

Artigo

Desenvolvimento e Validação de Método de Quantificação de Furosemida por RMN de ^1H

da Costa, L. F.; Alcanfor, S. K. B.; de Oliveira, A. L.*

Rev. Virtual Quim., 2016, XX (XX), no prelo. Data de publicação na Web: 8 de setembro de 2016<http://rvq.sbgq.org.br>**Development and Validation of Furosemide Quantification Method By ^1H NMR**

Abstract: Furosemide is a potent diuretic used for treatment of edema, hypertension and renal disease, among others. In this work, a simple and accurate method using ^1H NMR has been developed for quantification of furosemide in pharmaceutical formulations. All evaluated parameters (selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification) showed satisfactory results. Five pharmaceutical formulations (tablets) were analyzed by the developed method and the method described in the Brazilian Pharmacopoeia. Results show no significant differences between them. Thus, furosemide quantification by NMR technique proved to be a promising method as an alternative for assessing the quality of medicines.

Keywords: NMR; quantification; furosemide; pharmaceutical formulations.

Resumo

Furosemida é um potente diurético usado para o tratamento de edema, hipertensão, doenças renais, entre outras. Neste trabalho, um método simples e acurado utilizando RMN de ^1H foi desenvolvido para quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas. Todos os parâmetros avaliados (seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação) apresentaram resultados satisfatórios. Cinco formulações farmacêuticas (em comprimidos) foram analisadas pelo método desenvolvido e pelo método descrito na Farmacopeia Brasileira. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre eles. Assim, a quantificação furosemida pela técnica de RMN provou ser um método promissor como uma alternativa para a avaliação da qualidade dos medicamentos.

Palavras-chave: RMN; quantificação; furosemida; formulações farmacêuticas.

* Universidade de Brasília, Instituto de Química, CP 04478, CEP 70910-000, Brasília-DF, Brasil.

✉ aline.alo@gmail.com

DOI:

Desenvolvimento e Validação de Método de Quantificação de Furosemida por RMN de ^1H

Luana F. da Costa,^a Silvia Keli B. Alcanfor,^b Aline L. de Oliveira^{a,*}

^a Universidade de Brasília, Instituto de Química, CP 04478, CEP 70910-000, Brasília-DF, Brasil.

^b Universidade Católica de Brasília, CEP 71966-700, Brasília-DF, Brasil.

* aline.alo@gmail.com

Recebido em 1 de março de 2016. Aceito para publicação em 31 de agosto de 2016

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Preparo da amostra

2.2. Análise por RMN de ^1H

2.3. Validação do Método

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da Furosemida

3.2. Curva Analítica

3.3. Validação do método

3.4. Aplicação em amostras comerciais

4. Conclusão

1. Introdução

A furosemida, ou ácido-4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoil-antranílico, é um fármaco da classe dos diuréticos que é utilizado principalmente para o tratamento de edemas, hipertensão ou para tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento com diuréticos de tiazídicos.¹⁻³ O efeito diurético da furosemida se dá através do bloqueio da absorção de sais pelos rins. Este bloqueio ocasiona o aumento da produção de urina e, conseqüentemente, a redução da quantidade de água e eletrólitos no corpo.² Infelizmente, apesar destes conhecidos

benefícios da furosemida, o medicamento também pode ser utilizado em fraudes nos esportes. Devido ao aumento na produção de urina, o medicamento pode diminuir a concentração de outros compostos considerados doping ou reduzir o peso de atletas que competem em esportes cuja separação ocorre por categorias de peso.^{2,4} Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a furosemida é comercializada no Brasil sob duas formas: comprimidos e soluções injetáveis. Os comprimidos são vendidos em cartelas e possuem 40 mg do fármaco. Já as soluções injetáveis apresentam 10 mg mL⁻¹ de furosemida e são vendidas em ampolas

contendo 2 mL da solução.⁵

Para garantir a eficácia de um medicamento e consequentemente a segurança de seus consumidores é importante que a indústria farmacêutica determine a composição final dos medicamentos comercializados.⁶ Para isso, elas se baseiam nas monografias presentes em Farmacopeias que informam as propriedades físico-químicas, os métodos de identificação e determinação da quantidade de fármacos, bem como testes para quantificação de impurezas conhecidas.⁷ Para medicamentos sintetizados, as principais impurezas são reagentes de partida, intermediários ou subprodutos de reação, compostos degradados, bem como solventes residuais. Estes compostos geralmente são identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou eletroforese capilar (EC) com detector de ultravioleta (UV).^{7,8} Segundo a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (FB 5) é possível identificar furosemida por três técnicas diferentes: a espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV), a espectrofotometria de absorção no UV e através de reações químicas de identificação.⁹

Caso os processos de obtenção de um medicamento, como extração ou rotas de síntese, sejam modificados, novas impurezas podem não ser identificadas ou quantificadas pelos métodos indicados pelas Farmacopeias Internacionais.^{7,8} A ICH (*International Conference on Harmonization*) também indica a necessidade de revalidação de um método caso haja modificações na síntese de uma substância, na composição final do produto ou no procedimento analítico.¹⁰ Após o caso da heparina contaminada nos Estados Unidos, em que mais de 100 pessoas morreram, iniciou-se uma discussão para adotar métodos alternativos para avaliar a qualidade de medicamentos.¹¹

Semelhante a outras espectroscopias, o desenvolvimento da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) estava inicialmente voltada para a identificação da estrutura molecular de compostos.¹² Os primeiros estudos com o

uso da técnica de RMN para fins quantitativos são da década de 70. Em um destes estudos, Turczan e co-autores propõem a quantificação de aminofilina, uma mistura de teofilina e etilenodiamina. Os autores compararam a técnica de quantificação por RMN com o método oficial, indicando que o novo método é mais simples, rápido e específico. Além disso, a RMN permitiu a quantificação de ambos os componentes em uma única análise, diferentemente do método oficial que necessitava de duas titulações para um mesmo medicamento.¹³

Diferente de outras técnicas, a RMN de maneira geral dispensa métodos de separação para analisar quantitativamente o analito de interesse. Assim, solventes residuais, excipientes, produtos degradados e outras impurezas em medicamentos podem ser identificados e posteriormente quantificados.¹⁴ No caso de falsificações em que há a adição intencional de impurezas ou diluentes, a qualidade do medicamento pode ser aferida com facilidade, pois componentes orgânicos adicionados apresentarão sinais característicos nos espectros de RMN de ¹H ou ¹³C. Desta forma é possível afirmar que uma impureza orgânica desconhecida dificilmente não seria detectada por RMN, e que este pode ser considerado um detector universal capaz de identificar falsificações em medicamentos.^{7,11} O potencial dessa técnica para a análise de fármacos se reflete no fato de que métodos de análise quantitativa de fármacos usando a RMN já foram oficializados e constam em farmacopeias internacionais, como na Farmacopeia Americana.⁸

Nesse contexto, o presente trabalho apresenta um novo método de quantificação de furosemida utilizando-se a técnica de RMN. O método proposto mostrou-se simples e rápido para a quantificação de furosemida em formulações farmacêuticas.

2. Parte Experimental

2.1. Preparo de amostra

Amostras de furosemida pura foram pesadas em balança analítica nas quantidades necessárias para obter as concentrações indicadas na curva analítica e validação do método. Foram adicionados 540 μL de D_2O contendo ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS) como referência interna (0 ppm), 50 μL de solução de NaOH 1 mol.L^{-1} , 10 μL de solução de acetato de sódio (NaAcO) $0,74 \text{ mol.L}^{-1}$, totalizando 600 μL de solução. A mistura foi homogeneizada por simples agitação e o volume total transferido para os tubos de RMN. Medicamentos contendo 40 mg de furosemida de cinco marcas diferentes foram adquiridos em comércio local. Os comprimidos foram pesados antes e após serem macerados para análise do equivalente a 13,3 mg de furosemida. Foram adicionados 720 μL de D_2O contendo DSS como referência interna (0 ppm), 67 μL de solução de NaOH 1 mol.L^{-1} e 13 μL de solução de NaAcO $0,74 \text{ mol.L}^{-1}$, totalizando 800 μL de solução. As soluções das formulações farmacêuticas foram agitadas vigorosamente e centrifugadas por 2 minutos a 3000 rpm. Uma alíquota de 600 μL foi retirada do sobrenadante para posterior análise do fármaco na presença de excipientes solúveis.

Para comparação dos resultados, também foram preparadas e analisadas amostras com base na descrição da FB 5.⁹

2.2. Análises por RMN de ^1H

As medidas de RMN de ^1H foram realizadas à temperatura ambiente ($21 \text{ }^\circ\text{C}$), em um espectrômetro Varian Mercury Plus 300 de 7,0 Tesla, utilizando-se uma sonda multinuclear de observação direta de 5 mm.

Com uma das réplicas preparadas,

realizou-se inicialmente a calibração do pulso variando-se o tempo de duração do mesmo (pw), a uma potência (tpwr) de 56 dB. Obteve-se um tempo de 7,8 μs para um pulso de 90° .

Após determinação desse parâmetro, estimou-se o tempo de relaxação longitudinal (T_1) empregando-se a sequência de pulsos de inversão e recuperação; o T_1 obtido para o sinal de interesse mais lento foi de 7,2 s. Considerando-se o valor mais lento de T_1 , o tempo de reciclo foi de 40 s (d1). Os espectros foram obtidos com uma sequência de pulso com pré-saturação do sinal da água. Foram acumulados 16 transientes (nt) com 64000 pontos durante a aquisição (np) em uma janela espectral (sw) de 4800,77 Hz e um ganho igual a zero.

Após a aquisição e o processamento dos espectros de hidrogênio, a área do pico em 6,94 ppm foi relacionado com a concentração das soluções de furosemida pura para a construção da curva analítica.¹⁵

2.3. Validação do Método

A faixa de concentração da curva analítica foi determinada pela menor massa de furosemida utilizada para preparar uma solução que apresenta no espectro um valor de razão sinal-ruído acima de 250:1 e pela maior massa completamente solúvel no solvente escolhido. A curva analítica foi obtida de forma a conter no mínimo cinco pontos igualmente espaçados, sendo que cada ponto foi analisado em triplicata.¹¹ Foram preparadas soluções de 25 mg mL^{-1} , $20,8 \text{ mg mL}^{-1}$, $16,7 \text{ mg mL}^{-1}$, $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e $8,3 \text{ mg mL}^{-1}$. O coeficiente de correlação, a inclinação e o intercepto da curva padrão, bem como a tabela de análise de variância e os respectivos erros padrões foram calculados para verificar a validação do modelo linear da equação utilizada para padronizar o método.

Os parâmetros determinados para a validação do método foram: seletividade,

exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). A seletividade e especificidade do método foram testadas através da aquisição de espectros de RMN de ^1H e ^1H - ^1H COSY da furosemida pura e das formulações farmacêuticas. Também foi avaliada a substituição da solução aquosa de NaOH 0,1 mol L⁻¹ pelos solventes acetona-*d*₆ e dimetilsulfóxido-*d*₆. As soluções padrão de furosemida foram preparadas em triplicata para cada solvente e a proporção de solvente deuterado e não deuterado foi mantida. LD e LQ foram determinados considerando os cálculos descritos com base no desvio padrão e na inclinação da curva analítica.¹⁶

3. Resultados e Discussão

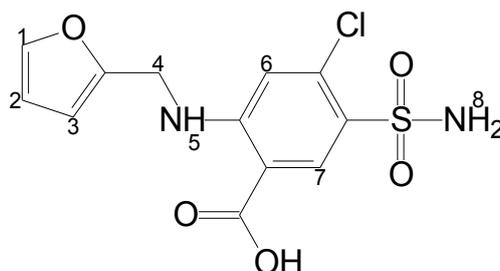
3.1. Caracterização da Furosemida

O espectro de RMN de ^1H da furosemida pura foi obtido (figura 1A) e seus sinais foram atribuídos com base em dados da literatura,

conforme apresentado na Tabela 1.¹⁷ Para as análises quantitativas, os sinais em 6,94 e 8,34 ppm, referentes aos hidrogênios H6 e H7, podem ser utilizados uma vez que esses sinais são simpletos, isolados e distantes do sinal da água cujo sinal foi saturado. Sinais próximos ao sinal saturado podem sofrer distorções na sua integração. Por esse motivo, o simpleto em 4,43 ppm, atribuído ao hidrogênio H4, foi descartado para a quantificação.

Para avaliar a possível sobreposição de sinais da furosemida com sinais dos excipientes do fármaco, os espectros de ^1H (Figura 1B) e ^1H - ^1H COSY (Figura 1C) de uma amostra de formulação farmacêutica também foram obtidos. É possível observar que os excipientes solúveis no solvente utilizado encontram-se principalmente em valores de deslocamento químico abaixo de 6 ppm. O espectro de ^1H - ^1H COSY também garantiu que não havia sinais de excipientes sobrepostos aos sinais dos hidrogênios H6 e H7 da furosemida. Para as análises quantitativas, o sinal do hidrogênio H6 (6,94 ppm) será utilizado.

Tabela 1. Estrutura da furosemida, valores de deslocamento químico de RMN de ^1H (ppm), constante de acoplamento J (Hz), integral e multiplicidade dos sinais da furosemida



Número	δ (ppm)	J (Hz)	Integração	Multiplicidade
1	7,46	0,6 e 1,8	1	Dupleto de dupleto
2	6,40	1,8 e 3,1	1	Dupleto de dupleto
3	6,34	0,6 e 3,1	1	Dupleto de dupleto
4	4,43	-	2	Simpleto
5	8,77	-	(H lábil)	Tripleto
6	6,94	-	1	Simpleto
7	8,34	-	1	Simpleto

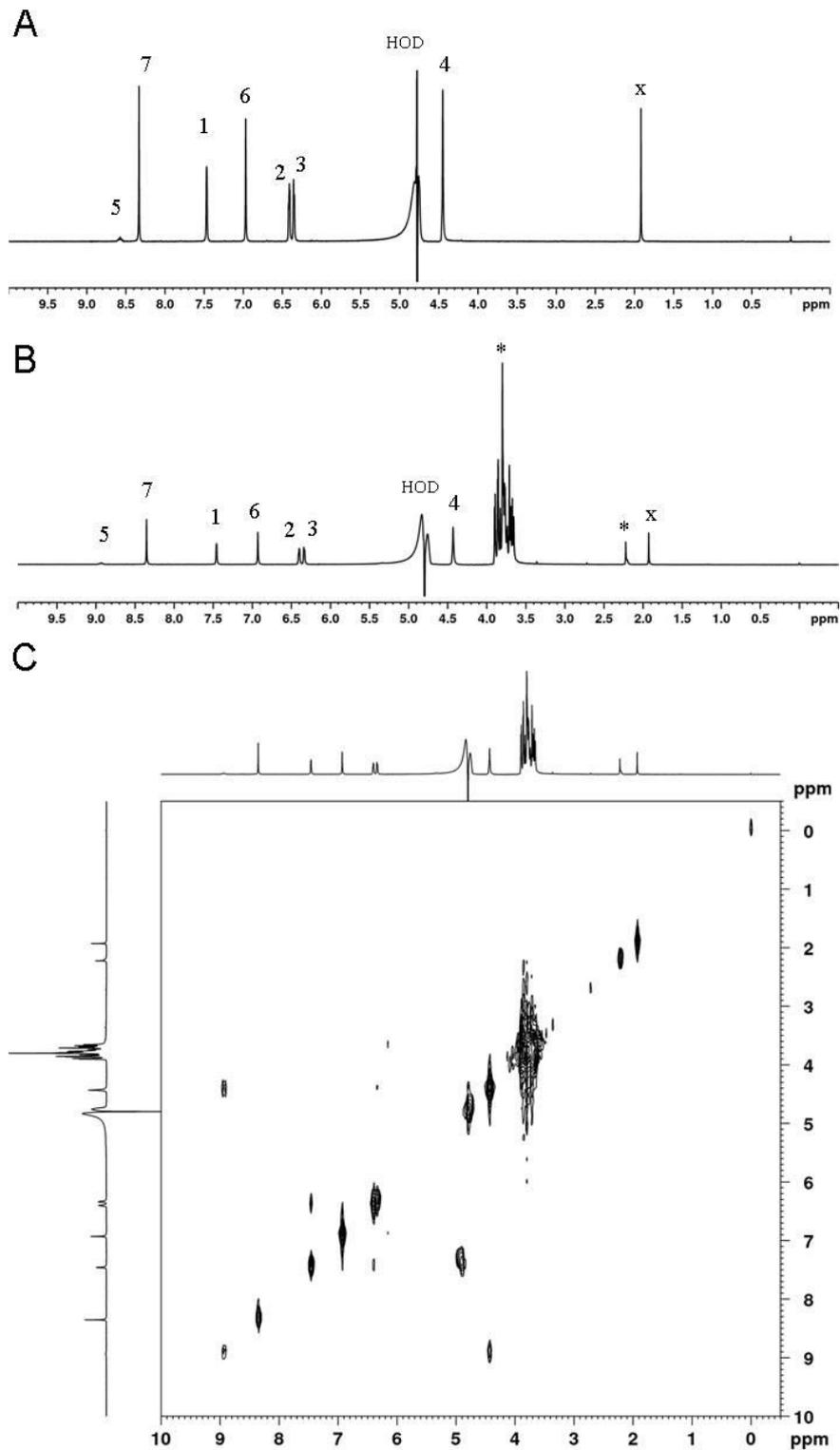


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H de furosemda pura (A) e espectro de RMN de ^1H (B) e ^1H - ^1H COSY (C) de amostra de formulação farmacêutica contendo furosemda. Os números indicam a atribuição dos sinais da furosemda (ver Tabela 1 para numeração), * indica os sinais dos excipientes da formulação farmacêutica e x indica o sinal do NaAcO adicionado no preparo das amostras

3.2. Curva Analítica

A curva analítica foi construída considerando dois fatores: a concentração mínima em que é possível obter uma relação sinal/ruído acima de 250:1 e a concentração máxima em que a furosemida é solúvel no solvente utilizado. A faixa de concentração que atendeu esses critérios foi entre 8,3 mg mL⁻¹ e 25 mg mL⁻¹. Todos os pontos da curva foram obtidos em triplicata e ajustados pelo método dos mínimos quadrados. A curva analítica apresentou coeficiente de correlação de 0,9991, mostrando-se linear. Também foi feita uma análise de variância (ANOVA) para avaliar a linearidade do método e a validade da regressão.¹⁸ Para a avaliação da relação linear entre a concentração e a área integrada do sinal, foi calculado o valor de F_{cal} (4445,19) através do teste F e comparado com o valor de F_{tab} (4,67). Como $F_{cal} > F_{tab}$, temos evidências estatísticas de que a relação linear entre a concentração e a área do sinal selecionado é significativa no nível de confiança de 95% e que a regressão é útil para previsões, pois F_{cal} é 10 vezes maior que o F_{tab} .¹⁸ O gráfico de resíduos (dado não apresentado) mostrou que os dados não apresentam heteroscedasticidade ou anormalidades. Assim, pode-se confirmar que resultados apresentados acima são válidos. Para constatar evidências de falta de ajuste o valor de F_{cal} (1,37) foi calculado. Como o valor de F_{cal} obtido não é maior que F_{tab} (3,71), não há evidências de falta de ajuste do método proposto. Assim, a equação da reta obtida foi $y = 17,936x + 14,242$, onde y é a área do sinal e x a concentração de furosemida (mg mL⁻¹).

3.3. Validação do método

O objetivo do ensaio de seletividade é garantir que o sinal a ser integrado para a quantificação esteja livre de interferentes.

Como apresentado anteriormente, os espectros de ¹H e ¹H-¹H COSY (Figura 1C) tanto da furosemida pura quanto do medicamento mostraram que o sinal utilizado para a quantificação não se sobrepõe a nenhum outro sinal e corresponde, portanto apenas ao sinal do analito.

Em seguida foi avaliada a precisão do método através do coeficiente de variação (CV) de três soluções padrões em concentrações distintas (8,5 mg mL⁻¹, 16,7 mg mL⁻¹ e 25,0 mg mL⁻¹) em triplicata, totalizando nove determinações. Os resultados de precisão para as concentrações testadas mostraram que: para a concentração de 8,5 mg mL⁻¹ o CV foi de 0,83%; para a concentração de 16,7 mg mL⁻¹ o CV foi de 2,51% e para a concentração de 25,0 mg mL⁻¹ o CV foi de 1,03 %.

Para análise de exatidão, foram preparadas seis amostras contendo 16,7 mg mL⁻¹ de furosemida. Os resultados obtidos das seis amostras foram comparados e obteve-se uma exatidão de 99,54 %. Esse resultado foi considerado satisfatório.

O LD e o LQ também foram calculados e, considerando a curva analítica construída, foram encontrados os valores de 0,91 mg mL⁻¹ e 2,77 mg mL⁻¹, respectivamente.¹⁶ Estes resultados indicam que o método desenvolvido é capaz de detectar concentrações mínimas de 0,91 mg mL⁻¹ e quantificar com um limite de confiança de 95% concentrações acima de 2,77 mg mL⁻¹ de furosemida.

Para avaliar a substituição do solvente, as amostras foram solubilizadas em acetona-*d*₆ e dimetilsulfóxido-*d*₆. As amostras foram preparadas em triplicata na concentração próximas a valores correspondentes a valores de concentração do centro da curva analítica obtida. Na Figura 2 são apresentados os espectros da furosemida nos outros dois solventes testados.

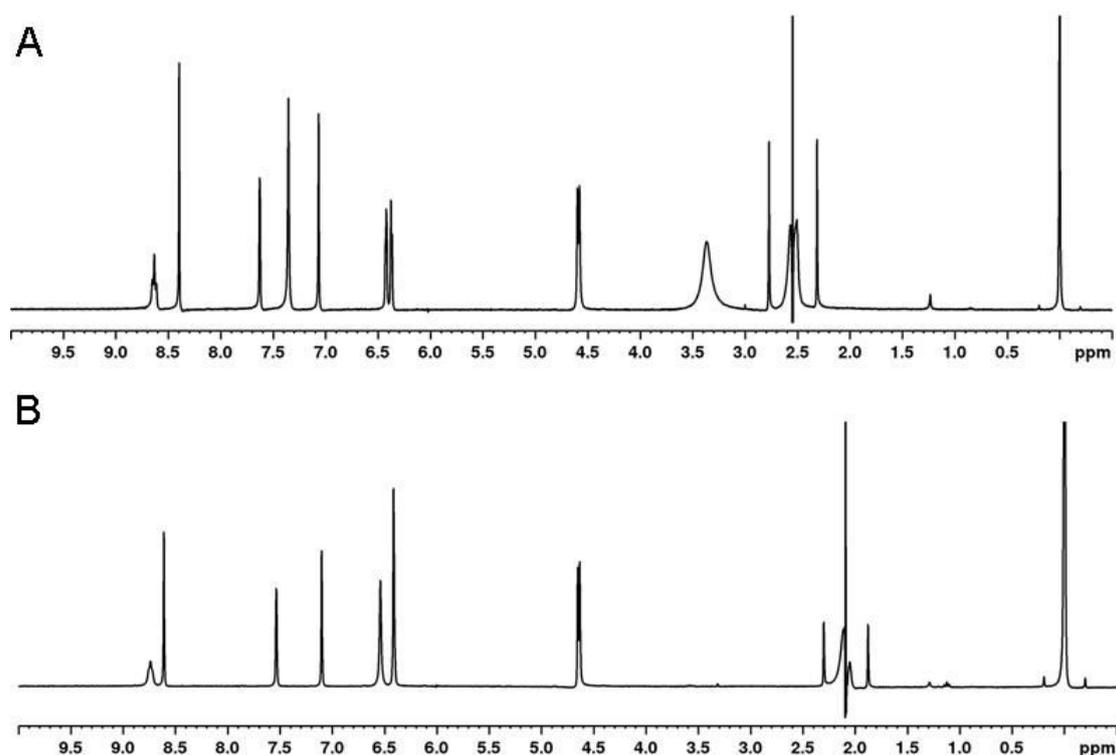


Figura 2. Espectros de RMN de ^1H da furosemida pura em dimetilsulfóxido- d_6 (A) e acetona- d_6 (B)

Em ambos os solventes testados o sinal referente ao hidrogênio H6 foi identificado, integrado e a concentração de furosemida calculada a partir da equação da reta definida pela ANOVA. Os resultados indicaram que a substituição da solução aquosa por acetona- d_6 não apresentou diferenças significativas entre a concentração esperada ($17,17 \text{ mg mL}^{-1}$) e obtida ($16,8 \pm 0,7 \text{ mg mL}^{-1}$). Entretanto, o mesmo não é observado quando o solvente é substituído por dimetilsulfóxido- d_6 . Os espectros obtidos neste solvente apresentaram picos não simétricos e a concentração calculada foi de $22,2 \pm 2,7 \text{ mg mL}^{-1}$, ou seja, um valor acima do valor esperado (17 mg mL^{-1}), mostrando que a substituição por esse solvente não é indicada.

3.4. Aplicação em amostras comerciais

As amostras de cinco marcas de formulações farmacêuticas obtidas em comércio local foram submetidas a duas

metodologias analíticas: o método oficial da FB 5⁹ e o novo método desenvolvido por RMN.

Conforme o método descrito pela FB 5, foram obtidos os espectros de UV para a furosemida pura e para as cinco marcas de formulações farmacêuticas. Os espectros de UV apresentaram máximos de absorvância em 271 e 333 nm.⁹ A absorvância em 271 nm foi utilizada para calcular a quantidade de furosemida presente nos medicamentos.

A partir do novo método desenvolvido, também foi possível quantificar furosemida em formulações farmacêuticas na presença dos excipientes. Como já era esperado, nos espectros de RMN de ^1H obtidos para as cinco marcas analisadas é possível visualizar que excipientes presentes nos fármacos solubilizam no solvente utilizado (Figura 1B). De acordo com as indicações das bulas e aos valores característicos de deslocamento químico, os sinais observados são referentes, provavelmente, aos excipientes: lactose, povidona, amido e manitol.

Os resultados obtidos utilizando ambas as técnicas, UV e RMN, estão descritos na Tabela 2. Segundo a FB 5, os medicamentos podem apresentar valores entre 90 e 110% da concentração de furosemida indicado na bula. Todas as marcas apresentaram

resultados aceitáveis pelos critérios da FB 5, com exceção da marca C que apresentou porcentagem acima da permitida ($117,26 \pm 3,7\%$) ao ser quantificada pelo o método de RMN.

Tabela 2. Porcentagens de furosemida obtidas para cinco as amostras comerciais usando-se as técnicas de UV e RMN

Amostra	UV (%)	RMN (%)
A	$101,87 \pm 3,8$	$104,73 \pm 1,0$
B	$94,30 \pm 1,5$	$105,70 \pm 3,3$
C	$94,80 \pm 4,4$	$117,26 \pm 3,7$
D	$100,28 \pm 17,1$	$102,38 \pm 6,9$
E	$95,19 \pm 0,3$	$104,20 \pm 1,8$

O teste F foi utilizado para determinar se os desvios padrões dos métodos aplicados são significativamente diferentes.¹⁹ O valor da divisão da variância do método de RMN pela variância do método de UV foi de 2,85. Este valor não é maior que o valor de F_{tab} (9,605) e assim pode-se concluir que os desvios padrões dos métodos não diferem significativamente no nível de confiança de 95%. Sabendo que os desvios padrões dos métodos utilizados não diferem significativamente, as médias obtidas por UV e RMN foram comparadas.¹⁹ O valor de t_{cal} obtido (2,60) é menor que t_{tab} (2,78), assim não há evidência estatística de que as médias são significativamente diferentes.

Os resultados obtidos utilizando-se a técnica de RMN foram satisfatórios. Quando comparado ao método de UV, a vantagem de se utilizar a técnica de RMN é que este, além de ser um método rápido, de fácil preparo de amostra e execução, é um método capaz de revelar a presença de impurezas orgânicas previamente desconhecidas, acompanhadas de sua informação estrutural. Isso torna possível avaliar casos de falsificações com substâncias similares à furosemida, ou produtos de decomposição do princípio ativo, entre outros, que tem sido uma preocupação crescente dos órgãos reguladores.

Este estudo apresentou resultados promissores da aplicação da técnica de RMN de ^1H para análises quantitativas de furosemida em formulações farmacêuticas, mostrando-se um método simples, rápido e eficiente. O método proposto foi validado de acordo com as figuras de mérito mais indicadas para avaliação de métodos desenvolvidos para RMN quantitativo. Foram avaliados a seletividade, precisão, a exatidão, LD e LQ e a alteração do solvente. Todos os resultados apresentaram valores satisfatórios. Foi possível quantificar furosemida em amostras de fármacos e, ao comparar com os métodos da FB 5, não foram encontradas evidências de que os resultados obtidos pelos diferentes métodos sejam significativamente diferentes. Assim, o método por RMN proposto para quantificar furosemida em formulações farmacêuticas mostrou-se promissor como um método alternativo na avaliação da qualidade de medicamentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade de Brasília (UnB) e a Universidade Católica de Brasília (UCB) pelo apoio financeiro e

4. Conclusão

disposição de toda a estrutura necessária para o desenvolvimento de experimentos.

Referências Bibliográficas

- ¹ Kwakye, J. K. Use of NMR for quantitative analysis of pharmaceuticals. *Talanta* **1985**, *32*, 1069. [CrossRef] [PubMed]
- ² Bosch, M. E.; Sánchez, A. J. R.; Rojas, F. S.; Ojeda, C. B. Recent developments in analytical determination of furosemide. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* **2008**, *48*, 519. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Sweetman, S. C. Martindale: the complete drug reference. 35a. ed. London: Pharmaceutical Press, 2007, Vol. 2.
- ⁴ Xi, J.; Ji, X.; Zhang, S.; Ai, X.; He, Z. Investigation of RuBPS–Ce(IV) chemiluminescence reaction and its application in determination of two diuretics. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *541*, 191. [CrossRef]
- ⁵ Sítio da Anvisa. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso: 27 de agosto de 2015
- ⁶ McKenzie, J. S.; Donarski, J. A.; Wilson, J. C.; Charlton, A. J. Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2011**, *59*, 336. [CrossRef]
- ⁷ Holzgrabe, U.; Malet-Martino, M. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2011**, *55*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B. Quantitative NMR spectroscopy—Applications in drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *38*, 806. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ *Farmacopéia Brasileira*, ANVISA, Brasília, 5a. ed.; 2010, vol.2.
- ¹⁰ Sítio Guideline Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 1996. Disponível em: <www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acesso: 27 de agosto de 2015
- ¹¹ Holzgrabe, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2010**, *57*, 229. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Grivet, J. P. *Signal Treatment and Signal Analysis in NMR*, Elsevier: Amsterdam, 1996.
- ¹³ Turczan, J. W.; Goldwitz, B. A.; Nelson, J. J. Nuclear magnetic resonance analysis of pharmaceuticals-VII: Determination of aminophylline in tablets. *Talanta* **1972**, *19*, 1549. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Forshed, J.; Andersson, F. O.; Jacobsson, S. P. J. NMR and Bayesian regularized neural network regression for impurity determination of 4-aminophenol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, *29*, 495. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Santos, M. da S.; Colnago, L. A. Validação de Método Quantitativo Por RMN de ¹H para Análises de Formulações Farmacêuticas. *Química Nova* **2013**, *36*, 324.
- ¹⁶ Holzgrabe, U. *qNMR Spectroscopy in Drug Analysis – A General View*, Elsevier: Amsterdam, 2008.
- ¹⁷ Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. *Introduction to spectroscopy*. 4a. ed. Belmont: Brooks/Cole, 2009.
- ¹⁸ Barros Neto, B. de; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 4a. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- ¹⁹ Miller, J. N. Miller; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6a. ed. Edinburgh: Pearson, 2010.