



# Desenvolvimento de metodologia de doseamento de cápsulas de maleato de enalapril por espectrofotometria de absorção no ultravioleta

## Development of a methodology to assay Enalapril Maleate in capsules by ultraviolet absorption spectrophotometry

Recebido em 04/05/2009

Aceito em 11/02/2011

Irene Cledes Külkamp<sup>1</sup>\*, Bianca Ramos Pezzini<sup>2</sup>, Luiz Alberto Kanis<sup>3</sup>, Marcos Antônio Segatto da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

<sup>2</sup> Universidade da Região de Joinville, SC, Brasil

<sup>3</sup> Universidade do Sul de Santa Catarina, SC, Brasil

<sup>4</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil

### RESUMO

O objetivo deste trabalho é validar um método simples por espectrofotometria de absorção no ultravioleta para o doseamento de maleato de enalapril, aplicável também para o doseamento de cápsulas deste fármaco. Os parâmetros avaliados foram: linearidade, precisão, exatidão e especificidade, seguindo as recomendações da legislação brasileira. O espectro de absorção entre 200 e 300 nm foi obtido para identificar o comprimento de onda de máxima absorção (202 nm). A linearidade foi avaliada pela regressão linear da curva analítica (8 a 28 µg/ mL). O método apresentou coeficientes de variação intra-corrida e inter-corrida inferiores a 1 e 5%, respectivamente. O percentual de recuperação obtido no método da adição de padrão foi próximo a 100 %, indicando a exatidão do método. A especificidade do método foi verificada na presença dos excipientes das cápsulas. Os resultados do doseamento das cápsulas apresentaram alto percentual de concordância (101,14 %) em comparação aos obtidos por método previamente validado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. As cápsulas analisadas pelo método proposto apresentaram uniformidade de conteúdo adequada. O método de análise validado no presente trabalho é uma inovação e aprimoramento das técnicas de doseamento do maleato de enalapril, podendo ser aplicada também para a quantificação deste fármaco em cápsulas.

**Palavras-chave:** Doseamento, Espectrofotometria Ultravioleta, Maleato de enalapril

### ABSTRACT

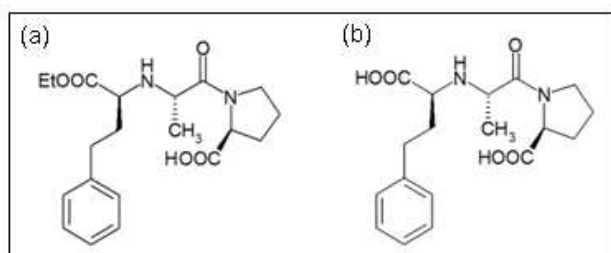
The aim of this work is to validate a simple method by ultraviolet absorption spectrophotometry for the determination of enalapril maleate, and also to assay this drug in capsules. The parameters evaluated were linearity, precision, accuracy and specificity, according with the brazilian law recommendation. The absorption spectrum between 200 and 300 nm was obtained to identify the wavelength of maximum absorption (202 nm). The linearity was evaluated by linear regression of the analytical curve (8 to 28 µg/ mL). The method showed intra and inter-run coefficients of variation of less than 1 and 5 %, respectively. The percentage of recovery obtained from the standard addition method was close to 100%, providing the accuracy of the method. The specificity was checked in the presence of the capsules excipients. The results from capsules assay presented high concordance percentage (101.14%) in comparison to those obtained from a previous validated method by high performance liquid chromatography. The capsules analyzed by the proposed method presented suitable content uniformity. The method of analysis validated in this work represents an innovation and improvement of quantitative analysis techniques for enalapril maleate and can also be applied to assay such drug in capsules.

**Keywords:** Analytical assay, Ultraviolet spectrophotometry, Enalapril maleate

\* **Contato:** Irene Cledes Külkamp, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, e-mail: irene@ufrgs.br

## INTRODUÇÃO

O presente trabalho propõe uma metodologia para o doseamento do enalapril, um pró-fármaco, inibidor da enzima conversora de angiotensina. O mesmo é comercialmente disponibilizado na forma de Maleato de Enalapril (CAS: 76095-16-4) e difere estruturalmente do enalaprilato pela presença de um grupo etoxicarbonil ao invés de um grupo carboxílico na posição 1 da 1-alanil-1-prolina, além da presença do sal maleato (Figura 1). Estas modificações estruturais resultam em aumento da absorção gastro-intestinal do maleato de enalapril comparado ao enalaprilato, que é fracamente absorvido pelo trato gastro-intestinal (Delgado, 1998; Silva, 2002).



**Figura 1. Estrutura química do maleato de enalapril (a) e enalaprilato (b)**

O fármaco possui monografia oficial nas Farmacopéias Americana, Britânica, Portuguesa e Brasileira. As Farmacopéias Britânica, e Portuguesa apresentam como método de doseamento para o fármaco a titulação potenciométrica em meio aquoso, enquanto que a Farmacopéia Americana indica a Cromatografia em Fase Líquida de Alta eficiência (CLAE). (Farmacopeia Portuguesa, 2003; USP, 2008; British Pharmacopoeia, 2008). A Farmacopéia Brasileira apresenta titulação potenciométrica e CLAE como métodos de doseamento (Farmacopeia Brasileira, 2010). Há diversos métodos descritos utilizando CLAE para determinação de maleato de enalapril isoladamente ou em formulações farmacêuticas (Al-Omari *et al.*, 2001; Stanis, 2003; Bhushan *et al.*, 2006; Bonazzi *et al.*, 2007).

Outras metodologias têm sido descritas para o doseamento do maleato de enalapril, como por exemplo, a polarografia de pulso diferencial (Elmali *et al.*, 2003) e eletroforese capilar (Hillaert & Bossche, 2001). Alguns trabalhos abordam o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos na região do ultravioleta (UV), por técnicas indiretas como reações de oxidação, pareamento iônico e formação de complexos colorimétricos com enalapril (Kato, 1985; Ayad *et al.*, 2002; Ayad *et al.*, 2003, Shama *et al.*, 2011). A espectrometria UV é descrita para a análise simultânea de enalapril e losartan em comprimidos (Thomas *et al.*, 2009), e a espectrofotometria UV derivada para determinação do maleato de enalapril matéria-prima e formas farmacêuticas (Bonazzi *et al.*, 2007), ou ainda em associação com outros fármacos (Walily *et al.*, 1995; Prasad *et al.*, 1999).

No entanto, não foi encontrada metodologia por espectrofotometria de absorção no UV de leitura direta

para a determinação isolada de maleato de enalapril como substância pura ou veiculada em cápsulas. Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar um método simples, exato e preciso para o doseamento do fármaco maleato de enalapril, com especificidade adequada para o doseamento de cápsulas por espectrofotometria de absorção no UV, apesar da baixa absorvidade molar do fármaco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais

O padrão de trabalho utilizado foi adquirido do fornecedor Galena<sup>®</sup> (Brasil) pertencente ao lote 20010405 e teor declarado igual a 99,80 %. A identidade do padrão de trabalho foi confirmada por análise no infravermelho e o teor foi confirmado por titulação potenciométrica (British Pharmacopoeia, 2007), por se tratar de metodologia absoluta que não necessita de substância de referência, e por CLAE.

A matéria-prima utilizada para os ensaios de doseamento e manipulação das cápsulas foi adquirida do fornecedor Galena<sup>®</sup> (Brasil) pertencente ao lote 5111-00-042-A e teor declarado igual a 99,60 %. As soluções foram preparadas com água destilada e reagente ácido clorídrico de grau analítico.

Foram preparadas 360 cápsulas contendo o equivalente a 20 mg de enalapril, na forma de maleato de enalapril, pelo método de encapsulação por preenchimento manual e nivelamento. Os excipientes utilizados e as respectivas quantidades foram: bicarbonato de sódio (5% p/p), lauril sulfato de sódio (1% p/p), estearato de magnésio (1% p/p), dióxido de silício coloidal (1% p/p) e lactose (82% p/p). A proporção do fármaco corresponde a 10% (p/p) da formulação. Esta mesma composição e proporção de excipientes foram empregadas na preparação do placebo utilizado nos ensaios de validação.

### Equipamentos

Foi utilizado um espectrofotômetro BOMEN HARTMANN & BRAUN, modelo MB-100, para as análises na região do infravermelho e um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV-1601PC, para realizar a varredura espectrofotométrica no intervalo de 300-200 nm. Todas as outras análises espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo lambda 10 UV/VIS. As análises por CLAE foram feitas em equipamento SHIMADZU, constituído de bomba LC-10AD VP e detector UV-Vis SPD-10AV VP, gerenciado pelo controlador SCL-10AVP, acoplado a um computador Mega Corp, e operado pelo programa Class-VP.

### Preparação das soluções padrão e obtenção do espectro de absorção no UV

Foi preparada uma solução estoque contendo 1 mg/ mL do padrão de trabalho em solução de ácido clorídrico 0,1 N. Esta solução estoque foi usada para preparação da

solução teste, na concentração de 20 µg/ mL, utilizando o mesmo veículo. Obteve-se o espectro de absorção na região do UV entre 300 e 200 nm da solução teste contendo 20 µg/ mL do fármaco para determinar o comprimento de onda no qual ocorre maior absorção.

### Validação do método

Foi determinada a linearidade, faixa, exatidão, precisão e especificidade do método. A partir da solução estoque foram feitas diluições para a construção de uma curva analítica na faixa de 8 a 28 µg/ mL (n = 11). A absorbância de cada ponto foi medida em três dias diferentes, em triplicata a cada dia, no comprimento de onda igual a 202 nm. A equação da reta foi determinada a partir da média das leituras dos três dias. A curva analítica foi usada para determinar o teor de maleato de enalapril.

Avaliou-se a linearidade pelos cálculos de regressão linear das três réplicas da curva analítica, pelo método dos mínimos quadrados. Os dados matemáticos obtidos da regressão linear foram utilizados para estimar o grau de linearidade. Os cálculos efetuados foram o coeficiente de correlação, a equação da reta com a respectiva inclinação e intersecção do eixo y. A faixa também foi um parâmetro determinado a partir do estudo da linearidade.

Para estimar a precisão foi avaliada a precisão intra-corrída e inter-corrída pelos parâmetros repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. A repetibilidade foi avaliada a partir de 6 determinações na concentração teste (20 µg/ mL). Para avaliar a precisão inter-corrída este ensaio foi repetido em triplicata, avaliando-se a precisão intermediária a partir do coeficiente de variação entre os três diferentes dias de análise.

A exatidão do método para o doseamento da matéria-prima foi analisada pelo percentual de recuperação obtido a partir de uma quantidade conhecida de padrão de trabalho adicionado à amostra de matéria-prima, utilizando-se três concentrações diferentes, com três determinações para cada uma. A partir de uma solução estoque com 100 µg/ mL de enalapril, foram feitas diluições em solução de ácido clorídrico 0,1 N, a fim de atingir concentração final 12 µg/ mL. De uma solução estoque contendo 100 µg/ mL de padrão de trabalho foram tomadas alíquotas e adicionadas às diluições contendo 12 µg/ mL de matéria-prima, a fim de obter concentrações finais 16, 20 e 24 µg/ mL.

A especificidade do método foi verificada pela comparação dos resultados obtidos no doseamento de amostras preparadas na concentração teste com a de amostras nas quais foi adicionado excipiente na quantidade equivalente ao presente em 1 cápsula. Foi realizada análise estatística dos dados por ANOVA e teste Tukey. A obtenção do espectro de absorção no ultravioleta (300 a 200 nm) do placebo também foi utilizada para avaliar a interferência dos excipientes na análise.

Os resultados do doseamento das cápsulas foram comparados aos obtidos por método previamente validado por CLAE: coluna Lichrospher RP-18 (5µm) de 125 x

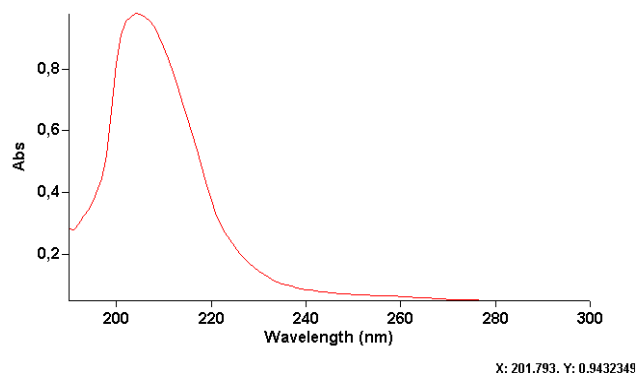
4mm. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/ água (20: 80) com pH ajustado pra 3,8 com ácido acético, com fluxo isocrático de 1mL/ min. A detecção foi feita em UV a 215nm.

### Aplicação do método para a determinação do teor de cápsulas

Foi determinada a uniformidade de conteúdo das cápsulas manipuladas a partir do método proposto e validado. Foi realizado o ensaio de uniformidade de conteúdo pela análise 10 unidades de cápsulas individualmente. Cada cápsula de concentração teórica igual a 20 mg foi submetida a sucessivas diluições em solução de HCl 0,1 N, obtendo concentração teórica final igual a 20 µg/ mL e quantificada em 202 nm. Estas determinações foram realizadas em triplicata e o teor de maleato de enalapril em cada cápsula calculado a partir da curva analítica.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fármaco maleato de enalapril apresenta absorvidade máxima na faixa de comprimento de onda no limite inferior do espectro UV. Para escolha do comprimento de onda onde seriam efetuadas as análises, foi obtido o espectro de absorção entre 200 e 300 nm na região do UV da solução teste. A solução apresentou máximo de absorção próximo ao comprimento de onda de 202 nm, conforme apresentado na Figura 2.



**Figura 2. Espectro de absorção (300-200 nm) na região do UV da solução teste de maleato de enalapril.**

Tanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) quanto o guia da *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005) para determinação quantitativa de fármacos preconizam que não há necessidade de avaliar todos os parâmetros de validação, sendo que a escolha dos métodos deve se basear na finalidade pretendida do método. Tendo em vista que o método proposto visa à determinação quantitativa de maleato de enalapril em matéria-prima e em cápsulas, foram propostos os parâmetros: linearidade, faixa exatidão,

precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e especificidade.

As curvas analíticas foram obtidas na faixa de 8 a 28 µg/mL (n=11), no comprimento de onda 202 nm. As concentrações e equivalentes absorvâncias médias, desvios padrão e coeficientes de variação obtidos nas curvas analíticas determinadas em três dias diferentes podem ser observadas na Tabela 1. Os coeficientes de variação inter-dia entre os pontos da curva de linearidade encontram-se abaixo de 5%, conforme preconizado (Brasil, 2003, Randau, 2005).

**Tabela 1. Dados da curva de calibração: absorvância média, desvio padrão e coeficiente de variação**

Concentração (µg/ mL)	Absorvância (média)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
8	0,320	0,0049	1,54
10	0,445	0,0091	2,06
12	0,536	0,0254	4,75
14	0,609	0,0102	1,67
16	0,722	0,0314	4,35
18	0,799	0,0323	4,04
20	0,889	0,0411	4,63
22	0,999	0,0466	4,66
24	1,134	0,0148	1,31
26	1,237	0,0148	1,20
28	1,304	0,0635	4,87

Cada valor é média de três determinações realizadas em dias diferentes.

A equação da reta resultante da regressão linear dos dados apresentou coeficiente angular igual a 26,51 e coeficiente linear igual a 0,037. O coeficiente linear próximo de zero é um critério adicional para certificar a linearidade do método. O coeficiente de correlação determinado foi de 0,99868 ( $r^2 = 0,99736$ ). A ANVISA preconiza um coeficiente de correlação mínimo de 0,99 para atestar a linearidade do método (Brasil, 2003).

A Tabela 2 apresenta o coeficiente de variação da determinação da concentração de soluções de maleato de enalapril na concentração de 20 µg/ mL realizadas em três dias diferentes e em sextuplicata a cada dia. As seis determinações realizadas a cada dia apresentaram coeficiente de variação inferior a 1 %, caracterizando boa precisão intra-corrida (repetibilidade). Da mesma forma, o coeficientes de variação entre as diferentes corridas foi de 0,92 %, caracterizando uma boa precisão intermediária do método. A precisão intra-corrida, também denominada repetibilidade, expressa a precisão dentro das mesmas condições operacionais no mesmo dia, enquanto que a precisão inter-corrida expressa a variação em diferentes condições, como por exemplo, variando-se os dias de análise. Estes valores estão em conformidade com o recomendado pela ANVISA, que não admite variação superior a 5 % (Brasil, 2003).

**Tabela 2. Análise da precisão**

Nível de precisão avaliado	Determinação média ± desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
intra-corrida (dia 1)	98,98 ± 0,79	0,79
intra-corrida (dia 2)	99,28 ± 0,93	0,94
intra-corrida (dia 3)	100,69 ± 0,61	0,61
inter-corrida	99,65 ± 0,91	0,92

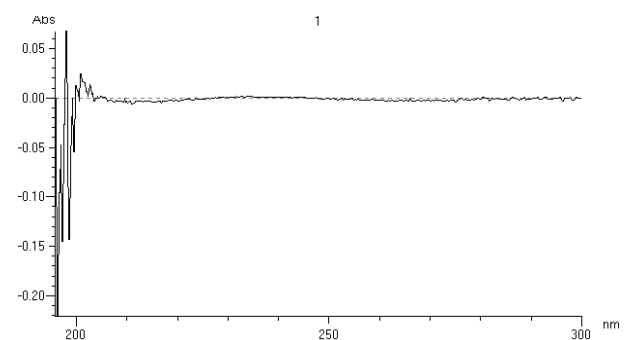
O percentual médio de recuperação, obtido no método da adição de padrão de trabalho, foi próximo a 100 %, conforme mostrado na Tabela 3, indicando proximidade com o valor verdadeiro e a exatidão do método (Brasil, 2003).

**Tabela 3. Teste de recuperação para maleato de enalapril obtido por espectrofotometria de absorção no UV**

Padrão adicionado (µg/ mL)	Padrão recuperado (%)	Coefficiente de variação (%)
4	105,66 ± 0,01	1,09
8	97,50 ± 0,03	3,15
12	97,76 ± 0,01	0,89
Média	100,29 ± 4,65	4,64

Cada valor representa a média de três determinações

O método de análise demonstrou especificidade na presença dos excipientes analisados, conforme pode ser observado na figura que apresenta o espectro de absorção dos excipientes (Figura 3). A análise dos resultados por ANOVA e teste Tukey demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras na ausência e na presença dos excipientes utilizados (Tabela 4).



**Figura 3. Espectro de absorção (200 – 300 nm) na região do UV da solução de placebo**

Adicionalmente, os resultados foram comparados aos obtidos por CLAE para o mesmo lote de cápsulas. O doseamento das cápsulas por CLAE apresentou um teor médio de 98,70 %, apresentando assim um percentual de concordância de 101,14 % com os resultados obtidos por espectrofotometria no ultravioleta (97,58 %, conforme demonstrado na Tabela 5). Ressalta-se, no entanto, que a

especificidade do método na presença de produtos de degradação e substâncias relacionadas não foi especificamente avaliada, tendo sido avaliada apenas a especificidade na presença dos excipientes. Destaca-se, também, que os coeficientes de variação relativamente elevados podem ter ocorrido devido ao comprimento de onda das análises, o qual é susceptível a variações, como por exemplo, interferência do solvente, tendo em vista a baixa especificidade de análise em comprimentos de onda mais baixos, visto que pode ocorrer a absorção de diferentes grupos funcionais nesta mesma região.

**Tabela 4. Teste de especificidade para maleato de enalapril na concentração teste, na presença dos excipientes das cápsulas\***

Enalapril (matéria-prima)	Enalapril (matéria-prima na presença de excipientes)	F – valor	P - valor
99,07 ± 0,94	99,61 ± 3,19	0,07611	0,79630

\*n = 3; p<0,01

As cápsulas analisadas pelo método proposto apresentaram boa uniformidade de conteúdo, conforme pode ser observado nos resultados da Tabela 5. Não há especificação farmacopéica para o teor de cápsulas de maleato de enalapril. No entanto, os resultados da determinação dos teores individuais de cada cápsula mantiveram-se dentro dos limites especificados pela Farmacopéia Americana para comprimidos de maleato de enalapril o qual é de 90 a 110 % do teor declarado (USP, 2005).

**Tabela 5. Determinação de uniformidade de conteúdo de cápsulas de maleato de enalapril**

Amostragem	Teor determinado por UV (%)	Teor determinado por CLAE (%)
1	105,90	100,11
2	99,70	96,36
3	99,50	96,45
4	93,40	98,93
5	98,05	98,66
6	95,85	100,26
7	99,05	97,74
8	97,20	98,44
9	91,20	97,19
10	95,95	102,81
Média ± desvio padrão	97,58% ± 3,99	98,70 ± 1,98

1 cápsula por análise

## CONCLUSÃO

O doseamento de maleato de enalapril por espectrofotometria de absorção no UV demonstrou linearidade na faixa determinada, bem como exatidão, precisão e especificidade, podendo ser aplicado de forma simples e rápida. Não foram encontradas técnicas de determinação isolada de maleato de enalapril como substância pura ou em cápsulas por espectrofotometria no UV direta. As técnicas anteriormente descritas utilizam complexos colorimétricos, derivação dos resultados ou ainda focam na determinação simultânea de enalapril e outros fármacos. Assim, a validação da técnica realizada no presente trabalho é uma inovação e aprimoramento das técnicas de doseamento para este fármaco, podendo ser aplicada também para o doseamento de cápsulas.

## REFERÊNCIAS

- Al-Omari MM, Abdelah MK, Badwan AA, Jaber AMY. Effect of the Drug-Matrix on the Stability of Enalapril Maleate Tablet Formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25: 893 - 902, 2001.
- Ayad MM, Shalaby A, Abdellatef HE, Hosny MM. Spectrophotometric and AAS determination of ramipril and enalapril through ternary complex formation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28(2): 311 - 21, 2002.
- Ayad MM, Shalaby A, Abdellatef HE, Hosny MM. Spectrophotometric methods for determination of enalapril and timolol in bulk and in drug formulations. *Anal. Bional. Chem.* 375(4): 556 - 60, 2003.
- Bonazzi D, Gotti R, Andrisano V, Cavrini V. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16(3): 431 - 38, 1997.
- Bhushan R, Gupta D, Singh SK. Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents. *Biomed. Chromatogr.* 20(2): 217-24, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n°899, de 29 de maio de 2003.
- British Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 2008.
- Delgado JN & Remers WA. Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 10. ed. Philadelphia: Lippincott- Raven publishers, 1998. 974 p.
- Elmali F, Alpdogan G, Aycan S, Sungur S. Differential pulse polarographic determination of enalapril maleate. *Turk. J. Chem.* 27(1): 65-9, 2003.
- Farmacopéia Brasileira 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa, 2010.
- Farmacopéia Portuguesa 7. ed. Lisboa: Imprensa Nacional-Casa da Moeda, 2003.

Hillaert S & Bossche WV. The quantitative determination of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme by CE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25(5-6): 775-83, 2001.

ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1). International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 2005.

Kato T. Flow-injection spectrophotometric determination of enalapril in pharmaceuticals with bromothymol blue. *Anal. Chim. Acta.* 175: 339-344, 1985.

Prasad CVN, Saha RN, Parimoo P. Simultaneous Determination of Amlodipine-Enalapril Maleate and Amlodipine-Lisinopril in Combined Tablet Preparations by Derivative Spectrophotometry. *Pharmacy and pharmacology communications* 5(6): 383 - 388, 1999.

Randau KP, Meira JL, Braga JMF, Monteiro DB, Neto PJR. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Anti-Retroviral Zidovudina (AZT)-Matéria-Prima. *Acta Farm. Bonaerense* 24(1): 104 - 108, 2005.

Shama SA, Amin AS, Omara H. Spectrophotometric microdetermination of some antihypertensive drugs in pure form and in pharmaceutical formulations. *J. Chil. Chem. Soc.* 56(1):566-570, 2011.

Silva, P. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374 p. Stanisz, B. Evaluation of stability of enalapril maleate in solid phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31: 375 - 380, 2003.

Thomas AB, Chaudhari AA, Nanda RK, Kothapalli LP, Chavan UB, Deshpande AD. Simultaneous determination of enalapril and losartan in pharmaceutical preparations by uv spectrophotometry and LC. *Chromatographia* 69(11-12):1485-1487, 2009.

USP, The United States Pharmacopeia. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

Walily AFME, Belal SF, Heaba EA, Kersh, AE. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13(7): 851-856, 1995.