

Na avaliação da seletividade, os espectros de absorção de cada analito foram sobrepostos na porção ascendente, topo e descendente do pico (Figura 14), evidenciando a especificidade do método para as substâncias de interesse: psoraleno e bergapteno, e fluoxetina. Vale ressaltar, que para a fluoxetina (pico 3, Figura 14) objetivou-se apenas a detecção tornando aceitável o alargamento do pico cromatográfico.

5.2.2 Linearidade

O método mostrou-se linear entre as concentrações de 0,1 a 10,00 µg/mL para o psoraleno e bergapteno. A curva de calibração e seus parâmetros estão apresentados a seguir (Figura 15; Tabela 8).

Figura 15 Curvas de calibração do psoraleno e do bergapteno em solução de Ringer na faixa de concentração de 0,1 a 10,00 µg/mL. Cada valor representa a média de 06 determinações, em 03 dias distintos.

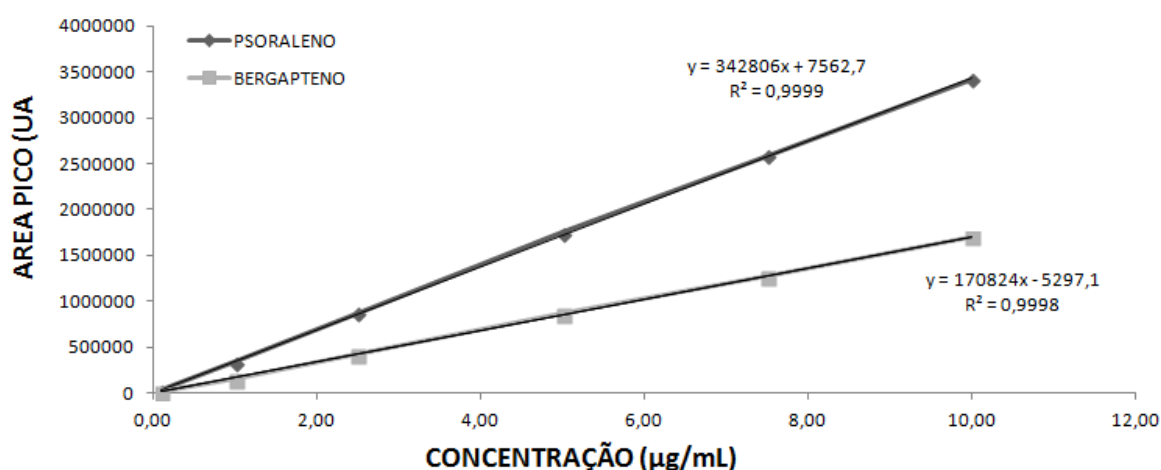


Tabela 8 Parâmetros relativos à curva de calibração do método analítico na faixa de concentração entre de 0,1 a 10,00 µg/mL.

Dia	Inclinação (área ±DP)		Intercepto-y (área ±DP)		Coeficiente de Correlação	
	P*	B*	P*	B*	P*	B*
1 (n=2)	340423,00 ±	170483,00 ±	12112,05 ±	276,85 ±	0,9997	0,9999
	1381,69	605,28	8639,36	3916,45		
2 (n=2)	345188,00 ±	171164,50 ±	3013,59 ±	-10871,30 ±	0,9999	0,9986
	86,27	3517,86	3901,26	9449,35		
3 (n=2)	344455,00	167240	4911,20	140,00	0,9999	0,9990
	± 513,4	± 810,3	± 1235,2	± 1914,49		

*P=psoraleno; B=bergapteno

5.2.3 Limite de quantificação inferior

Os limites de quantificação estão apresentados na tabela 09, assim como as informações a cerca das curvas de calibração consideradas no cálculo de tal parâmetro.

Tabela 9 Limite de quantificação do método analítico, segundo RE 899 (BRASL, 2003). Dados obtidos a partir das médias das curvas de calibração diárias (N=2), em 3 dias distintos. Nível de significância para LQI = 95%.

	Intercepto (média±DP)	Inclinação (média±DP)	LQI (µg/mL)	Intervalo de confiança*
Psoraleno	6678,90 ± 4799,90	343355,33± 2565,79	0,14	0,06 - 0,21
Bergapteno	169629,33 ± 1712,30	-3484,60 ± 6397,17	0,38	0,15 - 0,45

5.2.4 Precisão e exatidão

A precisão intra-dia, inter-dia e inter-analista variou de 0,82 a 2,05% e 2,36 a 7,78% para psoraleno e bergapteno, respectivamente.

A exatidão obtida foi de -4,49 a -0,20% e 0,83 a 1,83% para psoraleno e bergapteno, respectivamente nas amostras analisadas em dias diferentes por diferentes analistas

Os valores encontrados para precisão e exatidão ficaram abaixo dos 11,80 %, demonstrando baixa variação dos resultados (precisão < 7,78%) e também, que as concentrações encontradas estão próximas ao valor real (exatidão < 11,80%).

5.2.5 Estabilidade

As soluções padrão estoque de psoraleno e bergapteno se mantiveram estáveis por, pelo menos 77 dias, quando acondicionadas em frascos de vidro âmbar e mantidas em geladeira, armazenadas à temperatura de 4°C. Os desvios apresentados para psoraleno e bergapteno foram inferiores a 4,60%

Quanto aos dados obtidos para estabilidade de curta duração, estabilidade pós processamento e estabilidade de longa duração, os mesmos estão apresentados na Tabela 10, e foram satisfatórios para a finalidade do estudo.

Tabela 10 Precisão e exatidão intra e inter-dias do método analítico, em três níveis distintos. Dados obtidos a partir das curvas de calibração diárias, em 3 dias distintos.

C nominal (µg/mL)	Dia	Cencontrada Média (µg/mL ± DP; %DPR)		%EPR	
		Psoraleno	bergapteno	Psoraleno	bergapteno
Variação Intra-dia					
0,5*	1	0,47 ± 0,01	0,50 ± 0,00		
		1,33	0,11	-5,04	-0,78
	2	0,49 ± 0,01	0,56 ± 0,01		
		1,40	1,61	-2,65	- 11,80
	3	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01		
		2,06	2,16	-5,78	- 5,67
4,5*	1	4,40 ± 0,03	4,45 ± 0,09		
		0,77	1,97	-2,25	-1,21
	2	4,42 ± 0,04	4,52 ± 0,07		
		0,81	1,62	-1,74	0,50
	3	4,44 ± 0,04	4,64 ± 0,05		
		0,83	1,15	-1,29	3,20
8,5*	1	8,46 ± 0,05	8,39 ± 0,16		
		0,56	1,93	-0,45	-1,34
	2	8,42 ± 0,10	8,63 ± 0,08		
		1,29	0,93	-0,80	1,54
	3	8,56 ± 0,10	8,95 ± 0,15		
		1,20	1,66	0,65	5,28
Variação Inter-dia					
0,5**		0,48 ± 0,01	0,51 ± 0,04		
		2,05	7,78	-4,49	1,78
4,5**		4,42 ± 0,04	4,54± 0,11		
		0,92	2,36	-1,76	0,83
8,5**		8,48 ± 0,10	8,66 ± 0,27		
		1,13	3,13	0,20	1,83

*Valores (média,DP; %DPR) de n=3 observações

** Valores (média, DP, %DPR) de n=9 observações

Tabela 11 Estabilidade do psoraleno e do bergapteno em amostras de microdialisado de controle de qualidade. Cada resultado representa a média de três determinações em 3 dias distintos.

C nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Estabilidade de curta duração: temp. ambiente (5 h)		Estabilidade pós processamento: amostrador por 12 h		Estabilidade de longa duração: refrigeradas por 24 h	
	Conc ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ DPR%)	Exatidão (%)	Conc ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ DPR%)	Exatidão (%)	Conc ($\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}$ DPR%)	Exatidão (%)
psoraleno						
0,50	$0,50 \pm 0,01$ 1,08	100,83	$0,50 \pm 0,00$ 0,74	100,99	$0,49 \pm 0,00$ 0,66	98,96
4,50	$4,62 \pm 0,08$ 1,71	102,69	$4,60 \pm 0,03$ 0,57	102,28	$4,46 \pm 0,09$ 1,96	99,07
8,50	$8,51 \pm 0,14$ 1,65	100,16	$8,46 \pm 0,16$ 1,93	99,51	$8,18 \pm 0,24$ 2,89	96,21
bergapteno						
0,50	$0,52 \pm 0,01$ 1,02	104,56	$0,52 \pm 0,01$ 1,28	104,53	$0,49 \pm 0,01$ 2,48	98,70
4,50	$4,58 \pm 0,17$ 3,76	101,83	$4,48 \pm 0,05$ 1,14	99,52	$4,45 \pm 0,07$ 1,63	98,97
8,50	$8,20 \pm 0,25$ 3,04	96,44	$8,31 \pm 0,04$ 0,46	97,77	$8,38 \pm 0,20$ 2,38	98,64

*Valores (média, DP e DPR%) de n=3 observações ** Valores (média, DP e DPR%) de n=9 observações

5.2.6 Comparação do método validado relativamente a Cardoso, Pires e Honda (2006); Feng et al. (2008) e Sammeta, Vaka e Murthy (2009)

Todos os métodos apresentam uma linearidade na faixa de microgramas, onde os máximos de valores encontram-se na faixa entre 10,0 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$. Porém, são notáveis as variações quanto a LQI, precisão e exatidão. O método validade possui um LQI que remete a uma interessante sensibilidade (0,14 e 0,38 $\mu\text{g/mL}$, para psoraleno e bergapteno, respectivamente). Isso é importante dada à aplicação do método na microdiálise cutânea (pele), no qual a quantidade de amostra pode ser bastante reduzida, comparada ao sangue (BOELSA et al., 2000; CHAURASIA, et al., 2007; CHAURASIA, 1999).

Os valores de precisão e exatidão do método aqui validado foram igualmente elevados, com baixa variabilidade ($\text{CV} < 11,80\%$) justificável pela baixa quantidade de interferentes na matriz analisada, dispensando-se assim, o procedimento de extração e perda dos analitos

durante o processamento de amostra. Este fato, mais uma vez, confirma uma das grandes vantagens já citadas da microdiálise na obtenção de amostras “limpas”, prontas para a análise (BOELSA et al., 2000; CHAURASIA, et al., 2007; CHAURASIA, 1999).

5.3 Desenvolvimento de método de amostragem de psoraleno e bergapteno por microdiálise

5.3.1 Recuperação relativa (%RR) em função da vazão do perfusato

Os dados de %RR obtidos sob diferentes condições experimentais de vazão, são apresentados a seguir (Figura 16). Para o psoraleno e bergapteno (1,0 µg/mL), obteve-se recuperação relativa (49,86% e 49,42%) superior em função da lenta perfusão (2,0 µL/min) da solução de Ringer através da sonda de microdiálise, decorrido o tempo de equilíbrio de 210 min.

A lei de Fick descreve a permeação dos compostos através da membrana de diálise. A partir da Eq. 1 se evidencia um comportamento no qual a difusão é dependente do gradiente de concentração. Porém, essa afirmação é aplicável apenas quando o gradiente de concentração não varia com o tempo. Assim, em estudos de microdiálise *in vitro* tem se uma relação não linear, cujo processo de difusão é descrito pela segunda lei de Fick (Eq. 10).

$$J(dm/dt) = -DiC_0 \cdot K/h \quad (\text{Eq. 10})$$

onde J é a vazão da substância por difusão, expressa em termos de massa (dm) transportada em determinado tempo (dt)

Di é o coeficiente de difusão

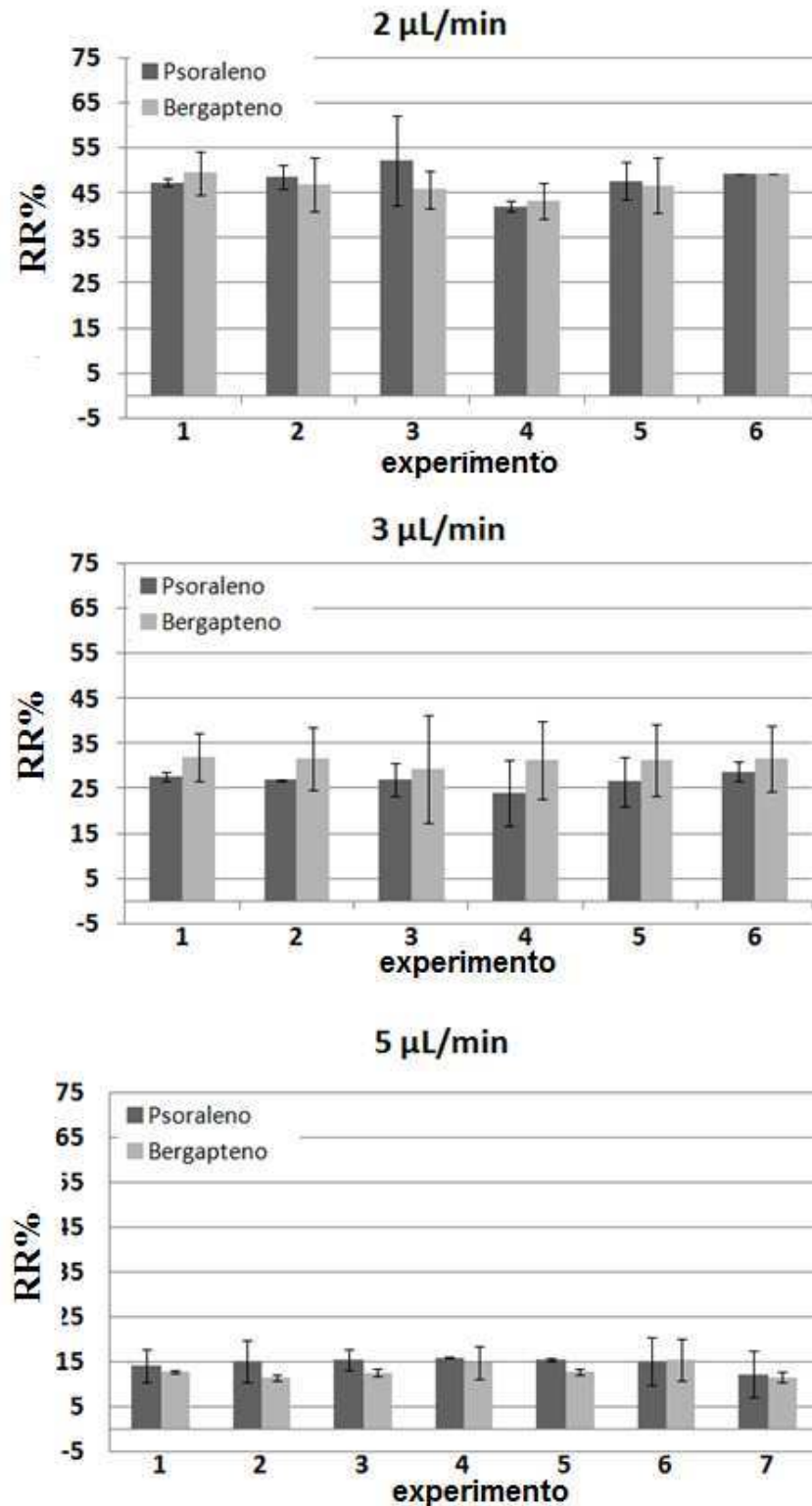
C_0 é a concentração constante do fármaco na solução doadora

K é o coeficiente de partição da substância entre o perfusato e a membrana

h é a espessura da membrana

Reduções expressivas na %RR após elevação da vazão são amplamente descritas para diferentes analitos. Abrahamsson e Winsö (2005) avaliaram a %RR da glicose *in vitro* sob vazão de 0,3-5,0 µL/min. A redução na %RR da glicose foi de $108,0 \pm 3,54\%$, para $68 \pm 3,43\%$. Igualmente para a metilnicotina, Boelsa et al. (2000) obteve uma redução de 65,2 para 25,8%, em sondas *in vitro*, quando elevou a vazão de 1,0 µL/min para 5 µL/min

Figura 16 Recuperação Relativa *in vitro* sob diferentes vazões de perfusatos (2,0 3,0 e 5,0 $\mu\text{L}/\text{min}$) de psoraleno e bergapteno (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), através da sonda CMA30 linear.



Para os psoralenos, taxas de vazão iguais ou inferiores a 3,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ são igualmente empregadas. Mary et al. (1998) em estudo de microdiálise *in vitro*, observou a redução dos

valores de %RR de dois psoralenos, bergapteno e 8-MOP, após redução da vazão. Neste, a %RR para o bergapteno foi de 21,3% a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ à vazão de 3,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto a 7,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ obteve-se 5,2%. O mesmo ocorreu com o 8-MOP, cuja %RR máxima foi de 40,9%, (1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$) reduzindo-se até 11% (7,5 $\mu\text{L}/\text{min}$), ambos em sonda de policarbonato de 20 kDa. Similarmente, Leveque et al. (2002) obteve recuperação média de $31,8 \pm 0,5\%$ para o 8-MOP, a 3,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, em sonda de policarbonato 10mm, 100 kDa. Ademais, conforme relatado por Mary et al. (1998), a natureza química da membrana – policarbonato ou polietilenosulfona – parece não afetar significativamente a recuperação dos psoralenos.

Em estudos farmacocinéticos, igualmente se emprega baixas taxas de vazão. Sun et al. (2013) avaliavam a farmacocinética (PK) *in vivo* do iodiconazol aplicada a derme, à vazão de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ obtendo %RR de cerca de $33,57 \pm 5,41\%$. Já no estudo do metotrexato em pele de coelho, Stagni e Shukla (2003) obteve-se %RR de $42,8 \pm 8,00\%$, a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$

5.3.2 Recuperação relativa (%RR), em função do tempo de equilíbrio

Buscando diminuir o tempo de equilíbrio da sonda, aplica-se um tempo de pré-equilíbrio conforme relatado previamente (ABRAHAMSSON; WINSÖ, 2005; SCHUCK; RINAS; DERENDORF, 2004). Inicialmente, avaliou-se um tempo de pré-equilíbrio a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 15 min, seguida por equilíbrio a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, durante 30 min. As coletas de amostras foram realizadas em intervalos de 15/15min durante 1,5 h (n=6). A precisão dos dados foi avaliada em ensaios realizados em dois dias diferentes.

A RR% média quando utilizada a condição de pré-equilíbrio foi de $44,10 \pm 7,13\%$ e $38,29 \pm 6,53\%$ para psoraleno e bergapteno, respectivamente. Alternativamente, avaliou-se a diferença entre os dados de %RR na ausência de tempo de pré-equilíbrio. A diferença obtida ($45,37 \pm 7,6\%$ vs $38,20\% \pm 6,56\%$) não foi significativa quando maior tempo de equilíbrio (210 min, a 2 $\mu\text{L}/\text{min}$) foi aplicado.

Assim, as condições experimentais de microdiálise definidas para validação foram assim definidas: bomba CMA 402 adaptada à seringa micro seringa tipo 1 (Exmire®) e sonda CMA 30 Linear (*Cut off*: 6.000 Da) perfundida por solução de Ringer em condição de pré-equilíbrio à 5 $\mu\text{L}/\text{min}/15$ min, seguida de condição de equilíbrio a 2 $\mu\text{L}/\text{min}/30$ min.

5.3.3 Calibração da sonda *in vitro*

Segundo a técnica da eficiência da extração (EE), a % RR média (Eq. 5) foram de $51,78\% \pm 2,03\%$; $46,96\% \pm 2,08\%$ e $47,50\% \pm 2,19\%$, respectivamente nas concentrações de

2,0; 5,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$ de psoraleno. Já para o bergapteno, obteve-se $42,48\% \pm 1,64\%$; $42,94\% \pm 2,62\%$ e $42,10\% \pm 1,73\%$, respectivamente, sob as mesmas concentrações. Segundo análise estatística (ANOVA), com nível de significância ajustado a 5%, os dados não evidenciam diferença significativa entre as diferentes concentrações dos analitos, exceto pela maior %RR do psoraleno em relação ao bergapteno.

Vale ressaltar que os valores de %RR encontrados foram superiores aqueles publicados na literatura. No trabalho de Mary et al. (1998), a % RR do bergapteno e de outro psoraleno, o 8-MOP, na vazão de 2,0 $\mu\text{L/min}$, foram $35,7\% \pm 2,0\%$ e $23,5\% \pm 1,5\%$, respectivamente. Leveque et al. (2002), durante a amostragem *in vitro* de 8-MOP sob vazão de 3,0 $\mu\text{L/min}$, obteve recuperação máxima de $31,8\% \pm 0,5\%$.

Essa maior recuperação pode ser influenciada por diversos fatores, como o tipo de sonda utilizado em cada estudo, como também os diferentes analitos presentes em cada amostra. Entretanto, Mary et al. (1998) defendem que a natureza química da membrana – policarbonato ou polietilenosulfona – parece não afetar esta recuperação. No entanto, destacam que dois fatores foram alterados simultaneamente no experimento (comprimento e natureza química da membrana).

Na **retrodiálise (RD)**, ou método da perda, a %RR média (Eq. 6) do psoraleno resultou em $64,09\% \pm 2,41\%$; $65,51\% \pm 1,46\%$ e $68,34\% \pm 1,84\%$ nas concentrações de 2,5; 5,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para o bergapteno, os resultados obtidos foram de $67,03\% \pm 1,65\%$; $69,93\% \pm 0,43\%$ e $70,19\% \pm 2,67\%$ para as mesmas concentrações. Também não foi observada diferença significativa para o conjunto dos resultados de cada um dos analitos, com nível de significância de 5%.

Os métodos de EE e RD, juntamente com o método de “No-net-flux”, são utilizados com maior frequência para determinar a recuperação da sonda (SCHUCK; RINAS; DERENDORF, 2004). A recuperação pelo método EE, também chamada de recuperação por ganho, representa o quanto da amostra total de fármaco da solução foi extraído pela sonda, mimetizando a situação *in vivo* (SCHUCK; RINAS; DERENDORF, 2004). Os valores de %RR encontrados para as condições apresentadas foram superiores aqueles encontrados por Mary et al. (1998) cuja recuperação de bergapteno foi de $23,6\% \pm 0,4\%$.

Estudos subsequentes em nosso grupo, empregando diferentes lotes da mesma sonda, em dias distintos também *não* gerou diferença significativa, tampouco quando analisadas por diferentes analistas ou mesmo, sob concentrações diferentes demonstrando assim, a robustez

do método de amostragem, considerado reprodutível e confiável para análises *in vitro*, e possivelmente aplicável a estudos *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

Elevada eficiência cromatográfica foi obtida na validação parcial do método HPLC-PDA. Reduziu-se a assimetria recorrente de picos das furanocumarinas, em especial do psoraleno e o bergapteno, empregando-se coluna C18 com capeamento, tampão fosfato a 0,1% e elevação de temperatura (50 °C).

A sensibilidade analítica do método para psoraleno (LQI = 0,14 µg/mL) e bergapteno (LQI = 0,38 µg/mL) foi obtida pela introdução de uma célula de fluxo com caminho óptico superior ao convencional (5,0 cm), possibilitando as análises de amostras microdialisadas na presença da fluoxetina.

Adicionalmente, o método HPLC-PDA validado tem potencial aplicação em estudos *in vivo* de interação medicamentosa na presença da fluoxetina, um antidepressivo frequentemente empregado na terapêutica do vitiligo, assim como em estudos *in vitro* de avaliação da extensão da ligação as proteínas plasmáticas do psoraleno e bergapteno, dentro outros.

Na calibração da sonda de microdiálise CMA 30 ficou demonstrada maior eficiência da extração a 2,0 µL/min/30 min obtida para o psoraleno (51,78% ± 2,03%) e bergapteno (42,48% ± 1,64%), relativamente aqueles previamente descritos na literatura. Segundo o método da retrodiálise, ou diálise por perda, os resultados de recuperação média do psoraleno (65,98%) e bergapteno (69,05%) são compatíveis com os resultados obtidos no método por ganho (EE).

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Aperfeiçoamento adicional do método poderá ser obtido pela utilização de colunas cromatográficas mais seletivas (*p.e.* fenil) ou mesmo uma RP-C18, com menor índice de acidez residual e, maior capeamento de grupos silanóis livres. Alternativamente, colunas recheadas com partículas de elevada tecnologia de fabricação com reduzido tempo de transferência de massa e/ou colunas monolíticas podem proporcionar um desempenho ainda melhor de assimetria de picos, embora com custo mais elevado.

Após tais aperfeiçoamentos, é possível realizar a validação completa do método visando uma sugestão de método farmacopeico. Para isso, além dos métodos apresentados neste trabalho, deve ser realizada validação interlaboratorial.

Quanto à microdiálise, estudos complementares de calibração da sonda pelo método *in vitro* no-net-flux e *in vivo* em ratos Wistar encontram-se em andamento.

Vislumbra-se assim, a aplicação destes dados analíticos na obtenção de informações farmacocinéticas de interações medicamentosas entre fluoxetina e psoralenos do *Brosimum gaudichaudii* Trécul, com vistas à publicação científica em periódicos especializados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSSON, P.; WINSÖ, O. An assessment of calibration and performance of the microdialysis system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p. 730-734, 2005.

AGILENT, 2013; The LC Handbook: Guide to LC columns and method development. p. 160. Disponível em < <http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>> em 09 de abril de 2014.

AHN, M.-J. et al. The simultaneous determination of coumarins in *Angelica gigas* root by high performance Liquid chromatography-diode array detector coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 258-266, 2007.

ANDERSON, T. F.; VOORHESS, J. J. Psoralen Photochemotherapy of Cutaneous Disorders. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 237-257, 1980.

ARAÚJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.

BENFELDT, E.; GROTH, L. Feasibility of measuring lipophilic or protein-bound drugs in the dermis by in vivo microdialysis after topical or systemic drug administration. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 78, n. 4, p. 274-278, 1998.

BILLEN, J. et al. Influence of pressure and temperature on the physic-chemical properties of mobile phase mixtures commonly used in high-performance Liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, p. 30-44, 2008.

BLESSY M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, p. 159-165, jun. 2014.

BOELSA, E. et al. Microdialysis technique as a method to study the percutaneous penetration of methyl nicotine through excised human skin, reconstructed epidermis, and human skin *in vivo*. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 2, p. 141-147, fev. 2000.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n. 4, p. 945-953, abr. 2010.

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas das alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, São Paulo, v.35, n. 5, p. 993-1003, jan. 2012.

BOROWSKA, K. et al. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene—*In vivo* study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 280-283, jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com

fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 22 maio 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

BUCKENMAIER, S. M. C.; MCCALLEY, D. V., EUERBY, M. R. Determination of pKa values of organic bases in aqueous acetonitrile solutions using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1004, n. 1-2, p. 71-79, jul. 2003.

CAON, T. **Padronização do modelo de difusão *ex vivo* da câmara de Franz para estudos de permeabilidade e permeação de fármacos e adjuvantes farmacêuticos, através das mucosas bucal e esofágica e da pele de suínos**. Santa Catarina: UFSC, 2009

CARDOSO, C. A. L.; HONDA, N. K.; BARISON, A. Simple and rapid determination of psoralens in topic solutions using Liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, p. 217-224, Jan. 2002.

CARDOSO, C. A. L.; PIRES, A. E.; HONDA, N. K. A Method for Quantitative Determination of Furanocoumarins in Capsules and Tablets of Phytochemical Preparations. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 442-447, abr. 2006.

CHAURASIA, C. S. et al. AAPS-FDA Workshop White Paper: Microdialysis Principles, Application and Regulatory Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 05, p. 1014-1025, 2007.

CHAURASIA, C. S. *In vivo* microdialysis sampling: theory and applications. **Biomedical Chromatography**, n. 13, p. 317-332, 1999.

CMA/Microdialysis AB; Harvard Apparatus. **Products for microdialysis research**: catálogo. Solna, Suécia, 2011-2012. 51 p.

DE BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológica**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

DJURDJEVIC P. et al. Optimization of separation and determination of moxifloxacin and its related substances by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 117-126, abr. 2009

DOLAN, J. W. Temperature selectivity in reversed-phase high performance Liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 195-205, 2002.

ERMER J.; LIMBERGER M.; WÄTZIG H. The transfer of analytical procedures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 85, p. 262-276, 2013.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on bioanalytical method validation, rev. 1, jul. 2011.

FENG, C. et al. Simultaneous determination of 10 active components in traditional Chinese medicine “YIGONG” capsule by RP-HPLC–DAD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 442-447, Jan. 2008.

FENG, C.; RUAN, J. L.; CAI, Y. L. Simultaneous determination and pharmacokinetics of four coumarins in rat plasma after oral administration of traditional chinese medicine “YIGONG” capsule by SPE-HPLC. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n.12, p. 2272-2277, 2010.

GUAN, X.-Y. et al. HPLC-DAD–MSⁿ analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in Xian-ling-gu-bao capsules. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 923-933, mar. 2011.

HAN, Q.-B. et al. Rapid analysis of pseudolaric acids in Cortex Pseudolaricis and related medicinal products by high performance Liquid chromatography. **Talanta**, v. 73, p. 757-763, maio 2007.

HEINISCH, S.; ROCCA, J. L. Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase Liquid chromatography: application to method development. **Journal of Chromatography A**, v. 1048, p. 183-193, set. 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of analytical procedures: methodology, Q2B, 2005.

ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd ed. maio 2005.

KREILGAARD, M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 54, supl. 1, p. S99-S121, 2002.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. *In*: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a Edição ed. Porto Alegre: UFSC, UFRGS, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. 1. ed. Campinas: Editora Átomo, 2009, 382 p.

LEAL, A. A. X.; HENRIQUES, C. A.; LUNA, A. S. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-VI. **Revista Analytica**, n. 32, p. 28-35, jan. 2008.

LEVEQUE, N. et al. Validation of a microdialysis–gas chromatographic–mass spectrometric method to assess 8-methoxypsoralen in psoriatic patient dermis. **Journal of Chromatography B**, v. 780, p. 119-127, jun. 2002.

LI, S. et al. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview.

Chinese Medicine, v. 3, n. 7, jun. 2008, 16 p.

LI, Y. et al. *In vivo* pharmacokinetics comparisons of icariin, emodin and psoralen from Gan-kang granules and extracts of *Herba Epimedii*, *Nepal dock root*, *Ficus hirta yahl*. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 124, p. 522-529, maio 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARY. S. et al. Assessment of the recovery of three lipophilic psoralens by microdialysis: an *in vitro* study. **International Journal Pharmaceutics**, v.161, p. 7-13, 1998.

MATHY, F. X. et al. Study of the percutaneous penetration of flurbiprofen by cutaneous and subcutaneous microdialysis after iontophoretic delivery in rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 144-152, jan. 2005.

MÖRSCHBÄCHER, F. L. E. et al. Co-validação de metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (clae) para determinação de teor de folinato de cálcio, em formulação farmacêutica. **Revista da Graduação**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2012.

NEUE, U. D. et al. Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings. **Journal of Chromatography A**, v. 849, p. 87-100, jul. 1999.

NOVIKOVA, I. Y.; TULAGANOV, A. A. Using HPLC for the quality control of psoralen and related preparations. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 38, n. 5, p. 279-281, maio 2004.

OUYANG, L-Q. et al. Simultaneous determination of psoralen and isopsoralen in plasma and Chinese medicine Xian Ling Gu Bao capsule by using HPLC-DAD coupled with alternating trilinear decomposition algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, p. 160-166, jul. 2009.

PÁPAI, Z.; PAP, T. L. Analysis of peak asymmetry in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.953, p. 31-38, abr. 2002.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PIRES, A. E.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; A method for fast determination of psoralens in oral solutions of phytomedicines using Liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, set. 2004.

POZZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 159-166, maio 2005.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjo de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83-88, 1997.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUELA, A. L. M.; ARAÚJO, M. B.; PEREIRA, G. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 165-168, 2009.

SAMMETA, S. M.; VAKA, S. R. K.; MURTHY, S. N. Transcutaneous sampling of ciprofloxacin and 8-methoxypsoralen by electroporation (ETS technique). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 24-29, 2009.

SASONGKO, L. et al. Assessment of in vitro and in vivo recovery of gallamine using microdialysis. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 519-525, 2000.

SCHMIDT, S. et al. Clinical microdialysis in skin and soft tissues: an update. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, p. 351-364, 2008.

SCHUCK, V. J.; RINAS, I.; DERENDORF, H. A. In vitro microdialysis sampling of docetaxel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, p. 807-813, 2004.

SENOL, F. S. et al. An *in vitro* and *in silico* approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 462-467, set. 2011.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance Liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1-2, p. 57-66, fev. 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994 p.299.

STAGNI, G.; SHUKLA, C. Pharmacokinetics of methotrexate in rabbit skin and plasma after iv-bolus and iontophoretic administrations. **Journal of Controlled Release**, v. 93, p. 283-292, ago. 2003.

STAHL, M. et al. Human microdialysis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 3, p. 165-178, 2002.

STOLK, L. M. L; SIDIQI, A. H. Biopharmaceutics, Pharmacokinetics and Pharmacology of Psoralens. **General Pharmacology**, v. 19, n. 5, p. 649-653, 1988.

SUN, N. et al. *In vivo* pharmacokinetics and *in vitro* antifungal activity of iodiconazole, a new triazole, determined by microdialysis sampling. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 229-235, 2013.

VINOD, P. S. et al. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

WATERS. **Colunas X-Terra®**. Disponível em: <
http://www.waters.com/waters/pt_BR/XTerra-Columns/nav.htm?locale=pt_BR&cid=513769
 >. Acesso em: 29 nov. 2013.

WEI, Y. et al. Simultaneous and sensitive determination of xanthotoxin, psoralen, isoimipinellin and bergapten in rat plasma by Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 575-582, 2010.

XIA, Y. et al. Determination of scopoletin in rat plasma by high performance Liquid chromatographic method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 857, p. 332-336, jul. 2007.

XU, K. et al. Discrimination of the seeds of *Notopterygium incisum* and *Notopterygium franchetii* by validated HPLC-DAD–ESI-MS method and principal component analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1089-1093, jul. 2011.

YAN-XU, C. et al. Simultaneous determination of scopoletin, psoralen, bergapten, xanthotoxin, columbianetin acetato, imperation, osthole and isoperatorin in rat plasma by LC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of *Radix Angelicae Pubescentis* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 77, p. 71-75, 2013.

YANG, W. et al. Simultaneous and sensitive determination of xanthotoxin, psoralen, isoisimpinellin and bergapten in rat plasma by Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 575-582, jan. 2010.

YHUI, L. et al. *In vivo* pharmacokinetics comparisons of icariin, emodin and psoralen from Gan-kang granules and extracts of *Herba Epimeddi*, *Nepal dock root*, *Ficus hirta yahl*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 522-529, 2009.

YUAN, G. et al. Simultaneous quantification of psoralen and isopsoralen in rat plasma by ultra-performance Liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of *Haigou Pill*. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3137-3143, 2009.

ZAPATA, A.; CHEFER, V. I.; SHIPPENBERG, T. S. Microdialysis in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, abr. 2009, 34 p