

Desenvolvimento de Metodologia Analítica por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência para Quantificação de Curcuminoides

Development of Analytical Methodology by High-Performance Liquid Chromatography to Curcuminoids Quantification

Ramon Gredilha Paschoal,^a Alessandra Lifschitz Viçosa,^b Ana Mácia Suarez-Fontes,^c Marcos Andre Vannier-Santos,^c Davyson de Lima Moreira^{a,d,*} 

^a Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Toxicologia Ambiental, CEP 21040-360, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^b Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Laboratório de Farmacotécnica Experimental, CEP 21040-360, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^c Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, CEP 21040-360, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

^d Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Laboratório de Produtos Naturais, CEP 21040-360, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

*E-mail: davysonmoreira@hotmail.com

Recebido: 22 de Março de 2021

Aceito: 22 de Março de 2021

Publicado online: 6 de Outubro de 2021

Turmeric (*Curcuma longa* L.) is a species that has attracted great interest for containing bioactive curcuminoids that have some pharmacological and physiological activities. Among them, antimalarial, anti-inflammatory, antidepressant and anticancer effects that are mainly attributed to curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin stand out. This work aimed the development of an analytical methodology to optimization of the best conditions for sample preparation, chromatographic separation, detection, identification and quantification of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The samples were weighed and solubilized to obtain a 200 µg/mL solution, analyzed in triplicate, using the following chromatographic parameters: flow rate at 1.2 mL/min; temperature at 50 °C; detection at 420 nm; total analysis time of 25 min and injection volume of 20 µL. The developed method showed good selectivity, resolution, signal symmetry and capacity factor for curcuminoids analysis. It is worth noting that the new method developed showed a scientific gain for being more efficient and with the change of column, there was a gain in selectivity and resolution for the separation of curcuminoids. In addition, the silica column modified with phenyl groups has a phase of medium polarity and has greater selectivity in the separation of aromatic compounds.

Keywords: Curcumin; demethoxycurcumin; bisdemethoxycurcumin; analytical method; HPLC.

1. Introdução

A cúrcuma é um tempero originário da Índia, que tem atraído grande interesse nas últimas décadas por conter curcuminoides bioativos que apresentam algumas atividades farmacológicas e fisiológicas.¹ Popularmente conhecida como açafrão da Índia, a *Curcuma longa* L. pertence à família Zingiberaceae, é nativa do Sudeste Asiático e está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta.^{2,3}

C. longa se destaca por apresentar efeitos antimalárico, antiinflamatório, antidepressivo, antitumoral, no sistema respiratório, no sistema reprodutor, no sistema digestório e no sistema nervoso central. Estudos mais recentes sugerem que consumir regularmente açafrão na dieta pode ser útil na prevenção da contaminação pelo coronavírus.^{4,5,6}

O açafrão apresenta em sua composição química carboidratos, proteínas, lipídios, óleo essencial encontrado nas suas partes subterrânea e aérea, além de outros metabólitos como os curcuminoides. Essas substâncias são classificadas como as principais responsáveis pelas atividades da planta e por sua cor alaranjada. Dentre os curcuminoides mais importantes, a curcumina está presente em 60-70%, sendo encontrada principalmente nas raízes e rizomas. Além da curcumina, dois outros curcuminoides ocorrem em quantidades menores, demetoxicurcumina (20-27%) e bisdemetoxicurcumina (10-15%) (Figura 1).^{5,7}

Na monografia do Ministério da Saúde sobre espécie *Curcuma longa* L. são descritos alguns métodos utilizados para fracionamento, purificação e identificação de curcuminoides.⁸ Dentre esses a técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca por apresentar o maior número de estudos comparativos avaliando a presença e quantificação de curcuminoides.^{8,9,10} Apesar dos métodos descritos, a busca por resultados mais exatos na quantificação, maior resolução e seletividade de curcuminoides é constante, além de preparo da amostra.^{11,12}

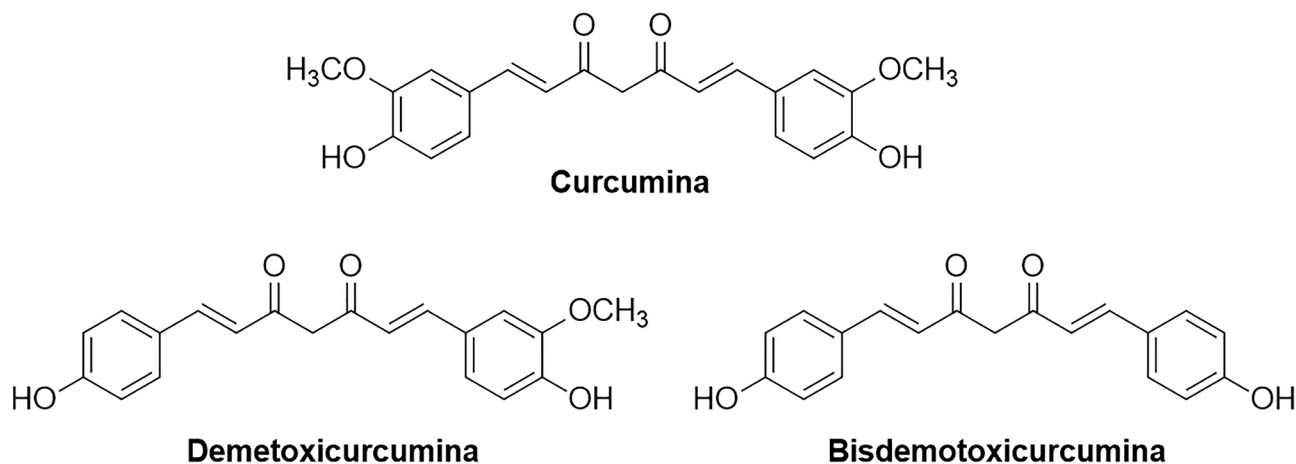


Figura 1. Curcuminoides mais abundantes presentes em *Curcuma longa* L

O desenvolvimento e validação de metodologias analíticas devem ser realizadas, por exemplo, de acordo com os parâmetros preconizados pela Resolução nº 166/2017 do Ministério da Saúde.¹¹ (ANVISA). Assim, as análises de um novo método têm a finalidade de garantir as exigências das aplicações analíticas, garantindo uma confiabilidade dos resultados obtidos e atendendo aos requisitos pretendidos.^{13,14}

Diante dessas considerações e visando a identificação e quantificação de curcuminoides em amostras de cúrcuma, o desenvolvimento de uma metodologia de análise foi realizado a fim de obter a otimização das melhores condições que envolvem o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção, identificação e quantificação.

2. Metodologia

2.1. Reagentes e materiais

Os reagentes utilizados na fase móvel foram a acetonitrila grau espectroscópico HPLC/SPECTRO (Tedia®, Brasil) e água ultrapura do tipo 1 (Millipore®/Merck®, Brasil). A solução tampão foi preparada com ácido fosfórico P.A. (Vetec®, Brasil) e fosfato de sódio monobásico anidro (Proquimios®, Brasil) e as amostras foram diluídas com metanol grau HPLC (Tedia®, Brasil). Para filtração das amostras foram utilizadas membranas para filtração em PTFE 0,45 µm (Millipore®/Merck®, Brasil) e seringas de tuberculina 1 mL. As análises foram realizadas em colunas cromatográficas Ascentis Phenyl (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm tamanho de partícula) (Supelco®/Ascentis®, Brasil) e NST C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm tamanho de partícula) (NST®, Inglaterra). Os padrões empregados nas análises foram curcumina (99,5% CLAE, Sigma-Aldrich, Brasil), bisdemetoxicurcumina (padrão analítico 95% CLAE, Sigma-Aldrich, Brasil) e demetoxicurcumina (padrão analítico 95% CLAE, Sigma-Aldrich, Brasil).

2.2. Solução padrão das amostras recebidas de “Curcumina”

Soluções estoques das amostras, em concentração final de 200 µg/mL, foram preparadas, sendo as amostras “Curcumina 95%” (Fabricante A), “Curcumina” (Fabricante B), “Curcuminoides” (Fabricante B), “Bisdemetoxicurcumina” (Fabricante B) e “Curcumina” (Fabricante C). As soluções de trabalho utilizadas foram obtidas no dia das análises a partir de diluições seriadas das soluções estoques do padrão, onde foram disponibilizadas em frasco de vidro âmbar, contendo 5,0 g destas.

2.3. Desenvolvimento do método de quantificação

2.3.1 Equipamento

O desenvolvimento do método foi feito por cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta-visível em rede de diodos (CLAE-DAD-UV) no equipamento Shimadzu Nexera XR®, equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A, detector DAD-UV-VIS SPD-20MA, controlador CBM-20A e utilizando-se como fase móvel água ultrapura acidificada/ acetonitrila ou tampão fosfato de potássio/ acetonitrila. Combinações de colunas de sílica modificada C18 (A) ou sílica modificada fenila (B) foram usadas, com variação de fluxo de fase móvel (a), composição de fase móvel (b), modo de eluição isocrático (c) ou gradiente (d), variação de temperatura do forno (e) e pH da solução tampão (f).

2.3.2 Desenvolvimento do método de preparo das amostras de Curcumina

Para a otimização do procedimento de solubilização foram selecionadas as condições que resultaram em maior praticidade. As amostras foram pesadas em um total de 20 mg de cada, e o conteúdo foi transferido para o balão volumétrico de 100 mL.

A solubilização foi feita em metanol com auxílio de banho de ultrassom (Unique USC1400; 40 KHz; 120 W) por 5 min, obtendo-se assim uma solução com concentração 200 µg/mL. Após esse tempo, a amostra foi filtrada em filtro de 0,45 µm e o filtrado foi analisado por CLAE-DAD-UV. Este procedimento foi realizado em triplicata e padronizado para ser usado em todos os ensaios das amostras.

2.3.3. Desenvolvimento do método de análise

Inicialmente, a etapa do desenvolvimento do método analítico foi determinar experimentalmente o espectro de absorção da curcumina na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e avaliar qual o comprimento de onda de maior absorção. Foi analisado uma solução aquosa com concentração de 200 µg/mL e o seu espectro obtido. O comprimento de onda de maior seletividade e absorção foi determinado. Conforme detalhado em 2.3.1 foram utilizadas duas colunas para análise da curcumina e variação dos parâmetros de análise. Durante o processo de análise dos parâmetros cromatográficos foi selecionada a condição que resultou na melhor eficiência, considerando o fator de retenção, simetria do sinal, tempo de retenção e tempo total de análise.

2.3.4. Curva analítica

As análises das curvas analíticas do método para dosagem de curcumina e bisdemetoxicurcumina foram avaliadas na faixa de concentração de 6,25 a 200 µg/mL. Os 6 níveis de concentração analisados estão neste intervalo: 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. As amostras foram analisadas em triplicata, em dias diferentes. As equações lineares foram obtidas por cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

A curva-resposta utilizada para a quantificação foi obtida por cálculo da média e do desvio-padrão do coeficiente angular.

2.3.5. Exatidão

A exatidão dos resultados obtidos para Curcumina (Sigma-Aldrich, Brasil) foi avaliada através das médias das triplicatas, obtidas pelas seis diferentes concentrações analisadas, e determinada pela comparação das concentrações teóricas e experimentais. Segundo o INMETRO (2016) as concentrações derivadas da curva analítica, não devem estar fora do intervalo entre os valores inferiores a 85% e superiores a 115%.

3. Resultados

3.1. Desenvolvimento do método de análise

3.1.1. Condições de análise

Os parâmetros analíticos para análise e quantificação dos curcuminoides por CLAE-DAD-UV foram determinados a partir de solução do padrão em metanol (200 µg/mL) e variando as condições de fase móvel e fase estacionária (Tabela 1). Todas as amostras foram analisadas mantendo-se o fluxo de fase móvel em 1,2 mL/min, temperatura do forno em 50 °C, uma vez que nos testes em outras condições não foi possível observar uma separação entre os sinais dos curcuminoides. O volume de injeção foi de 20 µL.

De todas as condições testadas, a condição 4 apresentou a melhor capacidade de separação, simetria de sinal e com o tempo total de análise de 25 min. O tempo de retenção (tR) da curcumina nessa condição foi registrado em 16,67 ±0,01 min (Figura 2).

Tabela 1. Condições testadas para análise da mistura de curcuminoides

Condição	Fase Móvel (v/v)	Fase Estacionária
1	Tampão Fosfato de Potássio (80%)	Coluna NST C18
	Acetonitrila (20%)	(250 mm x 4,6 i.d. x 5 µm)
2	Tampão Fosfato de Potássio (60%)	Coluna NST C18
	Acetonitrila (40%)	(250 mm x 4,6 i.d. x 5 µm)
3	Tampão Fosfato de Potássio (40%)	Coluna NST C18
	Acetonitrila (60%)	(250 mm x 4,6 i.d. x 5 µm)
4	Tampão Fosfato de Potássio (35%)	Coluna Ascentis Phenyl
	Acetonitrila (65%)	(250 mm x 4,6 i.d. x 5 µm)
5	Tampão Fosfato de Potássio (50%)	Coluna Ascentis Phenyl
	Acetonitrila (50%)	(250 mm x 4,6 i.d. x 5 µm)

Portanto, os melhores parâmetros estabelecidos para análise da mistura de curcuminoides em metanol foram:

1. Coluna cromatográfica Ascentis Phenyl (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
2. Tampão Fosfato de Potássio pH 3,5 (35%)
3. Acetonitrila grau HPLC (65%)
4. Fluxo constante: 1,2 mL/min.
5. Temperatura do forno: 50 °C
6. Tempo total de análise: 25 min

O comprimento de onda (λ) que apresentou maior seletividade e absorção média foi definido em 420 nm, após a observação em espectros com detecção em Ultravioleta/Visível dos curcuminoides (espectros de UV são apresentados no material suplementar, Figuras S1-S3).

De posse do novo método analítico, as curvas analíticas foram geradas para cálculo do teor de curcuminoides nas amostras dos fabricantes.

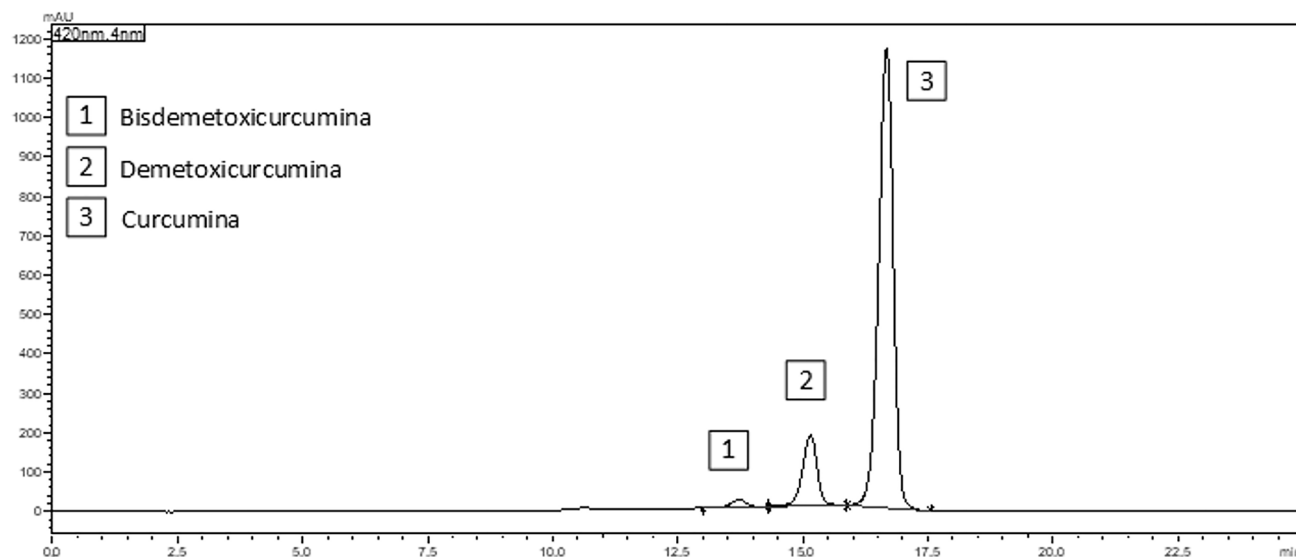


Figura 2. Cromatograma referente à análise da mistura de padrões (1) bisdemetoxicurcumina (padrão analítico, Sigma-Aldrich, Brasil), (2) demetoxicurcumina (padrão analítico, Sigma-Aldrich, Brasil) e (3) curcumina (Sigma-Aldrich, Brasil), em comprimento de onda de 420 nm, utilizando como fase móvel tampão fosfato (A) e acetonitrila (B)

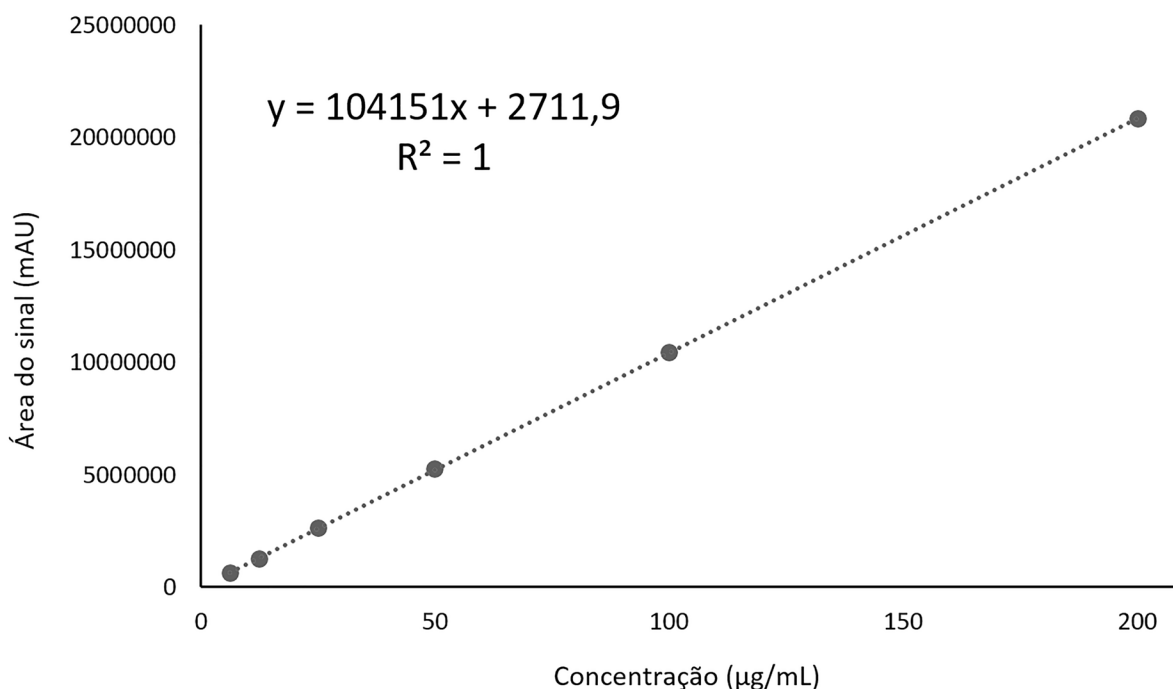


Figura 3. Curvas analíticas obtidas para Curcumina, no intervalo de concentração de 6,25 a 200 µg/mL

3.2. Curva analítica

As curvas analíticas obtidas para curcumina e bisdemetoxicurcumina em metanol foram feitas no intervalo de concentração de 6,25 a 200 µg/mL. Os resultados obtidos das curvas analíticas estão apresentados nas figuras 3 e 4. As curvas analíticas apresentaram correlação linear positiva, com $r_{\text{curcumina}} = 1$, $r_{\text{bisdemetoxicurcumina}} = 0,9999$. A equação 1 foi obtida por regressão linear e utilizada para a quantificação da curcumina e a equação 2 foi obtida por regressão linear e utilizada para a quantificação da bisdemetoxicurcumina, tendo sido calculadas pelas médias e desvio-padrão das três análises (em três dias diferentes). Na equação da reta $Y = (a) X + (b)$, onde “a” é o coeficiente angular, “b” o coeficiente linear, “Y” é a absorbância e “X” é a concentração.

- Curcumina

$$\text{ABS} = (104151) \times \text{Concentração} - (2711,9)$$

Equação 1. Fórmula obtida por regressão linear a partir das diferentes concentrações de curcumina (Sigma-Aldrich, Brasil).

- Bisdemetoxicurcumina

$$\text{ABS} = (147296) \times \text{Concentração} - (204977)$$

Equação 2. Fórmula obtida por regressão linear a partir das diferentes concentrações de bisdemetoxicurcumina (Sigma-Aldrich)

3.3. Resultados preliminares referentes ao estudo das análises dos teores de curcuminoides

Avaliando as amostras contendo curcumina por CLAE-DAD-UV foi possível registrar que o método foi capaz de separar os sinais característicos das substâncias curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, utilizando detector DAD-UV-Vis em 420 nm. De acordo com o método desenvolvido foi constatado que a curcumina apresentou sinais em tR de 16,67 - 16,68 min; demetoxicurcumina 15,15 - 15,16 min e bisdemetoxicurcumina 13,70 - 13,75 min. São apresentados na Tabela 2 as amostras, áreas e percentuais calculados dos analitos.

A partir da análise dos resultados para amostra de Curcumina (Fabricante C), cujo cromatograma é apresentado na Figura 5, determinou-se que o teor percentual referente à curcumina é de 79,42%, e o teor percentual referente à bisdemetoxicurcumina é 3,68% e demetoxicurcumina é 16,90%.

Já para as amostras de origem do fabricante A, foi possível registrar maior pureza em termos da presença de curcumina (85,57%) em relação ao fornecedor C que ofereceu uma amostra mais impura de curcumina. Para o cromatograma da amostra denominada de Curcumina Fabricante B, foi observado um sinal único, com tR em 16,68 min e teor percentual em torno de 100%, demonstrando tratar-se de curcumina com elevado teor de pureza. Já o cromatograma da amostra classificada como bisdemetoxicurcumina, também do fabricante B, foi observado um sinal único, com tR em 13,70 min e teor percentual em torno de 100%, demonstrando a elevada pureza da amostra. As Figuras 6 e 7 referem-se aos cromatogramas das amostras obtidas do fabricante B.

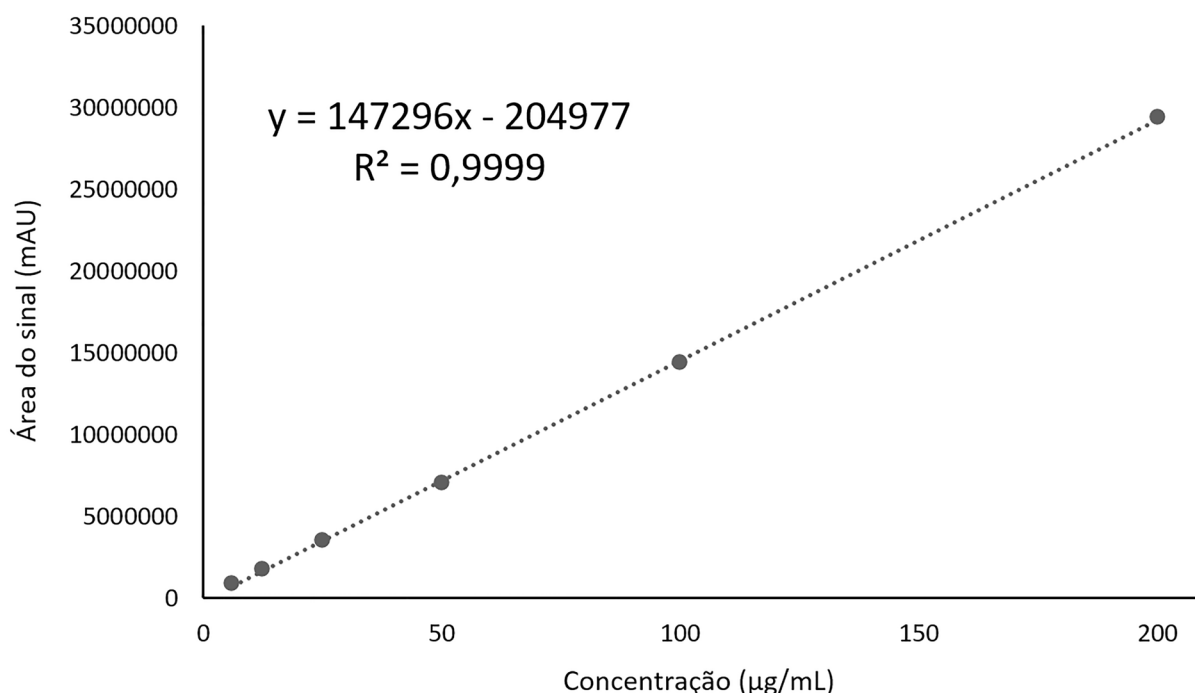


Figura 4. Curvas analíticas obtidas para bisdemetoxicurcumina no intervalo de concentração de 6,25 a 200 µg/mL.

Tabela 2. Substâncias identificadas nas amostras, áreas médias, teor percentual médio e respectivos tempos de retenção.

Amostras	Área Média Sinal 1	Teor (%)	tR (min)	Área Média Sinal 2	Teor (%)	tR (min)	Área Média Sinal 3	Teor (%)	tR (min)
Curcumina 95% (A)	386442	1,39	13,75	3625379	13,04	15,15	23796358	85,57	16,67
Curcumina (B)	0	0	0	0	0	0	26090899	100	16,68
Curcumina (C)	933538	3,68	13,73	4287389	16,90	15,15	20142429	79,42	16,67
Curcuminoides (B)	1264115	4,44	13,73	5267638	18,52	15,16	21913121	77,04	16,68
Bisdemetoxicurcumina (B)	31061324	100	13,70	0	0	0	0	0	0

Área Sinal 1 – Sinal correspondente a bisdemetoxicurcumina; Área Sinal 2 - Sinal correspondente a demetoxicurcumina;
 Área Sinal 3 – Sinal correspondente a Curcumina; tR (min) - Tempo de Retenção; (A) – Fabricante A; (B) – Fabricante B; (C) – Fabricante C.

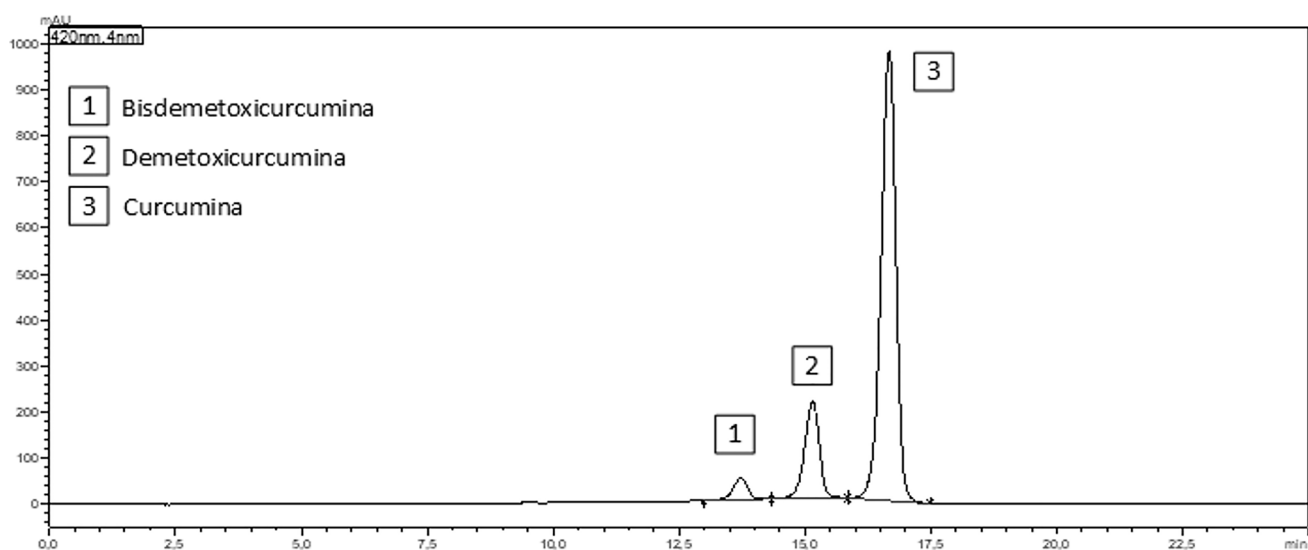


Figura 5. Cromatograma referente à análise da Curcumina (Fabricante C) em comprimento de onda de 420 nm, utilizando como fase móvel tampão fosfato (A) e acetonitrila (B)

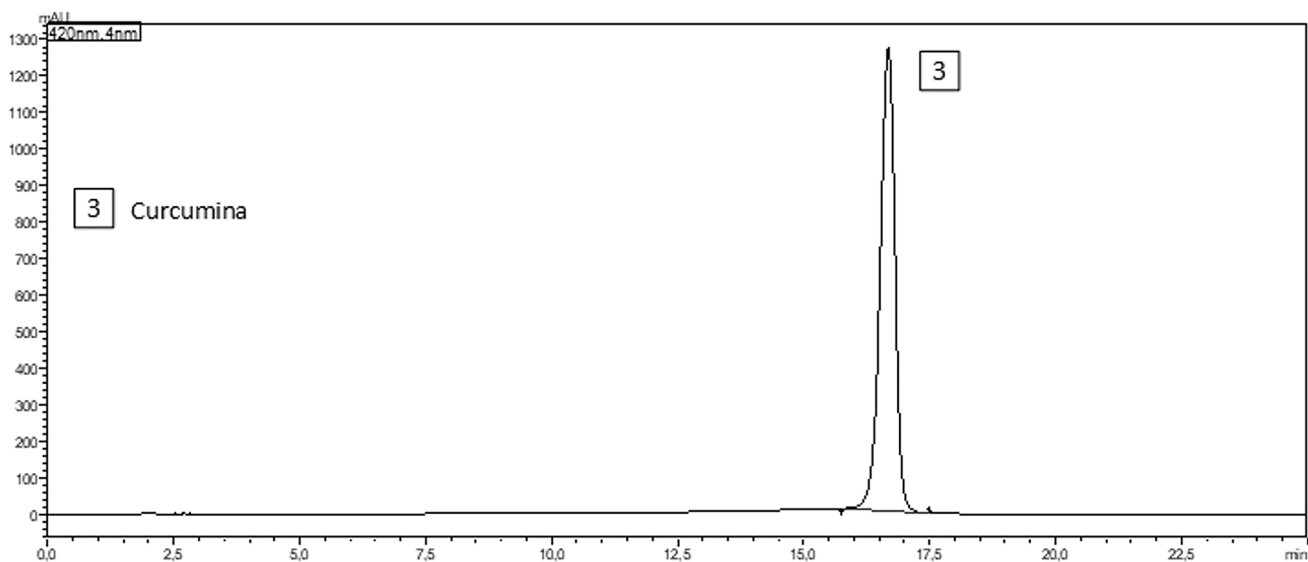


Figura 6. Cromatograma referente à análise da Curcumina (Fabricante B) em comprimento de onda de 420 nm, utilizando como fase móvel tampão fosfato (A) e acetonitrila (B)

3.4. Exatidão para Curcumina

O cálculo para a exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. A mesma foi avaliada utilizando os seis valores de concentração apresentados na Tabela 3, compreendendo os níveis baixos, médios e altos (6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 200 ug/mL). Os resultados obtidos na avaliação da exatidão da curcumina (Sigma-Aldrich) foram satisfatórios, sendo a menor variação de 99,98% para 200 ug/mL e a maior de 99,20% para 6,25 ug/mL. Assim foi possível registrar as variações dentro dos limites permitidos pelas normas de validação (85 – 115%). Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado exato.^{15,16} Os resultados constam na tabela 3.

3.5. Comparação com dados da literatura

Ali e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade do método desenvolvido ser mais seletivo e eficaz em relação aos descritos para a análise de curcuminoides, utilizando uma coluna de fase reversa fenil. O método foi realizado em temperatura ambiente, em condições livres de ácido,

sendo capaz de apresentar boa linearidade e eficiência, porém não demonstrou boa separação de sinais e resolução. Desta forma, o método que foi proposto no presente trabalho se mostra mais eficiente na separação dos curcuminoides presentes nas amostras quando comparado ao de Ali e colaboradores.¹⁷ Além disso, outra vantagem do novo método desenvolvido é a utilização de solução tampão e acetonitra como fase móvel, visto que na maioria dos trabalhos são utilizados solventes mais tóxicos e prejudiciais ao sistema cromatográfico, tais como metanol.¹⁸⁻²¹

O método estabelecido por Xu e colaboradores (2020) para determinar o conteúdo de três curcuminoides em amostras de açafrão foi preciso, com boa reprodutibilidade, linearidade e recuperação. Neste trabalho foi utilizada uma coluna C18, um gradiente de eluição com acetonitrila, temperatura de 30 °C e monitoramento em 430 nm. O método apresentou boa separação, porém foi utilizado um tempo total de análise superior (t_R curcumina \cong 19 min) ao desenvolvido neste trabalho e, conseqüentemente, um gasto maior de tempo e fase móvel, o que acarreta análises mais dispendiosas.²²

No geral, todos os parâmetros cromatográficos obtidos no novo método desenvolvido para separação dos curcuminoides foram considerados satisfatórios.

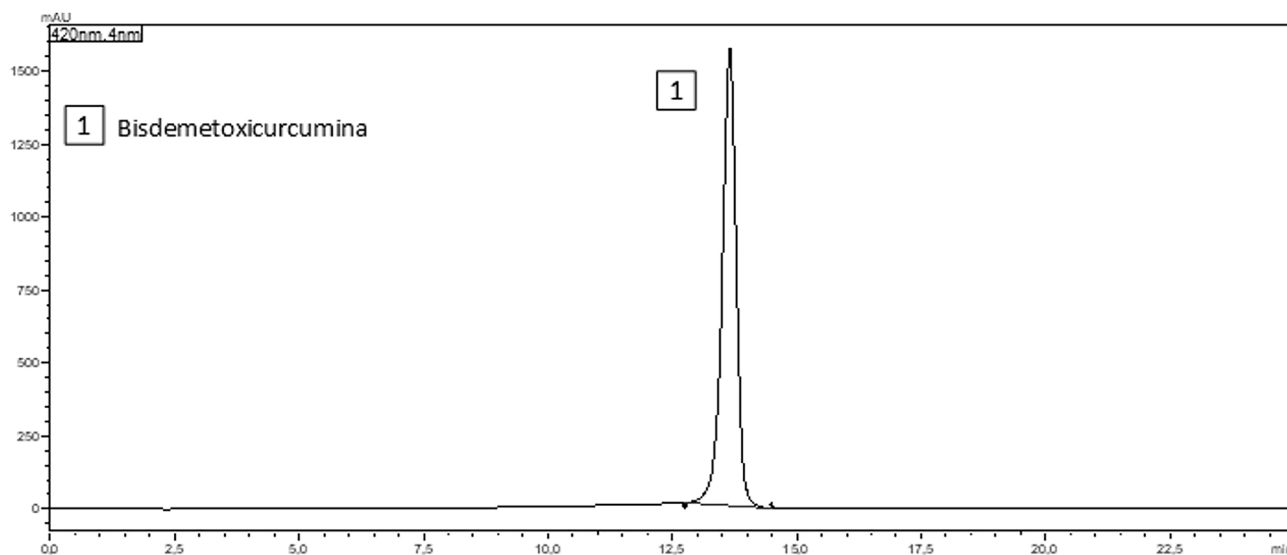


Figura 7. Cromatograma referente à análise da bisdemetoxicurcumina (Fabricante B) em comprimento de onda de 420 nm, utilizando como fase móvel tampão fosfato (A) e acetonitrila (B)

Tabela 3. Resultados da avaliação da exatidão para quantificação da curcumina no novo método desenvolvido para análise.

[] ug/mL	Dia 1	Dia 2	Dia 3	ABS M	Conc	Δ ug %	Δ %
	Abs média	Abs média	Abs média				
200	20826087,67	20826831,33	20818463,67	20823794	199,96	-0,02	99,98
100	10416607,00	10436456,67	10429247,33	10427437	100,14	0,14	100,14
50	5246593,67	5227189,00	5218482,00	5230755	50,25	0,50	100,50
25	2615072,67	2605502,33	2606786,00	2609120	25,08	0,31	100,31
12,5	1282961,67	1295529,00	1296371,00	1291621	12,43	-0,58	99,42
6,25	640205,67	643110,00	645701,33	643006	6,20	-0,80	99,20

4. Conclusão

O método analítico desenvolvido neste trabalho demonstrou boa seletividade, resolução, simetria de sinal, fator de capacidade e exatidão para análise de curcumina nas amostras. O método desenvolvido permite, também, análise dos outros curcuminoides, bisdemetoxicurcumina e demetoxicurcumina, e cabe ressaltar que o mesmo emprega o uso de uma coluna de sílica modificada com grupos fenila para as análises. Além disso, os valores do percentual para as amostras de origem do fabricante “B” (curcumina e bisdemetoxicurcumina) apresentaram uma maior pureza cromatográfica em relação as outras amostras, com percentual em torno de 100%.

Referências Bibliográficas

- Kotha, R. R.; Luthria, D. L.; Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules* **2019**, *24*, 1. [PubMed]
- Sabir, S.M.; Zeb, A.; Mahmood, M.; Abbas, S.R.; Ahmad, Z.; Iqbal, N.; Phytochemical analysis and biological activities of ethanolic extract of *Curcuma longa* rhizome. *Brazilian Journal of Biology* **2020**, *81*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- Guimarães, A.F.; Vinhas A.C.V.; Gomes, A.F.; Souza, L.H.; Krepsky, P. B.; Óleo essencial de *Curcuma longa* l. rhizomes composição química, variação de rendimento e estabilidade. *Química Nova* **2020**, *43*, 909. [CrossRef]
- Alonso, J.; Em *Tratado de Fitofarmacos e Nutracêuticos*, 1a ed., AC Farmacêutica: São Paulo, 2016.
- Rodrigues, A. S.; Oliveira, D. R.; Lima, C. L. S.; Holanda, M. O.; Barboza, A. A. A.; Canabrava, N. V.; Lima, A. T. A.; Lira, S. M.; The preventive effects of curcumin and micronutrients in colon and rectum cancer. *Brazilian Journal of Health Review*, **2019**, *2*, 1438. [CrossRef]
- Rajagopal, K.; Varakumar, P.; Baliwada, A.; Byran, G.; Activity of phytochemical constituents of *Curcuma longa* (turmeric) and *Andrographis paniculata* against coronavirus (COVID-19): an in silico approach. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2020**, *6*, 104. [CrossRef] [PubMed]
- Stohs, S. J.; Chen, O.; Ray, S. D.; Ji, J.; Bucci, R. L.; Preuss, H. G.; Highly Bioavailable Forms of Curcumin and Promising Avenues for Curcumin-Based Research and Application: A Review. *Molecules* **2020**, *25*, 1397. [CrossRef] [PubMed]
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da saúde, 2015. Monografia da espécie *Curcuma longa* L. (CURCUMA). Disponível em: <<https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/22/Monografia-Curcuma-CP-corrigida.pdf>>. Acesso em: 14 março 2021.
- Pothitirat, W.; Gritsanapan, W. Variability of Curcuminoids: Antioxidative Components in Ethanolic Turmeric Extract Determined by UV and HPLC Methods. *Acta Horticulturae* **2008**, *786*. [CrossRef]
- Manzan, A. C. C. M.; Toniolo, F. S.; Bredow, E.; Povh, N. P. Extraction of Essential Oil and Pigments from *Curcuma longa*[L.] by Steam Distillation and Extraction with Volatile Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6802. [CrossRef] [PubMed]
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 166 de 24 de julho de 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 18 janeiro 2021.
- Silva, A. F. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Alfenas, 2019. [Link]
- Santos, R. O.; *Dissertação de Mestrado*, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2017. [Link]
- Ravisankar, P.; Navya, C. N.; Pravallika, D.; Sri, D. N.; A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *Journal of Pharmacy*, **2015**, *5*, 7. [CrossRef]
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Orientação sobre validação de Métodos analíticos. Revisão 05, 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>. Acesso em: 12 março 2021.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para orientação sobre validação de métodos analíticos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html>. Acesso em: 14 março 2021.
- Ali, I.; Haque, A.; Saleem, K. Separation and identification of curcuminoids in turmeric powder by HPLC using phenyl column. *Analytical Methods*, **2014**, *6*, 2526. [CrossRef]
- Rocha, A. C. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Lisboa, 2015. [Link]
- Vidal-Casanella, O.; Nuñez, N.; Sentellas, S.; Nuñez, O.; Saurina, J.; Characterization of Turmeric and Curry Samples by Liquid Chromatography with Spectroscopic Detection Based on Polyphenolic and Curcuminoid Contents. *Separations* **2020**, *7*, 23. [CrossRef]
- Kumavat, S. D.; Chaudhari, Y. S.; Borole, P.; Mishra, P.; Shenghani, K.; Duvvuri, P. Degradation studies of curcumin. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, **2013**, *3*, 2. [CrossRef]
- Zaghary, W. A.; Hanna, E. T.; Zanon, M. A.; Abdallah, N. A.; Sakr, T. M.; Curcumin: Analysis and Stability. *Journal of Pharmaceutical Advanced Research* **2019**, *3*, 2. [CrossRef]
- Xu, L. U.; Shang, Z. P.; Lu, Y. Y.; Li, P.; Sun, L.; Guo, Q. L.; Bo, T.; Le, Z. Y.; Bai, Z. L.; Zhang, X.; Qiao, X.; Yeb, M. Analysis of curcuminoids and volatile components in 160 batches of turmeric samples in China by high-performance liquid chromatography and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, *188*, 113465. [CrossRef] [PubMed]