

Desenvolvimento e validação de um método por CCD/densitometria para quantificação de psoraleno e bergapteno em *Brosimum gaudichaudii* Trécul

Development and validation of an HPTLC densitometry method for psoralen and bergapten quantification in *Brosimum gaudichaudii* Trécul

DOI 10.32712/2446-4775.2020.929

Morais, Mariana Cristina^{1*}; Garcia, Nathália Olívia Sousa¹; Lessa, Bruno da Motta²; Nóbrega, Andréa Bezerra da²; Conceição, Edemilson Cardoso da¹.

¹Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Laboratório PD&I de Bioprodutos. Praça Universitária, Setor Leste Universitário, CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brasil.

²Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos. Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (CIBS), Laboratório de Química da Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF), Av. Comandante Guarany, 447, Jacarepaguá, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Correspondência: marianacmfarma@gmail.com.

Resumo

Diante da aplicabilidade dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* no tratamento do vitiligo, o objetivo do estudo foi desenvolver um método analítico por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) para a quantificação simultânea de psoraleno e bergapteno, presentes no extrato liofilizado de *B. gaudichaudii*, a fim de se tornar um método alternativo para o controle de qualidade dos extratos produzidos a partir desta espécie. O extrato liofilizado foi produzido a partir do extrato mole das raízes de *B. gaudichaudii* preparadas com solução hidroalcoólica a 55 % (v/v). A metodologia para análise dos compostos bergapteno e psoraleno, presentes no extrato liofilizado, foi desenvolvida e validada por cromatografia em camada delgada (CCD)/densitometria. A melhor resolução, separação e identificação dos marcadores, ocorreram em cromatoplasmas de sílica RP 18 F₂₅₄ (Merck) e fase móvel composta por acetonitrila: água (60:40). Os fatores de retenção (FR) para o psoraleno e o bergapteno foram 0,41 e 0,35, respectivamente. O método de análise desenvolvido se mostrou linear, preciso e exato. Desta forma, a densitometria por CCD ou CCDAE se mostrou uma técnica alternativa para a identificação e separação destas furanocumarinas, sendo importante para o desenvolvimento de novos produtos contendo extratos de *B. gaudichaudii* para o tratamento do vitiligo.

Palavras-chave: Mama-cadela. Vitiligo. Psoraleno. Bergapteno. CCDAE.

Abstract

Given the applicability of *Brosimum gaudichaudii* extracts in the treatment of vitiligo, the aim of the study was to develop a high performance thin layer chromatographic (HPTLC) analytical method for the simultaneous quantification of psoralen and bergapten, present in the lyophilized extract of *B. gaudichaudii*, in order to become an alternative method for quality control of extracts produced from this species. The lyophilized extract was produced from the soft extract of *B. gaudichaudii* roots, prepared with 55 % (v/v) hydroalcoholic solution. The methodology for the analysis of bergapten and psoralen compounds present in the lyophilized extract was developed and validated by thin layer chromatography (TLC)/densitometry. The best resolution, separation and identification of the markers occurred in RP 18 F254 (Merck) silica chromatoplate and on the mobile phase composed of acetonitrile: water (60:40). The retention factors (RF) for psoralen and bergapten were 0.41 and 0.35, respectively. The developed method of analysis was linear, precise and accurate. Thus, TLC/densitometry or HPTLC proved to be an alternative technique for the identification and separation of these furanocoumarins, being important for the development of new products containing *B. gaudichaudii* extracts for the treatment of vitiligo.

Keywords: *Brosimum gaudichaudii*. Vitiligo. Psoralen. Bergapten. HPTLC.

Introdução

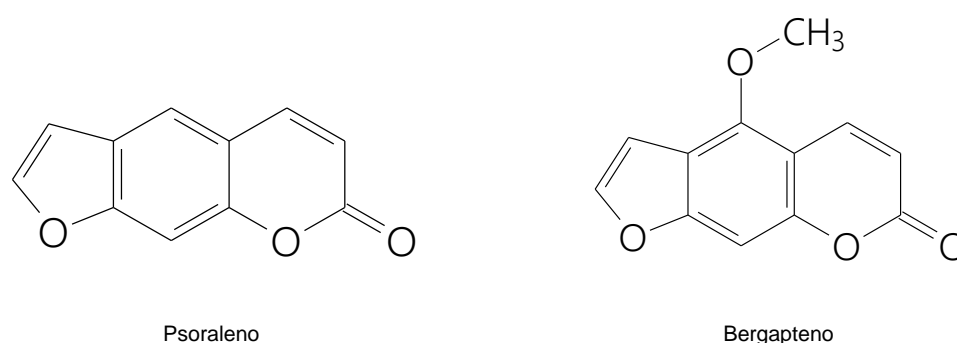
A pele é composta por diferentes camadas e estruturas os quais auxiliam na homeostase do organismo [1]. Desordens relacionadas à pele são problemas comuns que podem afetar qualquer gênero ou idade. As desordens relacionadas aos melanócitos promovem um aumento ou uma redução da produção de melanina, gerando respostas fisiológicas como, por exemplo, a hiperpigmentação ou o vitiligo, respectivamente [2]. O vitiligo é uma desordem despigmentante que envolve mais do que danos físicos, está estreitamente relacionado a certos estigmas sociais [3]. Os atuais tratamentos padrões disponíveis para o vitiligo incluem terapia imunossupressora, fototerapia, cirurgia e antidepressivos, devido às possíveis questões psicológicas como fatores de risco [3,4]. Porém os tratamentos disponíveis não são totalmente eficazes. Apesar deste cenário atual, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver novas alternativas, como o uso do *Brosimum gaudichaudii* Trécul. e seus metabólitos secundários para efetivamente tratar o vitiligo [5-8].

A espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul é popularmente conhecida como “mama cadela”, “arbóreo de cadela” ou “algodãozinho do campo”. Tradicionalmente, suas raízes são utilizadas como recurso terapêutico para o tratamento do vitiligo, que é uma forma específica de leucodermia despigmentante. A palavra vitiligo é de origem latina e vem de “vitium”, que significa defeito, e de “vitelium”, que significa manchas brancas [5,6]. A etiologia do vitiligo é desconhecida, entretanto, várias teorias têm sido propostas para explicar o processo de despigmentação ocorrido nesta desordem [7,8]. Acredita-se que a origem possa ser autoimune, desencadeada após desequilíbrios neuro-humorais ou estresse oxidativo. Há relatos de ocorrência da doença em pessoas da mesma família, o que sugere que um fator genético possa estar envolvido, mas nenhuma delas foi ainda elucidada. O diagnóstico do vitiligo depende do histórico, mas inicialmente é feito um exame clínico e observacional das lesões e das partes despigmentadas [9].

A ação da mama-cadela no tratamento do vitiligo deve-se, principalmente, à presença dos metabólitos secundários denominados furanocumarinas lineares, e estes pertencem a um subgrupo conhecido como

cumarinas. As furanocumarinas são encontradas principalmente em espécies das famílias Apiaceae, Fabaceae, Moraceae, Rutaceae e Thymelaeaceae, no entanto, também podem ser obtidas por meio de síntese em laboratório. Sua estrutura é basicamente constituída pela condensação do anel furânico no núcleo cumarínico, sendo que a posição onde ocorre a condensação determina se a furanocumarina é angular ou linear. Dentre as lineares destacam-se o psoraleno e o bergapteno (**FIGURA 1**) [10]. Estudos relacionados à fotoestabilidade e fotodegradação do psoraleno e do bergapteno presentes em *B. gaudichaudii* demonstram seu potencial em formulações tópicas e orais para o tratamento do vitiligo [11]. No entanto, o desenvolvimento de um novo método de identificação e quantificação das furanocumarinas com alta precisão, menor tempo de análise e custos reduzidos se faz necessário, a fim de permitir que os extratos de *B. gaudichaudii* sejam estabelecidos como um potencial ingrediente ativo para aplicações farmacêuticas.

FIGURA 1: Representação das estruturas químicas de psoraleno e bergapteno



A técnica analítica denominada cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) é um dos instrumentos mais comumente utilizados para a análise de compostos moleculares complexos de baixa massa molecular. Essa técnica é flexível, simples, acessível e mais barata quando comparada à cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase gasosa (CG). Como as outras cromatografias, a CCDAE consiste em uma fase estacionária e uma fase móvel. A técnica tem como princípio a eluição dos compostos de interesse ao longo da fase estacionária. O fator de retenção de cada composto é determinado pelo grau de afinidade do mesmo pela fase estacionária, ou pela fase móvel. Desta forma, os compostos analisados percorrerão uma distância inversamente proporcional à sua afinidade pela fase estacionária [12-14].

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método analítico por CCDAE para a quantificação simultânea de psoraleno e bergapteno em extrato liofilizado de *B. gaudichaudii* a fim de se tornar um método alternativo para o controle de qualidade dos extratos produzidos a partir desta espécie.

Materiais e Métodos

Obtenção do extrato liofilizado de *B. gaudichaudii*

Obteve-se o extrato fluido de *B. gaudichaudii* através do método extrativo de percolação, utilizando-se uma solução hidroalcoólica a 55% (v/v) [15]. O produto obtido a partir da percolação foi concentrado inicialmente em rotaevaporador Buchii®, a 40°C e 75 rpm, até um teor de sólidos de aproximadamente 10%. Após a concentração prévia, o extrato foi transferido para um concentrador com ventilação forçada, temperatura

ambiente aproximadamente 23°C e protegido da luz, para evaporar o solvente, onde se obteve o extrato mole com teor de sólidos de aproximadamente 70% [\[11\]](#).

O extrato mole foi então congelado em freezer à -80°C e logo depois liofilizado em liofilizador Christ® modelo de bancada, por 48 horas, temperatura das prateleiras a 20,0°C e pressão a 0,0100 mbar.

Preparo da amostra e padrões para análise

A amostra de extrato liofilizado de *B. Gaudichaudii* foi preparada na concentração de 10 mg/mL utilizando-se como solvente o metanol grau HPLC por 30 minutos em ultrassom Branson 5510, (tamanho tanque: 29,2 x 24,1 x 15,2 cm), frequência de 40kHz na temperatura de 37°C. Os padrões de psoraleno e bergapteno (Sigma Aldrich®) foram preparados separadamente em uma concentração de 1 mg/mL utilizando-se como solvente o metanol grau HPLC, por 10 minutos em ultrassom.

Posteriormente, tanto a solução da amostra como as soluções dos padrões foram filtradas em filtro PVDF de 0,45 µm Millex®, 13 mm de diâmetro, antes de serem injetadas.

Sistema cromatográfico

As análises de CCD/densitometria foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Química da Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF), do Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (CIBS), Farmanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro.

O desenvolvimento da metodologia para análise do bergapteno e do psoraleno por CCD/densitometria foi realizada utilizando os seguintes equipamentos CAMAG®: aplicador automático (ATS4), densitômetro (*Scanner TLC III*), visualizador (*TLC Visualiser*) acoplado a uma câmera DXA 525; e placa de aquecimento (*TLC Heater plate*).

Para o desenvolvimento analítico, realizou-se uma triagem na literatura a fim de estabelecer a melhor fase móvel e a melhor fase estacionária, que permitisse a separação do psoraleno e do bergapteno. Utilizou-se como fase estacionária no desenvolvimento cromatoplacas de Sílica Gel60 F₂₅₄ e de Sílica RP 18 F₂₅₄ (fase reversa), ambas da Merck® e como fase móvel utilizou-se diversos solventes com polaridades diferentes.

Obteve-se melhor resolução, separação e identificação dos marcadores utilizando-se a cromatoplaça de Sílica RP 18 F₂₅₄ (Merck), tamanho 10 cm x 10 cm e como fase móvel acetonitrila: água 60: 40. Cada aplicação foi executada em uma banda de 5 mm.

Validação do método por CCD/densitometria

A avaliação das figuras de mérito do método proposto foi baseada na Instrução Normativa n.4 de 2014 [\[16\]](#) e RE n° 899/03 da ANVISA [\[17\]](#).

Seletividade

A especificidade do método foi avaliada através da análise e comparação dos valores de R_f e espectro da banda de psoraleno e bergapteno de uma amostra real (extrato liofilizado) com os respectivos padrões. A

pureza dos picos das bandas dos analitos também foi avaliada através de comparação entre a amostra e os padrões em diferentes posições das bandas, isto é, início, ápice e fim do pico densitográfico.

Linearidade

Foram preparadas três soluções estoque dos padrões de psoraleno e bergapteno na concentração de 0,150 mg/mL e 0,205 mg/mL, respectivamente. Estas soluções estoques dos padrões separados foram então misturadas na proporção 1:1 obtendo-se assim um mix de padrões.

Após a obtenção do mix de padrões, este foi então diluído nas concentrações: 15 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL e 150 µg/mL de psoraleno e 20,5 µg/mL, 41 µg/mL, 82 µg/mL, 123 µg/mL, 164 µg/mL e 205 µg/mL de bergapteno, a fim de se construir a curva de linearidade.

Precisão

Para a precisão do método, seis amostras nas mesmas concentrações foram aplicadas em cromatoplaça de Sílica RP 18 F₂₅₄ e analisadas pelo método proposto para determinar a variação expressa em coeficiente de variação (% CV).

Para o mix de padrões, utilizamos o ponto central sendo a concentração do psoraleno de 90 µg/mL e a concentração do bergapteno de 123 µg/mL. Já para a amostra de extrato liofilizado, utilizamos a concentração de 4 mg/mL, visto que o psoraleno e o bergapteno estariam em concentrações (64 µg/mL e 90 µg/mL, respectivamente) próximas ao ponto central das curvas de calibração. A quantificação dos analitos no extrato liofilizado foi realizada por metodologia de HPLC anteriormente validada [\[18\]](#).

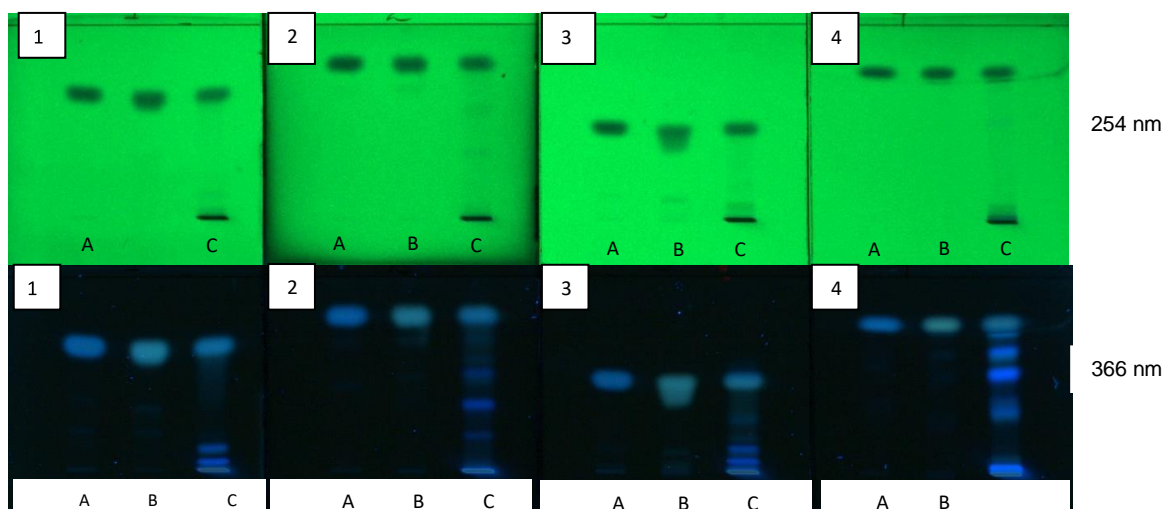
Exatidão

A exatidão foi calculada pelo método de adição de padrão [\[19\]](#), em que uma quantidade conhecida dos padrões de psoraleno e bergapteno foi adicionada a uma quantidade conhecida de amostra (*B. gaudichaudii* + Padrão de psoraleno + Padrão de bergapteno), em triplicata. Tanto o padrão quanto a droga vegetal foram analisadas individualmente e, após a adição, a solução resultante foi também analisada. Foram realizadas nove determinações, em três diferentes concentrações (baixa, média e alta, em triplicata), contemplando o intervalo do método.

Resultados e Discussões

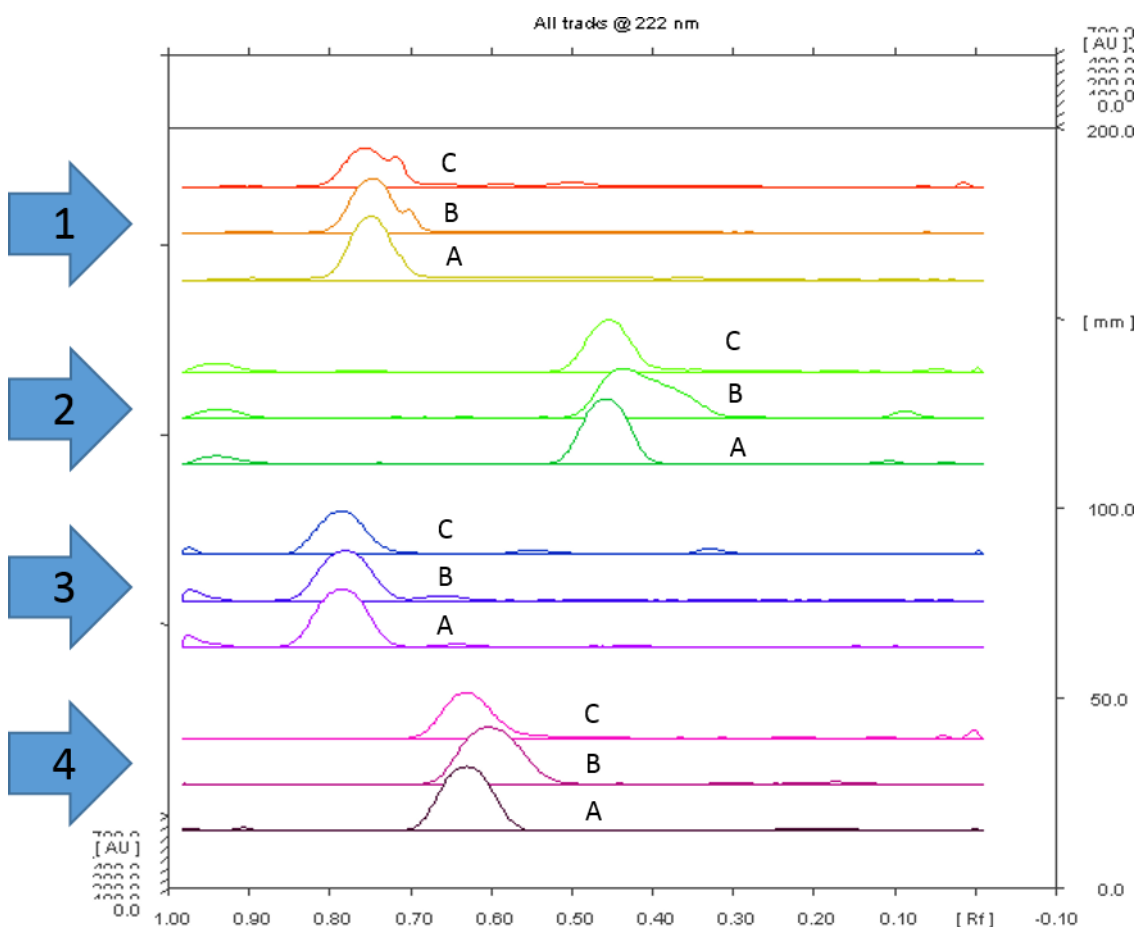
A seleção, tanto da fase móvel como da fase estacionária é um ponto crítico na técnica de CCD e CCDAE. Na triagem inicial com fase estacionária de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®), (5 cm x 5 cm), não foi possível obter boa resolução e separação uma vez que esses dois compostos (psoraleno e bergapteno) possuem estruturas químicas semelhantes, e seus fatores de retenção (RF) são muito próximos (**FIGURA 2 e FIGURA 3**).

FIGURA 2: Fotodocumentação do desenvolvimento do método analítico para quantificação de psoraleno e bergapteno em extrato liofilizado de *B. gaudichaudii* por CCD/densitometria.



Legenda: A – psoraleno; B – Bergapteno; C- Extrato liofilizado; Fase móvel: (1) Tolueno: metanol 9:1 [20]; (2) Acetato de etila: clorofórmio (60:40) [21]; (3) Hexano :butil acetato 65:35 [22]; (4) Tolueno: éter etílico 1:1 saturado com 10% de ácido acético [23].

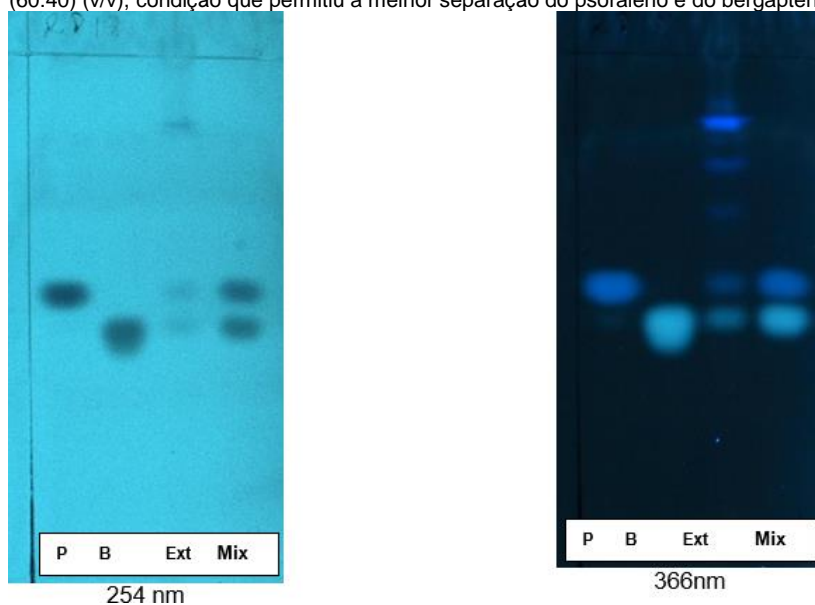
FIGURA 3. Densitogramas obtidos com diferentes fases móveis no desenvolvimento da metodologia e que não foram adequadas para separação do psoraleno e do bergapteno.



Legenda: A – psoraleno; B – Bergapteno; C- Extrato liofilizado de *B. gaudichaudii*; Fase móvel: (1) Tolueno:metanol 9:1 [20]; (2) Acetato de etila: clorofórmio (60:40) [21]; (3) Hexano:butil acetato 65:35 [22]; (4) Tolueno:éter etílico 1:1 saturado com 10% de ácido acético [23].

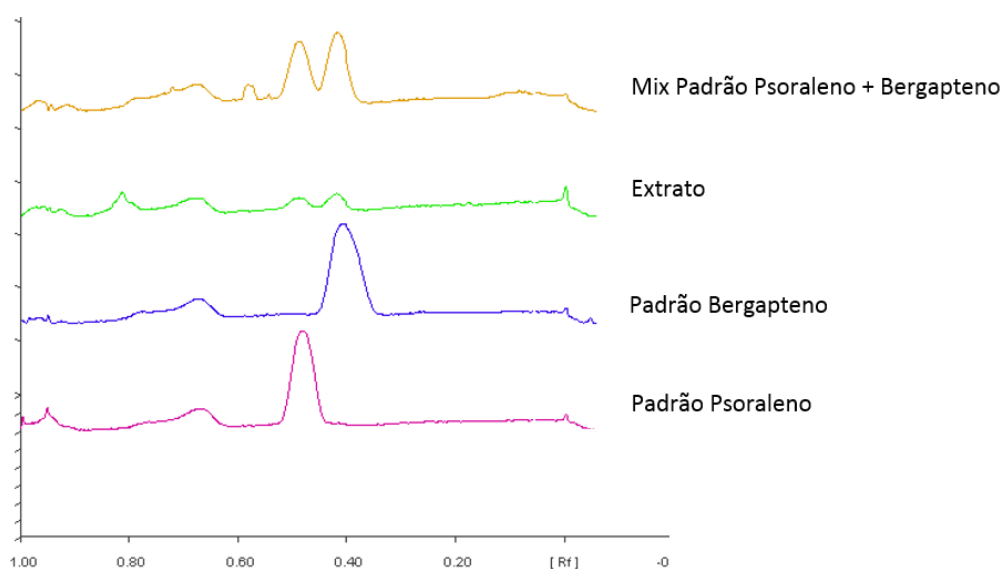
Variou-se então a fase estacionária para uma cromatoplaça de sílica de fase reversa (RP 18), ou seja, com característica apolar. Com esta fase estacionária foi possível obter boa resolução e separação entre o psoraleno e bergapteno, utilizando como fase móvel acetonitrila: água (60:40), esta fase móvel é semelhante a fase móvel utilizada nas análises por CLAE, as quais foram utilizadas como ponto de partida [15]. Os fatores de retenção (RF) para o psoraleno e para o bergapteno foram 0,41 e 0,35 respectivamente (FIGURA 4 e FIGURA 5).

FIGURA 4: Fotos das cromatoplaças de sílica em fase reversa RP18 (10 cm x 10 cm), fase móvel acetonitrila: água (60:40) (v/v), condição que permitiu a melhor separação do psoraleno e do bergapteno no extrato de *B. gaudichaudii*.



Legenda: P- Psoraleno; B- Bergapteno; Ext- Extrato liofilizado de *B. gaudichaudii*; Mix- Padrão de psoraleno + bergapteno (1:1).

FIGURA 5: Densitogramas dos padrões e do extrato liofilizado de *B. gaudichaudii*, confirmando a presença dos marcadores e com boa resolução.



Seletividade

Não foram observados bandas de interferentes por outros constituintes da planta nos valores de Rf dos padrões de psoraleno e bergapteno (**FIGURA 5**). Os espectros dos padrões dos analitos e daqueles no mesmo RF da amostra combinaram exatamente, indicando a inexistência de interferência por outros constituintes da planta.

Linearidade

A Linearidade do método foi observada nos intervalos de concentração para o psoraleno entre 15 µg/mL a 150 µg/mL (75 ng/spot a 750 ng/spot), já para o bergapteno o intervalo foi de 20,5 µg/mL a 205 µg/mL (102,5 ng/spot a 1025 ng/spot). Por meio da análise de regressão linear foi possível obter a equação da reta para o psoraleno que foi $y = -0,2385x^2 + 95,239x - 47,423$ e obteve um coeficiente de correlação linear $R = 0,9979$. Já para o bergapteno foi possível obter também a equação da reta que foi $y = -0,123x^2 + 82,777x - 208,76$ e o seu coeficiente de correlação linear $R = 0,9944$. Testes estatísticos comprovaram a homocedasticidade (Levene), normalidade (Ryan-Joiner) e ajuste (ANOVA) das curvas de calibração do psoraleno e bergapteno.

Precisão

Para determinação da precisão de psoraleno e bergapteno pelo método proposto, as mesmas amostras homogêneas do extrato (amostras reais) foram preparadas repetidamente e analisadas. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes por analistas diferentes. Os valores de RSD obtidos nos estudos de precisão (**TABELAS 1 e 2**) foram todos abaixo de 15%, indicando que o método atende ao critério de aceitação estabelecido pela Instrução Normativa nº 4 de 2014, que preconiza que o desvio padrão relativo entre as determinações seja inferior a 15% para matrizes complexas, como é o caso de extratos vegetais padronizados [16].

TABELA 1: Precisão intradia para psoraleno e bergapteno em um total de seis amostras (n=6).

Psoraleno (Área)	Bergapteno (Área)	RSD % Psoraleno	RSD % Bergapteno
4733,308	5905,167	9,40	12,30
4753,765	5865,978		
4697,970	5818,177		
4687,323	5823,105		
4702,183	5808,287		
4699,943	5809,035		

TABELA 2: Precisão Intermediária.

Psoraleno (Área)	Bergapteno (Área)	RSD % Psoraleno	RSD % Bergapteno
4900,64	5710,865	7,61	9,61
4889,02	5717,997		
4923,63	5733,268		
4874,51	5702,48		

4938,75	5790,833		
4922,07	5755,238		

Exatidão

A exatidão do método proposto foi estudada por adição padrão à solução da amostra em três níveis 80, 100 e 120%. A recuperação média para psoraleno foi de 95,95% e a recuperação média para o bergapteno foi de 91,45%. Abaixo (FIGURAS 6 e 7), estão apresentadas as análises de exatidão realizadas em três níveis diferentes.

FIGURA 6: Cromatoplaça indicando os três níveis do teste de exatidão feitos em triplicata.

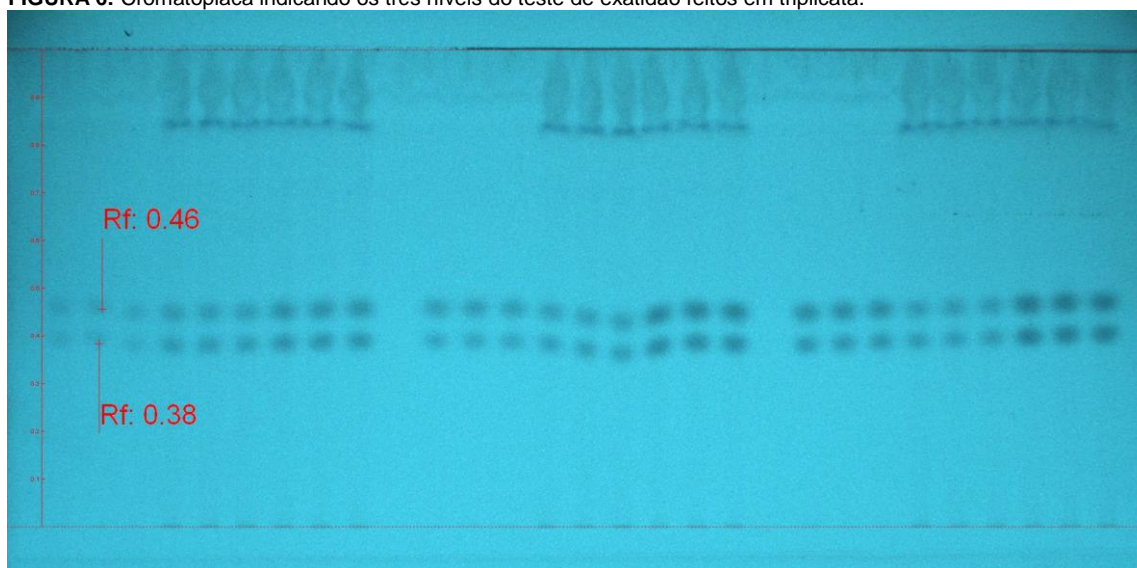
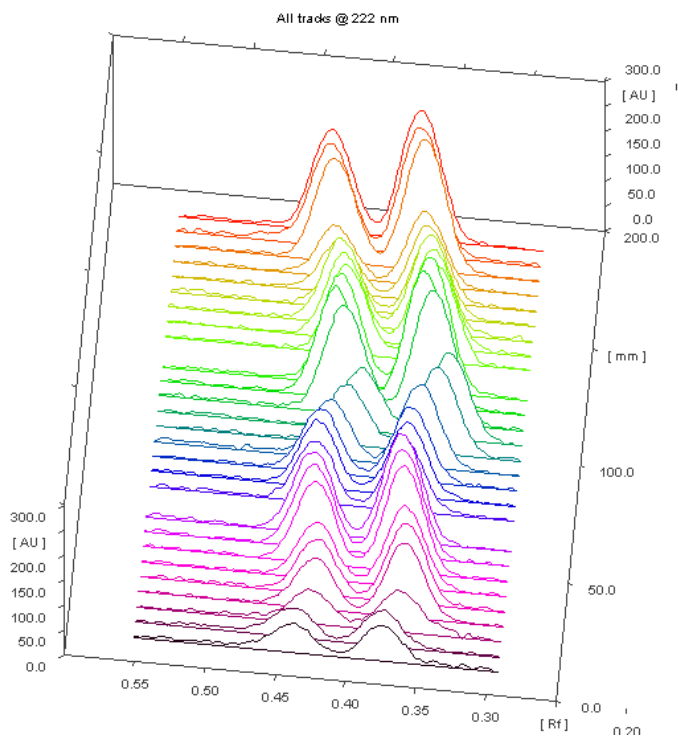


FIGURA 7: Densitogramas referentes ao teste de exatidão feito em três níveis.



Conclusão

A densitometria por CCD ou CCDAE é uma técnica rápida, reproduzível, precisa e de baixo custo, sendo uma alternativa ao CLAE para a identificação e quantificação do psoraleno e do bergapteno. Além disso, os extratos liofilizados de *B. gaudichaudii* possuem altas concentrações destes constituintes e podem ser utilizadas para preparações de formulações para o tratamento do vitiligo. A vantagem da CCD/densitometria é a utilização de pequenas quantidades de amostras e solventes, minimizando o custo que é um fator determinante para o controle de qualidade de laboratórios e indústrias que trabalham com insumos e produtos de origem vegetal.

Agradecimentos

Os autores trazem os seus sinceros agradecimentos à instituição FIOCRUZ, e ao pesquisador Carlos Henrique Brasil Bizarri pelas análises dos experimentos, realizadas no Laboratório de Química da Biodiversidade - Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos do Centro de Inovação em Biodiversidade e Saúde (PAF/CIBS) - Farmanguinhos. À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) por bolsa de formação concedida.

Referências

1. Del Río C, Millán E, García V, Appendino G, Demesa J, Muñoz E. The endocannabinoid system of the skin. A potential approach for the treatment of skin disorders. **Biochem Pharmacol**. 2018; 157: 122-133. ISSN 0006-2952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
2. Ma J, Li S, Zhu L, Guo S, Yi X, Cui T et al. Baicalein protects human vitiligo melanocytes from oxidative stress through activation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) signalling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**. 2018; 129: 492-503. ISSN 0891-5849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
3. Chatterjee M, Neema S. Dermoscopy of pigmentary disorders in brown skin. **Dermatol clinics**. 2018; 36(4): 473-485. ISSN 0733-8635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
4. Vallerand IA, Lewinson RT, Parsons LM, Hardin J, Haber RM, Lowerison MW et al. Vitiligo and major depressive disorder: A bidirectional population-based cohort study. **J Am Acad Dermatol**. 2019; 80(5): 1371-1379. ISSN 0190-9622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
5. Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae): da planta ao medicamento. **Rev Ciên Farm Bás Apl**. 2005; 26 (3): 159. ISSN 2179-443X. [[Link](#)].
6. Khovacs SR. Vitiligo. **J Am Acad Dermatol**. 1998; 38(5pt 1): 647-668. ISSN 0190-9622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
7. Steiner D, Villas RT, Bedin V, Steiner T, Moraes MB. Review Article: Vitiligo. **Anais Bras Dermatol**. 2004; 79 (03): 335-351. ISSN 1806-4841.
8. Ali J, Pramod K, Tahir MA. Current remedies for vitiligo. **Autoimm Rev**. 2010; 9: 516-520. ISSN 1568-9972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].

9. Fatani MI, Alshrif SH, Alfif KA, Khan AS, Hussain WA, Banjar AA. The clinical patterns of vitiligo “hospital-based study” in Makah region, Saudi Arabia. **J Dermatol Dermatol Surgery**. 2014; 18(1-2): 17-21. ISSN 2210-836X. [[CrossRef](#)].
10. Ribeiro CVC, Kaplan MAC. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Quím Nova**. 2002; 25(4): 533-538. ISSN 0100-4042.11. [[CrossRef](#)].
11. Moraes MCM, Almeida PHG, Ferreira NLO, Arruda RL, Borges LL, Freitas O, Conceição EC. Validation of a photostability indicating method for quantification of furanocoumarins from *Brosimum gaudichaudii* soft extract. **Rev Bras Farmacogn**. 2018; 28(1): 118-123. ISSN 0102-695X. [[CrossRef](#)].
12. Priyamvada S, Srinivas B, Pratima M. Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers. **Indian J Med Res**. 2010; 132: 201-208. ISSN 0971-5916. [[PubMed](#)].
13. Domínguez A, Jarne C et al. A Hyphenated Technique based on High-Performance Thin Layer Chromatography for Determining Neutral Sphingolipids: A Proof of Concept. **Chromat**. 2015, 2: 167-187. ISSN 2227-9075. [[CrossRef](#)].
14. Kerr E, West CY, Kradtap S. Quantitative TLC-Image Analysis of Urinary Creatinine Using Iodine Staining and RGB Values. **J Chromat Sci**. 2016; 54 (4): 639–646. ISSN 1945-239X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
15. Martins FS, Pascoa H, Paula JR, Conceição EC. Technical aspects on production of fluid extract from *Brosimum gaudichaudii* Trécul roots. **Pharmacogn Mag**. 2015; 11 (41): 226-231. ISSN 0973-1296. ISSN 0976-4062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Brasil. **Instrução Normativa nº 4**, de 18 de junho de 2014. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília: 2014. [[Link](#)].
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Brasil. **Resolução RE 899**, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D. O. U, Poder executivo, Brasília, DF, 02 de julho de 2003. [[Link](#)].
18. Moraes MC, **Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas contendo o extrato liofilizado de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) padronizado em psoraleno e bergapteno**. 112p. 2019. Tese Doutorado [em Ciências Farmacêuticas] Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás. 2019. [[Link](#)].
19. Agência Nacional da vigilância Sanitária. ANVISA. Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 166**, de 24 de julho de 2017. Brasil, 2017. [[Link](#)].
20. Alam PSNA, Al-rehaily AJ, Alajmi MF, Basudan OA, Khan TH. Stability indicating densitometric high-performance thin-layer chromatographic method for the quantitative analysis of biomarker naringin in the leaves and stems of *Rumex vesicarius* L. **J Planar Chromatogr**. 2014; 27 (3): 204–209. [[CrossRef](#)].
21. Galand N, Pothier J, Viel C. Plant Drug Analysis by Planar Chromatography. **J Chromatogr Sci**. 2002, 40: 1-14. ISSN 1945-239X. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)].
22. Dugo PM, Mondello L, Cogliandro E, Cavazza A, Dugoet G. On the genuineness of citrus essential oils. Part LIII. Determination of the composition of the oxygen heterocyclic fraction of lemon essential oils (*Citrus Limon* (L.) Burm. F.) by normal-phase high performance liquid chromatography. **Flav Fragr J**. 2000; 13 (5): 329-334. [[CrossRef](#)].
23. Bolina RC, Garcia EE, Duarte MGR. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev Bras Farmacogn**. 2009; 19 (1B). ISSN 1981-528X. [[CrossRef](#)].

Histórico do artigo | Submissão: 14/12/2019 | **Aceite:** 14/04/2020 | **Publicação:** 20/08/2020

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Como citar este artigo: Moraes MC, Garcia NOS, Lessa BM, Nóbrega AB et al. Desenvolvimento e validação de um método por CCD/densitometria para quantificação de psoraleno e bergapteno em *Brosimum gaudichaudii* Trécul. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2020; 14(2): 165-176. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/929>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

