surgimento e desenvolvimento das drogas antiepilépticas. **J. Epilepsy Clin. Neurophysiol**, Campinas, v. 12, n. 1. supl. 1, p. 18-2, 2006.

KARP J. **Biologia Celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2005.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. 1. ed. São Carlos: Rima, 62 p. 2004.

LIMA, L. R.; XAVIER, H. S.; MEIRA, J. L.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.16, n. 4, Outubro/Dezembro, 2006.

MARGONATO, F B; THOMSON, Z; PAOLIELLO, M.M.B. Determinantes nas intoxicações medicamentosas agudas na zona urbana de um município do Sul do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 333-41, 2008.

MARTINS, M. T. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos, estudo preliminar de estabilidade e ensaio de dissolução do antiepiléptico triazínico lamotrigina na forma farmacêutica comprimido**. 2007, 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, 2007.

MOREAU E. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Ciências Farmacêuticas**. Toxicologia Analítica. 1 ed. São Paulo, Guanabara Koogan, p. 40-5, 2008.

MÜLLER, J. L. **Cultivo de *Scharyomyces boulardii* em biorreator tipo air-lift e em frascos agitados mecanicamente**. 2006. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2006.

NEGREIROS, R. L; CASTILHO, S. R. **Agravos provocados por medicamentos em crianças até 12 anos de idade, no Estado do Rio de Janeiro, entre os anos 2000 e 2001**. 2006. 56 p. Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do adolescente. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.

NUNES, L. C. C.; ROCA, M. F. L.; ROLIM NETO, P. J.; SOARES S. J. L. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico: Passo Importante na Produção de Medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 177-80, 2007.

PASTORE, M. E.; OFUCHI, A. S.; NISHYAMA, P. Monitorização terapêutica de fenobarbital. **Acta Sci. Health Sci**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 125-31, 2007.

PERES, T. B. **Noções Básicas de Cromatografia**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental. Biológico. São Paulo. v. 64, n. 2, p.227-9, 2002.

PRADO, J. N.; PISSATTO, S. MORAIS, E. C.; FOPPA, T. MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para doseamento de cápsulas de fluoxetina. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 3, p. 436-40, 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. São Paulo: Elsevier Medicina, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 86 p. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro, 2004.

SCHELLACK, G. **Farmacologia, uma abordagem didática**. 1 ed. São Paulo, Fundamento, p.17-9, 2008.

SILVA, C. H. DA; GIUGLIANI, E.R.J. Consumo de medicamentos em adolescentes escolares: uma preocupação. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 80, n. 4, p. 326-32, 2004.

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**, Araraquara, v. 31, n. 1, p. 41-6, 2010.

SILVA, M.A.S. Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 436-40, 2006.

SILVA, S. L. **Cromatografia Gasosa**. Disponível na internet em. <samuellsilva.googlepages.com/cromatogasliquidespectroatomica.pdf>. Acessado em 04/10/2011.

SINITOX, Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica. **Centro de Informação Científica e Tecnológica**, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em 04/10/2011.

TÔRRES, A. C. B. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Uma Revisão de Literatura**. 2009, p. 36. Seminário (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiana, 2009.

United States Pharmacopeia Convention (USP). *US Pharmacopeia 24*, Validation of Compendial Methods, 1225, Rockville, 1999.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A., MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, Paraná, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de Captopril. Comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 357-64, 2004.

VILARINO, J. F.; SOARES, I. C.; SILVEIRA, C. M. DA; RÖDEL, A. P. P.; BORTOLI, R.; LEMOS, R. R. Perfil da automedicação em município do Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 43-9, 1998.