

Validação de método de análise quantitativa de carvacrol por HPLC-DAD em creme veterinário de *Origanum vulgare* L. 2% (m/m)

Mário Pádua^{1,2}, Alexandra Machado^{1,3}, Miguel Zegre^{2,4}, Pedro Martinho^{1,5}, Ana Costa-Veiga^{2,4,6}

1. Departamento das Ciências Exatas, da Vida, Sociais e Humanas, Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal. mario.padua@estesl.ipl.pt

2. H&TRC – Health & Technology Research Center, ESTeSL – Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

3. Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (CE3C) & Global CHANGE and Sustainability Institute, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, DBV, Campo Grande 1749-016 Lisboa, Portugal.

4. Departamento das Ciências da Terapia e Reabilitação, Escola Superior de Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

5. Unidade Local de Saúde de Santa Maria. Lisboa, Portugal.

6. CHRC – Comprehensive Health Research Centre, Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.

RESUMO

Introdução – A utilização de cremes contendo óleos essenciais de plantas aromáticas é uma área em crescente desenvolvimento em medicina veterinária. Os óleos essenciais apresentam propriedades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias que podem coadjuvar o tratamento de problemas de pele em gatos e cães. O controlo de qualidade de um creme com óleo essencial de *Origanum vulgare* L. inclui, entre outros ensaios, a quantificação de carvacrol (um monoterpene fenólico maioritário). **Objetivos** – Pretende-se extrair, separar e quantificar o carvacrol presente num creme farmacêutico, validando este método de controlo de qualidade. **Métodos** – Foram realizadas três extrações sólido-líquido consecutivas de 100mg de creme, tendo-se obtido uma distribuição da quantidade de carvacrol extraída de 74,7%, 19,4% e 5,9%, respetivamente, correspondendo a 95% de recuperação do total de óleo essencial contido no creme. Os extratos foram analisados por HPLC-DAD numa coluna RP-C18 com uma fase móvel de metanol:água:acetonitrilo. **Resultados** – O método foi validado, tendo resultado em precisão intraensaio e interensaio inferiores a 2%RSD. Obteve-se limite de deteção de 0,65µg/mL e limite de quantificação de 1,95µg/mL. O carvacrol constituía cerca de 36% da massa do óleo essencial do quimiotipo principal. **Conclusões** – O método desenvolvido pode ser utilizado para controlo de qualidade de cremes contendo carvacrol, podendo ser aplicado a outros monoterpenos.

Palavras-chave: Carvacrol; Origanum vulgare L.; Creme; HPLC-DAD; Controle de qualidade.

Validation of a quantitative analysis method for carvacrol by HPLC-DAD in *Origanum vulgare* L. veterinary cream 2% (m/m)

ABSTRACT

Introduction – The use of creams containing essential oils from aromatic plants is a growing area in veterinary medicine. Essential oils contain biological properties, including antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities, which can support the treatment of skin problems in cats and dogs. Quality control of creams containing *Origanum vulgare* L. essential oil includes, among other analyses, quantification of carvacrol, a major phenolic monoterpene. **Objectives** – This study aims to extract, separate, and quantify the carvacrol present in a cream formulation, thereby validating this quality control method. **Methods** – Three consecutive solid-liquid extractions were performed on 100mg of cream, yielding a distribution of extracted carvacrol quantities of 74.7%, 19.4%, and 5.9%, respectively. This corresponded to a total recovery of 95% of the essential oil content in the cream. The extracts were analyzed by HPLC-DAD on an RP-C18 column with a mobile phase of methanol:water:acetonitrile. **Results** – The method was validated, resulting in intra-assay and inter-assay precision values below 2% RSD. The LOD was found to be 0.65µg/mL, and the LOQ was 1.95µg/mL. Carvacrol constituted approximately 36% of the mass of the main chemotype's essential oil. **Conclusions** – The validated method is suitable for quality control of creams containing carvacrol and may be adapted for analysis of other monoterpenes.

Keywords: Carvacrol; Origanum vulgare L.; Cream; HPLC-DAD; Quality control.

Introdução

As afeções dermatológicas constituem uma das principais causas de consultas em medicina veterinária, sobretudo em animais domésticos de pequeno porte (cães e gatos)¹⁻². A pele, enquanto órgão responsável pela barreira e proteção primária do organismo animal, está submetida a múltiplos fatores que comprometem a sua integridade, manifestando-se maioritariamente sob a forma de prurido, lesões cutâneas, inflamações ou infeções na pele³. Estas patologias são maioritariamente resultantes da exposição a agentes, inflamatórios e/ou alérgicos, parasitários e imunológicos e mais frequentemente a agentes infecciosos².

Os óleos essenciais são produtos odoríferos, ricos em compostos voláteis de natureza diversa (terpenos, fenilpropanoides, poliacetilenos, entre outros), obtidos a partir de partes de plantas por hidrodestilação, destilação a vapor, destilação a seco ou por um processo mecânico sem aquecimento⁴⁻⁵. Estes são geralmente líquidos, lípidos, voláteis, pouco coloridos, solúveis em solventes orgânicos e lipossolúveis, com densidade inferior à da água. São reconhecidos pelas suas propriedades antissépticas (bactericida e fungicida), analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias e anestésicas locais⁶⁻⁷.

Os cremes são uma forma farmacêutica semissólida de aplicação local (tópica), preparações multifásicas constituídas por uma fase lipófila e por uma fase aquosa, podendo ser classificados como creme lipófilo (fase externa oleosa) ou hidrófilo (fase externa aquosa)⁸. A incorporação de óleos essenciais em formulações tópicas exige um equilíbrio entre a eficácia e a segurança. A concentração ideal para aplicações tópicas situa-se entre 1-2%, intervalo considerado eficaz para exercer atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, sem induzir efeitos adversos como eritema, edema ou alterações histológicas. Este intervalo também é compatível com a estabilidade físico-química da formulação, evitando separação de fases ou degradação dos constituintes voláteis⁹.

A composição do óleo essencial de *O. vulgare* pode variar consoante fatores como a origem geográfica, a estação de colheita ou o método de extração, resultando em diferentes quimiotipos de óleos essenciais (OE), ou seja, grupos quimicamente distintos dentro de uma espécie¹⁰. Ainda assim, os componentes mais comuns e relevantes em *O. Vulgare* incluem carvacrol (40-80%), timol (3-10%), linalol, borneol, geraniol (em menores proporções)¹⁰⁻¹¹. Estes compostos atuam de forma sinérgica, o que aumenta o espectro e a potência da ação antimicrobiana, dificultando a resistência por parte dos microrganismos¹²⁻¹⁴.

O carvacrol (*5-isopropil-2-metilfenol*) é um fenol derivado de um monoterpene natural do cimenho¹⁵, pertencente à classe dos monoterpenos oxigenados, de baixo peso molecular (150,22g/mol; densidade 0,976g/mL)¹⁶. Encontra-se distribuído em óleos essenciais de espécies da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*¹⁴.

Quimicamente caracteriza-se por um anel aromático (*cf.* Figura 1) com substituintes hidroxilo, metilo e isopropilo, conferindo-lhe propriedades físico-químicas como elevada volatilidade, lipofilicidade e estabilidade térmica.

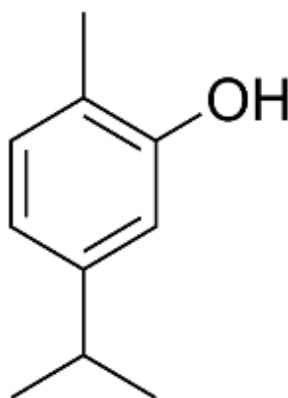


Figura 1. Carvacrol. Desenhado com ChemSketch™.

Do ponto de vista farmacognóstico, o carvacrol é um metabolito secundário biossintetizado através da via do ácido mevalónico e encontra-se armazenado em tricomas glandulares das folhas e flores das plantas produtoras. Demonstra ampla atividade biológica, nomeadamente ação antibacteriana e antifúngica, atribuída à sua capacidade de desorganizar a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, provocando alterações na permeabilidade iónica e inibição da síntese de ATP¹⁶.

Objetivos

Extrair, separar e quantificar o carvacrol presente em creme contendo 2% de óleo essencial de *Origanum vulgare* L., validando este método analítico de controlo de qualidade por HPLC-DAD.

Métodos

Reagentes

Os reagentes carvacrol, metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) e H₂O foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Foi preparada uma solução *stock* de carvacrol, 136,0µg/mL em ACN, tendo-se utilizado diluições de 6,8 a 54,4µg/mL.

Creme de óleo essencial do quimiotipo 2 (O2) de *Origanum vulgare* L. a 2%. Este quimiotipo tem como principal componente o carvacrol¹⁰, sendo este o composto quantificado para efeitos de controlo de qualidade.

Preparação das amostras

De acordo com a Figura 2 foram extraídos 100mg de OE de O2 com 1mL de ACN. A suspensão foi homogeneizada num *vortex* à velocidade máxima durante dez minutos, seguido

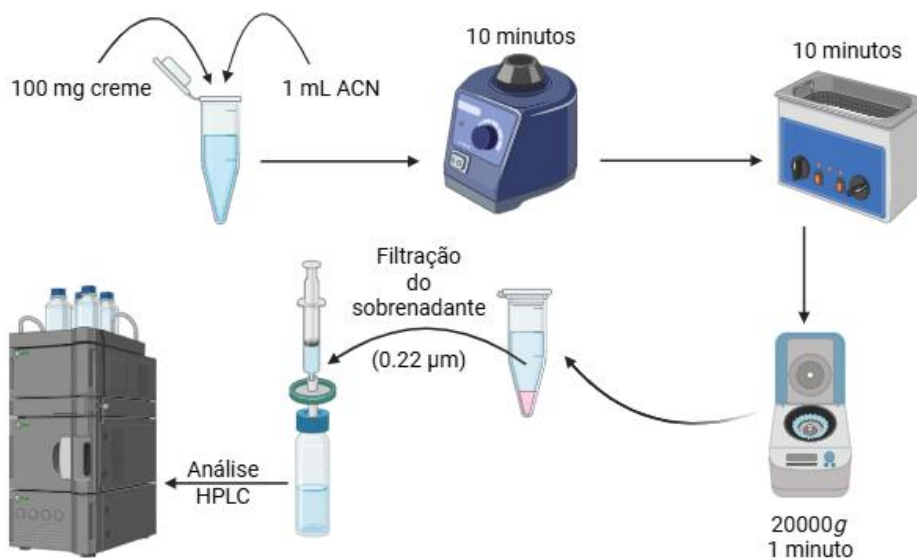
duma sonicação num aparelho VWR USC900 (45 kHz), ajustado para a potência máxima (nível 9) durante dez minutos. As amostras foram centrifugadas para separar as fases (20000g, um minuto). O sobrenadante foi recuperado e filtrado através de um filtro de 0,22µm para um frasco de HPLC. O sedimento foi reextraído nas mesmas condições e recuperado para um novo frasco mais duas vezes.

Foram utilizados 100mg de creme sem OE como controlo e 1mL de solução 2% de óleo essencial foi utilizado para estimar o valor de 100% sem interferência da matriz do creme, totalizando três amostras de creme com OE, três amostras de creme sem OE e uma amostra sem creme, mas com OE.

Sistema HPLC

Foi utilizado um HPLC Thermo Surveyor equipado com desgaseificador, bomba quaternária, amostrador automático e detetor de díodos (DAD). Espectros UV de absorção foram obtidos entre 200-900nm, com quantificação a 275nm.

O interface gráfico utilizado foi o Xcalibur 2.0. Fase estacionária Phenomenex Luna RP-C18(2), 200mm x 4,6mm x 5µm com pré-coluna. A fase móvel MeOH:ACN:H₂O (60:15:25) com um fluxo isocrático de 0,7mL/min durante 35 minutos. Volume de injeção foi de 10µL. Temperatura ambiente (25° C).



Created in BioRender.com bio

Figura 2. Preparação das amostras de creme de óleo essencial do quimiotipo 2 de *Origanum vulgare* L. para análise por HPLC. Criado com BioRender.com.

Validação da separação e quantificação de carvacrol por HPLC-DAD

Foram seguidas as recomendações da International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)¹⁷, bem como as boas práticas para o controlo de qualidade em farmácia¹⁸.

Identificação e seletividade

Foram avaliadas comparando os cromatogramas da solução padrão e dos extratos e respetivos espectros de absorção obtidos pelo DAD.

Linearidade

Foram construídas três retas de calibração. O quadrado do coeficiente de *Pearson* (R^2) foi obtido pelo método dos mínimos quadrados. Este parâmetro permitiu avaliar a linearidade da relação entre a área de debaixo do pico relativo ao carvacrol medida a 275nm e a massa cromatografada.

Exatidão

Este parâmetro foi calculado com a percentagem da diferença entre o valor calculado e o valor real.

Precisão

A precisão intraensaio foi analisada em cinco níveis, sendo a precisão interensaio analisada comparando três diferentes retas de calibração. A percentagem de desvio-padrão relativo (%RSD) foi calculada.

Limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

LOD e LOQ foram calculados usando as expressões $LOD=3.3\sigma/s$ e $LOQ=10\sigma/s$, respetivamente, em que σ é o desvio-padrão das ordenadas na origem das várias retas de calibração e s é a média dos declives das várias retas de calibração^{17,19}.

Considerações éticas

O projeto teve parecer favorável da Comissão de Ética da ESTeSL (CE-ESTeSL-Nº.58-2024).

Resultados e Discussão

Validação do método cromatográfico

Identificação e seletividade

Regista-se apenas um pico (*cf.* Figura 3A), correspondente ao carvacrol¹¹, como atesta o espectro de absorção (*cf.* Figura 3B). A Figura 3C mostra que o pico maioritário (8,96min) está isolado de picos adjacentes, significando elevada seletividade. De notar que os picos a 23,73 minutos e 25,5 minutos têm espectros de absorção semelhantes ao carvacrol, sendo provavelmente moléculas da mesma família, que poderão ser quantificadas se forem identificadas (não mostrado).

Online first

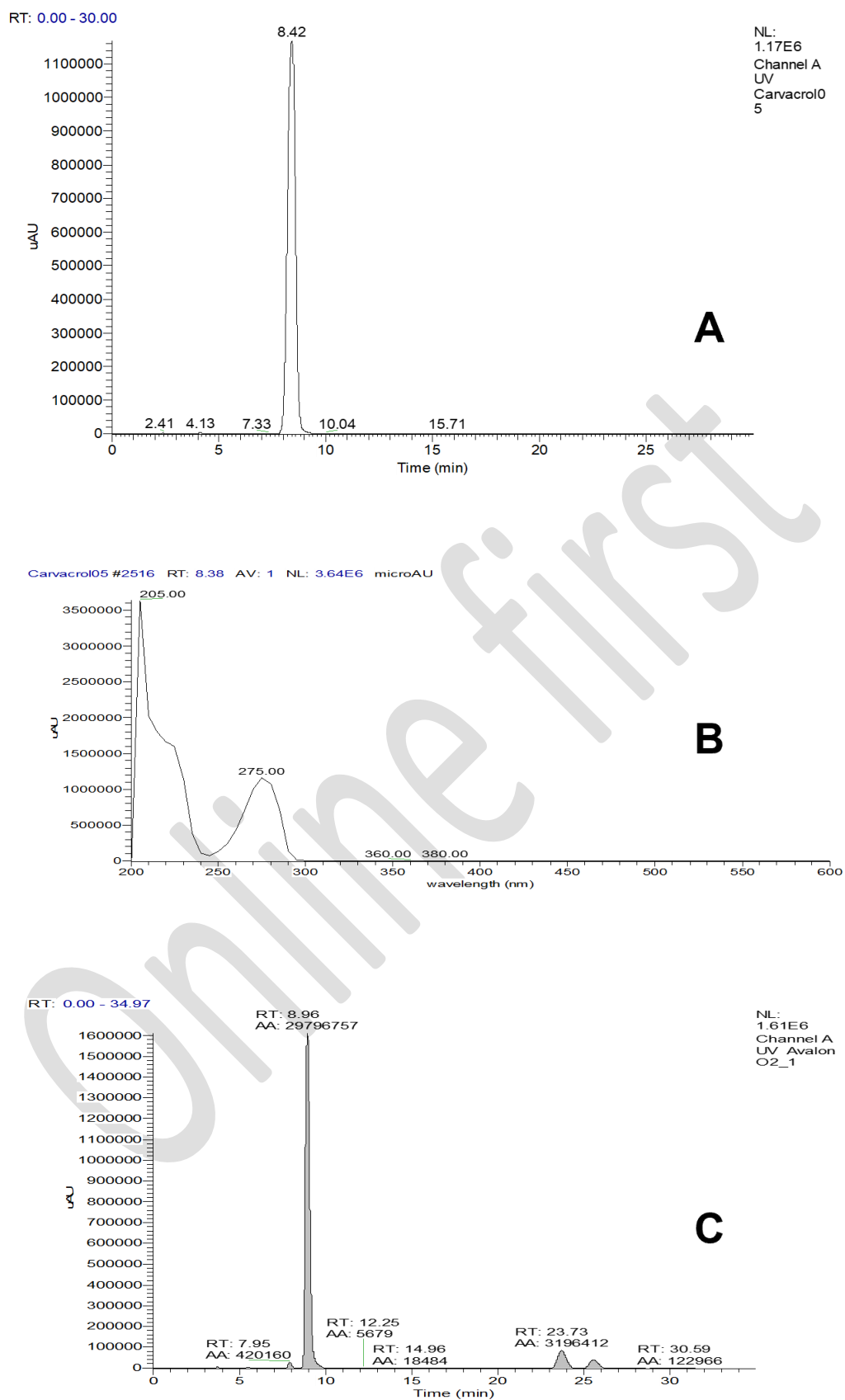


Figura 3. Identificação e seletividade. A – Cromatograma do carvacrol no nível 5,44µg em 10µL injetados. B – Espectro de absorção UV/Vis. C – Cromatograma do extrato 1.

Exatidão

São valores sempre inferiores a 5%, o que revela um excelente compromisso entre o valor calculado e o valor experimental.

Tabela 1. Exatidão dos cinco níveis por 10µL de injeção

Nível	Experimental	Calculado	Unidades	Exatidão
1	0,68	0,68	µg	-0,1%
2	1,36	1,36	µg	0,0%
3	2,72	2,75	µg	3,0%
4	4,08	4,12	µg	4,4%
5	5,44	5,45	µg	0,6%
1	0,68	0,68	µg	0,3%
2	1,36	1,35	µg	-0,8%
3	2,72	2,70	µg	-1,9%
4	4,08	4,06	µg	-1,6%
5	5,44	5,42	µg	-2,0%
1	0,68	0,69	µg	0,7%
2	1,36	1,35	µg	-0,8%
3	2,72	2,70	µg	-1,5%
4	4,08	4,08	µg	0,3%
5	5,44	5,44	µg	-0,3%

Linearidade

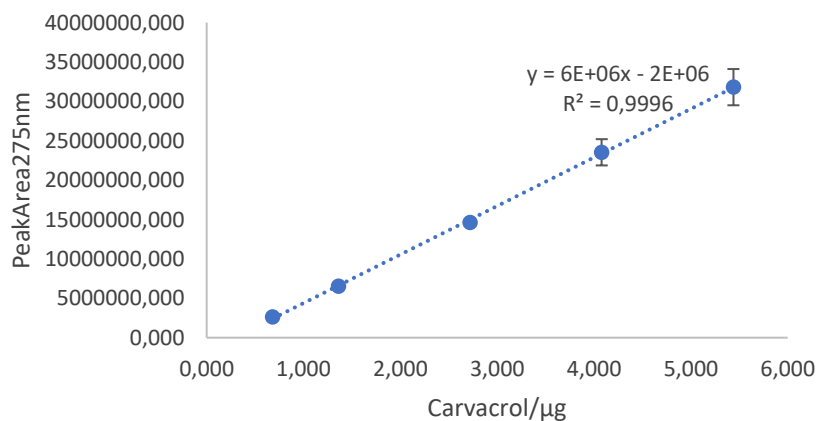


Figura 4. Retra de calibração para o carvacrol. Volume de cada injeção 10µL.

A reta (Figura 4) apresenta uma excelente linearidade ($R^2=0,9996$). A gama de valores dentro da linearidade estende-se até aos 20µg (não mostrado), o que tem impacto nos volumes de amostra injetados. Apenas foram realizadas injeções de 10µL, mas, no futuro, perspectiva-se ser possível injetar volumes maiores.

Precisão

A Tabela 2 mostra a precisão intraensaio analisada em cinco níveis. Observaram-se valores inferiores a 2% de RSD para os cinco níveis.

Tabela 2. Precisão intraensaio – áreas médias dos cinco níveis

Nível	Áreas médias	Desvio-padrão	%RSD
1	2548984	22847,6	0,896
2	6522187	26207,1	0,402
3	14591105	161757,2	1,109
4	22705939	181673,3	0,800
5	30657058	76364,4	0,249

A Tabela 3 mostra a precisão interensaio analisada pela comparação de três retas de calibração, tendo apresentado valores inferiores a 1% de RSD, tanto nos declives (*m*) como na ordenada na origem (*b*), apresentando, assim, resultados excelentes.

Tabela 3. Precisão interensaio – comparação de diferentes retas de calibração

	<i>m</i>	<i>b</i>
#1	5942152,0	-1473579,5
#2	5938600,5	-1458485,4
#3	5913407,1	-1481270,3
Média	5931386,5	-1471111,8
Desvio-padrão	15671,6	11591,2
%RSD	0,264	0,789

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Os LOD e LOQ foram calculados e obtiveram-se 0,65µg/mL e 1,95µg/mL, respetivamente, valores compatíveis com os obtidos por outros autores^{5,8}. Em termos analíticos, a tecnologia que apresenta limites de quantificação (LOQ) mais baixos é a GC-MS ou GC-FID, com valores da ordem dos 0,05µg/mL¹⁹ ou dos 0,01µg/mL²⁰. O HPLC-DAD é uma alternativa, apesar dos LOQ serem normalmente da ordem dos 1-2µg/mL²⁰⁻²¹. Apesar das diferenças de sensibilidade, o HPLC-DAD é uma tecnologia válida para o controlo de qualidade dos cremes produzidos, permitindo quantificar de forma rigorosa a concentração de carvacrol.

Resultados das três extrações, com creme e sem creme

A Tabela 4 mostra a distribuição/eficácia de cada processo de extração sólido-líquido das três amostras de creme. Em média, a primeira extração com ACN obteve 74,7% do carvacrol presente no início, a segunda 19,4% e a terceira 5,9%.

Tabela 4. Eficácia extrativa dos três ensaios – média (%) da massa de Carvacrol extraída em cada ensaio

Média (%)	#1 (%)	#2 (%)	#3 (%)
74,7	75,7	75,2	73,3
19,4	18,8	19,0	20,3
5,9	5,5	5,8	6,4

Foi tentado combinar os três extratos num só e depois evaporar à secura sob fluxo de azoto a 35° C, depois redissolver em ACN e injetar. Em teoria, conseguir-se-ia aumentar a concentração, o que permitiria diminuir LOD e LOQ. Os resultados mostraram a perda total de carvacrol no processo, tendo por isso sido abandonado (não mostrado). A perda de carvacrol por coevaporação com o ACN é provável, dado que o ACN tem uma pressão de vapor (>100hPa) muito mais alta que o carvacrol (3,5Pa) e, por isso, arrasta o carvacrol no seu fluxo de evaporação, mesmo a 37° C.

A Tabela 5 mostra o rendimento de recuperação nos três ensaios de 90,6%, 93,2% e 101,9%, respetivamente, correspondendo um valor médio de 95% de recuperação do total colocado no creme, resultado em linha com Steiner e colegas²². Verifica-se ainda que o rendimento das extrações independentes foi muito semelhante. O facto de um valor de recuperação de 101,9% aparecer deve-se aos algoritmos de integração do Xcalibur. Optou-se por não alterar pontualmente, mantendo a integração automática.

De referir que o creme continha 2% de OE. Claramente, desses 2mg de OE apenas 0,723mg era carvacrol. A Figura 2C mostra a existência de mais dois picos detetáveis a 275nm. Quando se observou o cromatograma obtido com o DAD, em vez de apenas a 275nm (não mostrado), aparecem mais picos. A massa relativa de carvacrol no OE é então de cerca de 36%, o que é concordante com outros autores¹⁶⁻¹⁸.

Tabela 5. Massa de carvacrol em 100mg de creme – recuperação – três ensaios independentes

	Média	#1	#2	#3	Sem creme
Carvacrol/ μ g	688,0	654,6	673,3	736,0	722,5
Recuperação (%)	95,2	90,6	93,2	101,9	100,0
Desvio-padrão	42,6				
%RSD	6,2				

A Figura 4 apresenta os cromatogramas a 275nm das amostras de creme sem OE. As três extrações da mesma massa de creme não mostram qualquer pico que indicie artefactos de medição, concluindo-se que o ACN não extrai moléculas com sinal sobreponível ao carvacrol.

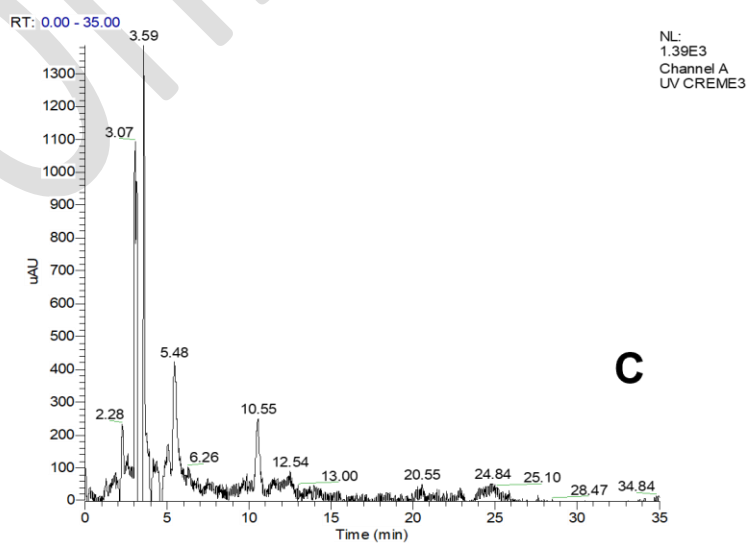
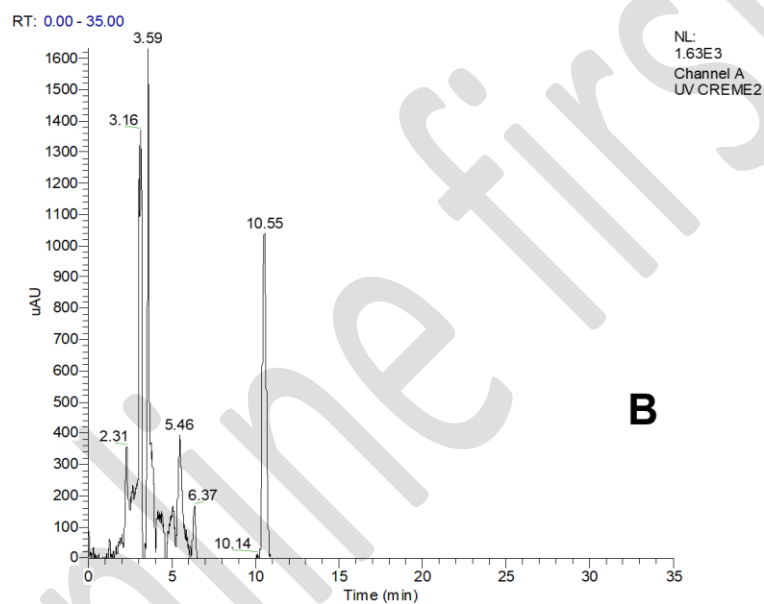
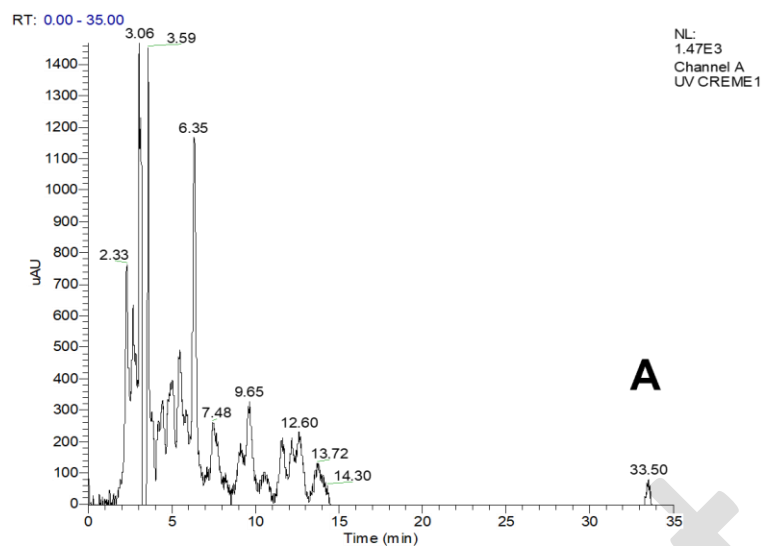


Figura 4. Cromatogramas a 275nm das amostras de creme sem OE – três extrações da mesma massa de creme.

Conclusões

Foi possível demonstrar a validade dum método analítico por HPLC-DAD para determinar a concentração de carvacrol no óleo essencial de *Origanum vulgare* L., (O2) quimiotipo carvacrol. A concentração deste monoterpeno no OE foi de 36%. O processo de extração sólido-líquido desenvolvido, com três extrações consecutivas com ACN da mesma massa de creme, resultou em cerca de 95% de recuperação de carvacrol. Os resultados apresentados indicam que o método desenvolvido pode ser utilizado para controlo de qualidade de cremes contendo carvacrol, podendo ser aplicado a outros monoterpenos.

Agradecimentos. Ao Politécnico de Lisboa, instituição financiadora do projeto PLANT-VET, através da bolsa IPL/IDI&CA2024/PLANT-VET_ESTeSL. Aos finalistas da Licenciatura em Farmácia Gonçalo Silva, João Cabaço, Mafalda Silva e Rita Cotrim, pela relevante colaboração no projeto PLANT-VET, que permitiu a obtenção do creme utilizado.

Contributo dos autores. Conceptualização Plant-Vet, ACV, MZ, PM; metodologia, MP; trabalho laboratorial, MP; redação do manuscrito original, MP; revisão, validação e edição do texto final, ACV, AM, MP.

Referências bibliográficas

1. Outerbridge CA, Jordan TJ. Current knowledge on canine atopic dermatitis: pathogenesis and treatment. *Adv Small Anim Care*. 2021;2:101-15.
2. Moriello KA, Coyner K, Paterson S, Mignon B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Vet Dermatol*. 2017;28(3):266-e68.
3. Souza TM, Figuera RA, Kommers GD, Barros CS. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia [Histological aspects of canine and feline skin as a tool for dermatopathology]. *Pesq Vet Bras*. 2009;29(2):177-90. Portuguese
4. European Pharmacopoeia Commission. Monographs on essential oils (information chapter). In: European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, editor. *European Pharmacopoeia*. 11th ed. Strasbourg: European Pharmacopoeia Commission; 2023. ISBN 9789287191052
5. Figueiredo AC. Biological properties of essential oils and volatiles: sources of variability. *Nat Volatiles Essent Oils*. 2017;4(4):1-13.
6. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446-75.

7. Zinno P, Guantario B, Lombardi G, Ranaldi G, Finamore A, Allegra S, et al. Chemical composition and biological activities of essential oils from *Origanum vulgare* genotypes belonging to the carvacrol and thymol chemotypes. *Plants (Basel)*. 2023;12(6):1344.
8. Infarmed. IX Farmacopeia Portuguesa. 9ª ed. Lisboa: Infarmed; 2008. ISBN 9789898369062
9. Laurente-Pachamango KG, Cruzado-Razco JL, Silva-Correa CR, Vilarreal-La Torre VE, Sagástegui-Guarniz WA, Gamarra-Sánchez CD, et al. Wound healing activity of an essential oil-based cream of *Origanum vulgare* L. on mice. *Pharmacogn J*. 2024;16(2):292-5.
10. Machado AM, Lopes V, Barata AM, Póvoa O, Farinha N, Figueiredo AC. Essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* (Hoffmanns. & Link) letsw. Grown in Portugal: chemical diversity and relevance of chemical descriptors. *Plants (Basel)*. 2023;12(3):621.
11. Mączka W, Twardawska M, Grabarczyk M, Wińska K. Carvacrol: a natural phenolic compound with antimicrobial properties. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(5):824.
12. Baser KH, Buchbauer G. Handbook of essential oils: science, technology, and applications [Internet]. Boca Raton: CRC Press; 2010. Available from: <https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/handbookofessentionalioil.pdf>
13. Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresour Technol*. 2008;99(18):8788-95.
14. Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, van Griensven LJ. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*. 2009;14(1):238-49.
15. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223-53.
16. National Center for Biotechnology Information. PubChem compound summary for CID 10364, Carvacrol. In: PubChem [Internet]; 2005 Mar 26 [updated 2025 Dec 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carvacrol>
17. ICH Expert Working Group. Validation of analytical procedures: texts and methodology – Q2(R1) (ICH Harmonised Tripartite Guideline) [Internet]. International Council for Harmonisation; 1994 [updated 2005 Nov]. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
18. Gama RG, Chaves MH. Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico [Best practices for high performance liquid chromatography: an approach to pharmaceutical quality control]. *Scientia Chromatographica*. 2019;11(3).

19. Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Khanavi M, Adib N, Bozorgi M, Akbari-Adergani B. A validated method for analysis of Swerchirin in *Swertia longifolia* Boiss. by high performance liquid chromatography. *Pharmacogn Mag.* 2010;6(21):13-8.
20. Hajimehdipoor H, Shekarchi M, Khanavi M, Adib N, Amri M. A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacogn Mag.* 2010;6(23):154-8.
21. Truzzi E, Benvenuti S, Bertelli D, Scozzoli M. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of hesperidin and carvacrol for veterinary use. *Am J Analyt Chem.* 2021;12(12):459-70.
22. Steiner D, Krska R, Malachová A, Taschl I, Sulyok M. Evaluation of matrix effects and extraction efficiencies of LC-MS/MS methods as the essential part for proper validation of multiclass contaminants in complex feed. *J Agric Food Chem.* 2020;68(12):3868-80.

Conflito de interesses

Os autores declaram não possuir quaisquer conflitos de interesse.

Artigo recebido em 29.08.2025 e aprovado em 03.10.2025