



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Stoef, Paulo Roberto; Guzzi, Silvane; Carletto, Marla Suzane; da Silva Lobo, Viviane; da Rosa,
Maurício Ferreira

Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário

Acta Scientiarum. Technology, vol. 34, núm. 1, enero-marzo, 2012, pp. 89-95

Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226534013>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário

Paulo Roberto Stoef^{1*}, Silvane Guzzi¹, Marla Suzane Carletto¹, Viviane da Silva Lobo² e Maurício Ferreira da Rosa³

¹Indústria Farmacêutica Prati-Donaduzzi & Companhia Ltda., R. Mitsugoro Tanaka, 145, 85903-630, Toledo, Paraná, Brasil. ²Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. ³Grupo Interdisciplinar de Fotoquímica e Eletroquímica Ambiental, Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência: E-mail: pstoeff@yahoo.com.br

RESUMO. O objetivo deste artigo é caracterizar e qualificar um padrão secundário de diclofenaco de sódio como padrão de referência no controle de qualidade de medicamentos. A identidade do candidato foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho e sua pureza (99,63%) determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por comparação com padrão primário. A qualidade do padrão secundário também foi suportada por titulação redox em meio não-aquoso, espectroscopia na região do UV-visível.

Palavras-chave: espectroscopia de infravermelho, padrão de referência, CLAE.

Characterization and qualification of diclofenac sodium as a secondary standard

ABSTRACT. This paper aimed to characterize and qualify a secondary standard of diclofenac sodium as a reference standard in the quality control of medicines. The identity of the candidate was confirmed through infrared spectroscopy and the content (99.63%) determined by high performance liquid chromatography (HPLC) by comparing with the compendial primary standard. The quality of the secondary standard was also supported by redox titration in non-aqueous media, related substances and UV spectrum by HPLC.

Keywords: infrared spectroscopy, reference standard, HPLC.

Introdução

Vários procedimentos analíticos de produtos farmacêuticos dependem do uso de substâncias químicas de referência (SQR) para caracterização e/ou quantificação de suas propriedades, sendo fundamentais no controle de qualidade de medicamentos (BROWNE, 2009). Este deve ser devidamente documentado, a fim de estabelecer sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade nas quais os valores das propriedades são expressos (ISO, 2000).

De acordo com o *Food and Drug Administration* (FDA) uma substância química de referência é definida como um composto altamente purificado e amplamente caracterizado. Ainda de acordo com este órgão, os padrões podem ser farmacopeicos, dispensam análises quanto à sua qualidade e procedência, e não-farmacopeicos, substâncias que devem ser obtidas de fontes confiáveis e devidamente caracterizadas para garantir suas propriedades (FDA, 1994).

Padrões de referência podem ser certificados como padrões primários ou como padrões

secundários. O conteúdo de um padrão primário é determinado por intermédio de uma extensa série de análises físico-químicas e completa caracterização do candidato. Por sua vez, o conteúdo dos padrões secundários é determinado por cromatografia ou espectroscopia em comparação a um padrão de referência primário (MATHKAR et al., 2009).

O propósito de se estabelecer um padrão secundário é o seu uso durante análises de rotina na determinação de identidade, pureza e, em particular, o conteúdo ativo em preparações farmacêuticas (WHO, 1999). Desta forma, é fundamental que o padrão secundário apresente as mesmas propriedades do padrão primário, permitindo assim o seu uso como material de referência (COUNCIL OF EUROPE, 2008).

Segundo a RDC 17 de abril de 2010 (ANVISA, 2010), resolução que trata das boas práticas de fabricação, os procedimentos analíticos e quantitativos empregados para caracterizar um padrão de referência devem ser mais extensos dos que os utilizados para controlar a qualidade de medicamentos. Em contrapartida, a intensidade de

caracterização e análises realizadas para obtenção do padrão secundário é menor se comparado com a obtenção de um padrão de referência primário (COUNCIL OF EUROPE, 2008).

O diclofenaco de sódio (DS), 2-[(2,6-diclorofenil)amino]benzoacetato de sódio (Figura 1), está entre os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) mais utilizados no mundo. É uma fármaco instável em meio ácido, tendo seu uso limitado pela alta incidência de efeitos indesejáveis sobre o trato gastrointestinal (SANTOS et al., 2007).

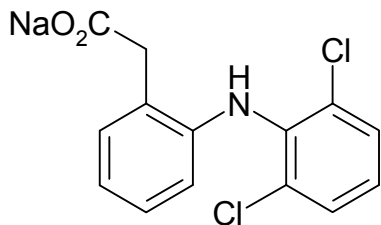


Figura 1. Estrutura química do diclofenaco de sódio.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e qualificar um padrão secundário de diclofenaco de sódio a ser utilizado como substância química de referência no controle de qualidade de medicamentos.

Material e métodos

Todas as análises foram conduzidas seguindo os métodos descritos pela Farmacopeia Brasileira 4ª edição (FB4). O número de repetições foi definido com base na precisão do método estabelecido durante a validação (WILLIAMS, 2006). Por se tratar de um método farmacopeico, seguiram-se as recomendações da legislação vigente na Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). Esta resolução define que a precisão intracorrída (repetibilidade) deve ser avaliada com no mínimo seis réplicas a 100% e a precisão intercorrída (precisão intermediária) deve ser avaliada em comparação dos resultados obtidos em dois dias diferentes. Ainda de acordo com esta resolução, a precisão é representada pelo DPR.

O candidato à padronização utilizado foi um lote comercial de matéria-prima de DS, adquirido do Laboratório Amoli Organics Pvt. Ltd., Índia, lote DS/1001/0023A. Previamente à padronização, o material selecionado foi aprovado nas análises descritas na monografia do DS presente na FB4. Para determinação do teor, utilizou-se padrão primário de DS, lote 2007, adquirido da Farmacopeia Brasileira e para análise de substâncias relacionadas foi utilizado padrão primário de 1-(2,6-diclorofenil)-1,3-dihidro-2H-

indol-2-ona, lote K0I100, adquirido da Farmacopeia Americana (USP).

Equipamentos

As análises cromatográficas foram conduzidas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu, modelo Prominence LC-20AT, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD). Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum 400. Para análise de perda por dessecação foi utilizado estufa a vácuo Tecnal, modelo TE 395. Na titulação de óxido-redução utilizou-se uma bureta digital Vitlab, modelo Continuous.

Identificação por espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros do padrão primário e candidato foram obtidos seguindo as recomendações do método geral da FB4 (V.2.14-4). As amostras dessecadas foram dispersas em KBr, sendo a faixa utilizada de 3800 a 650 cm^{-1} .

Doseamento por titulometria

Seguiu-se o método A de doseamento descrito na monografia do DS presente na FB4. Foram diluídos 0,25 g da amostra com 30 mL de ácido acético glacial e tituladas com HClO_4 0,1 mol L^{-1} . Seis réplicas foram analisadas em dois dias independentes.

Identificação e doseamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Seguindo o método B de doseamento descrito na monografia do DS na FB4, utilizou-se coluna de fase reversa C8 (Phenomenex Luna) de 150 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm , acopladas a uma pré-coluna (Phenomenex). Fase móvel tampão fosfato pH 2,5:metanol (30:70), Fluxo 1 mL min^{-1} , comprimento de onda 254 nm, temperatura ambiente, volume de injeção 50 μL . Amostras e padrão foram preparados na concentração de 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluídas com metanol:água (70:30). Seis réplicas foram analisadas em dois dias independentes. Os espectros UV foram obtidos utilizando a faixa de 190 a 350 nm.

Determinação de substâncias relacionadas por CLAE

Utilizando o mesmo sistema cromatográfico descrito para o doseamento, amostras na concentração de 0,75 mg mL^{-1} foram avaliadas seguindo o método farmacopeico em comparação ao padrão primário 1-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona. Seis réplicas foram analisadas em dois dias independentes.

Perda por dessecação

Foi empregado o método geral (V.2.9.) da FB4, que preconiza a dessecação de cerca de 1 g da amostra por 3h a 105°C em estufa.

Resultados e discussão

Na padronização, é importante estabelecer qual será o uso do padrão secundário como material de referência. Desta forma, dependendo do seu uso, serão definidos os procedimentos para caracterização e qualificação do candidato. Por exemplo, padrões utilizados na quantificação passam por testes mais exaustivos do que padrões utilizados em análises semiquantitativas ou qualitativas (MATHKAR et al., 2009).

A fim de se estabelecer a qualidade do material candidato à padronização, o mesmo foi submetido aos ensaios descritos na monografia do Diclofenaco

de Sódio, presente na FB4. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos, estando todos de acordo com as especificações.

Caso o candidato seja um composto o qual sua estrutura já tenha sido satisfatoriamente definida, a comparação por espectro de IV frente a um padrão de referência primário é suficiente para atestar a sua identidade (WHO, 1999). Desta forma, a espectroscopia de IV é a técnica mais comumente usada na identificação de padrões de referência (CULBERT; JOHNSON, 2003).

As Figuras 2 e 3, a seguir, apresentam os espectros de IV do padrão primário e candidato a padrão secundário. Comparando os espectros é possível verificar que as bandas máximas de absorção estão nos mesmos comprimentos de onda e apresentam as mesmas intensidades, confirmando a identidade do candidato.

Tabela 1. Especificações e resultados das análises, seguindo os ensaios descritos na monografia do DS, presente na Farmacopeia Brasileira 4ª edição.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Caracteres físicos	Pó cristalino, branco a levemente amarelado, pouco higroscópico	Confere
Solubilidade	Levemente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em etanol, ligeiramente solúvel em ácido acético glacial, pouco solúvel em acetona, praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e tolueno	Confere
Faixa de fusão (V.2.2)	Aproximadamente 280°C, com decomposição	278 a 279°C
Identificação	Espectro de absorção no infravermelho (V.2.14-4)	Confere
	O tempo de retenção do pico principal obtido com a solução amostra corresponde àquele do pico principal da solução padrão	Confere
	Produz-se coloração vermelha	Confere
	A solução responde às reações do íon sódio (V.3.1.1-5)	Confere
Aspecto da solução	A solução não é menos límpida do que o branco	Confere
pH (V.2.19)	6,5 a 8,5	7,5
Substâncias relacionadas	Impureza Individual $\leq 0,2\%$	0,015%
	Impurezas Totais $\leq 0,5\%$	0,035%
Absorção de Luz	Absorvância em 440 nm é, no máximo, 0,05	0,04
Metais pesados (V.3.2.3)	No máximo 0,001% (10 ppm)	<10 ppm
Perda por dessecação (V.2.9)	No máximo 0,5%	0,22%
Doseamento	99,0 a 101,0% (em relação à substância dessecada)	99,85%

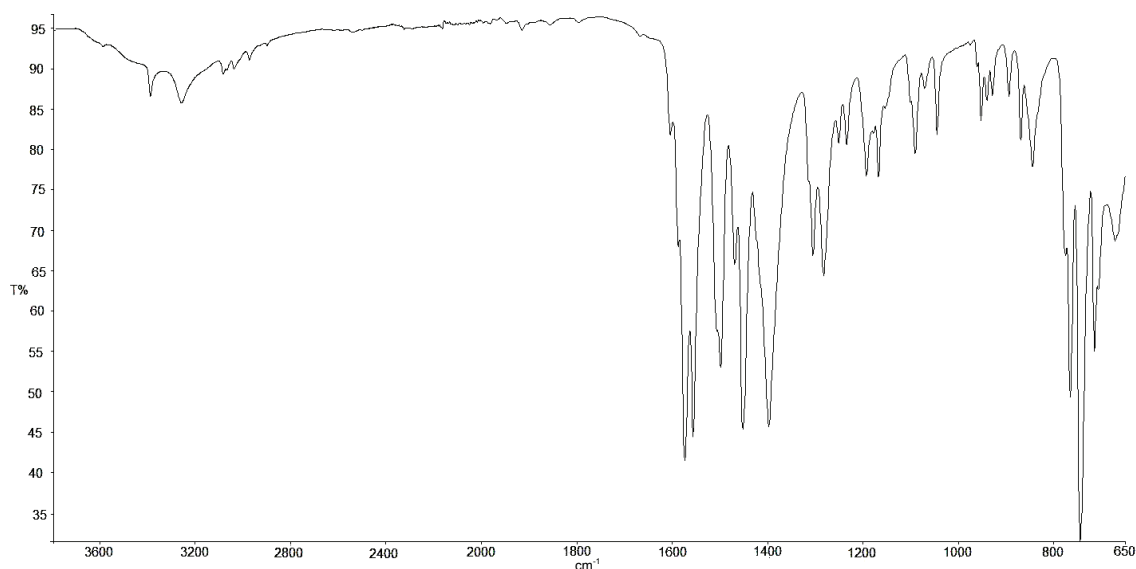


Figura 2. Espectro de IV do padrão primário de DS.

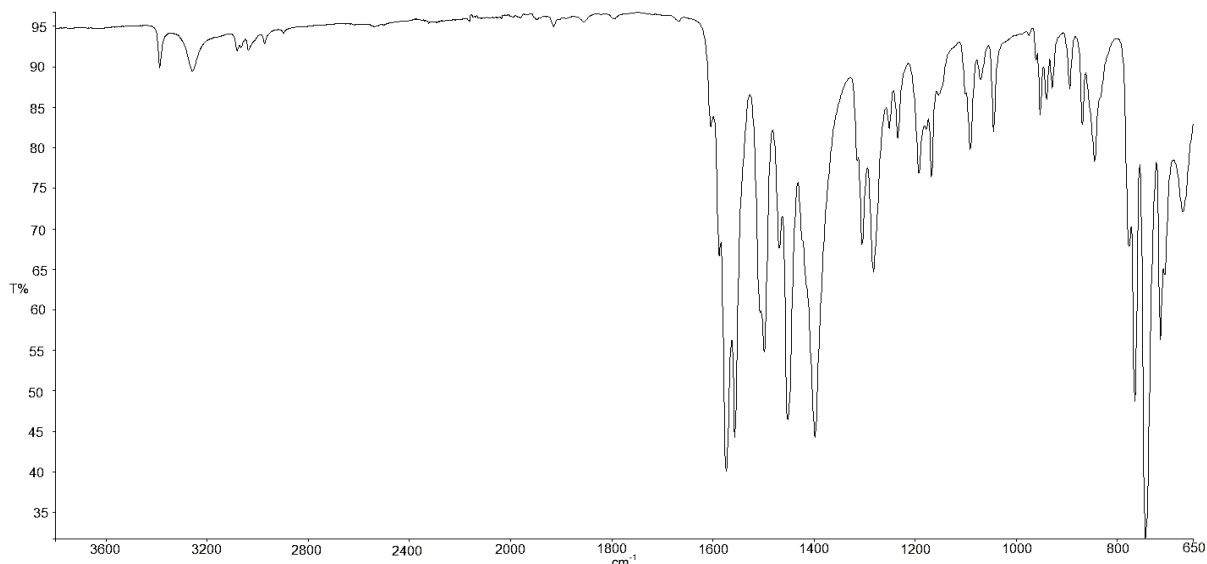


Figura 3. Espectro de IV do candidato a padrão secundário.

A Farmacopeia Brasileira também descreve a identificação por cromatografia, seguindo o método de doseamento. Nesse caso, o tempo de retenção (t_R) do pico principal obtido no cromatograma da solução amostra deve ser o mesmo do padrão.

O t_R fornece um forte indício da identidade do composto, entretanto, sozinho não constitui um método definitivo (USP, 2008b). O detector de arranjo de diodos permite a obtenção em tempo real do espectro UV de cada pico do cromatograma, o que fornece uma informação mais segura para atestar a identidade de compostos por cromatografia UV-Vis (ZHOU, 2005). A Figura 4 apresenta os espectros UV (de 190 a 350 nm) do padrão primário e candidato. A semelhança dos espectros UV indicam se tratar da mesma substância.

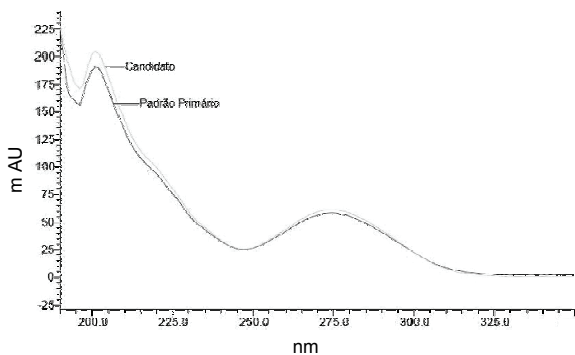


Figura 4. Espectros UV sobrepostos do pico do padrão primário de DS e candidato.

O perfil espectral também é útil na determinação da pureza do pico, ou seja, permite avaliar se não há outro composto coeluinto junto à substância de interesse. Para isto, compara-se o espectro obtido em diferentes tempos de eluição do pico (geralmente

porção anterior, mediana e posterior) (ZHOU, 2005). A Figura 5 apresenta os espectros obtidos em três diferentes porções de eluição do pico. A semelhança dos espectros permite verificar a homogeneidade espectral do pico.

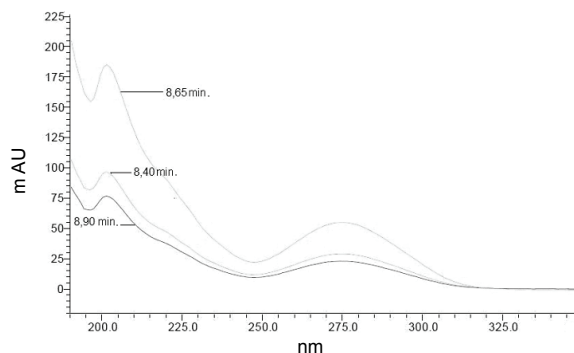


Figura 5. Espectros UV de diferentes tempos de eluição do candidato.

A determinação do teor é o parâmetro mais importante nos padrões de referência utilizados para análises quantitativas. Sempre que possível, o teor do padrão secundário deve ser estabelecido em comparação a um padrão primário farmacopeico (COUNCIL OF EUROPE, 2008; WHO, 1999). No entanto, havendo inexistência de padrão farmacopeico, pode-se utilizar um padrão de trabalho, desde que obtido de uma fonte confiável e devidamente caracterizado (ANVISA, 2010).

Para determinação do teor, seguiram-se os dois métodos descritos pela FB4. O método A descreve um método de titulação de óxido-redução em fase não aquosa. Já o método B descreve um método seletivo por CLAE. Os resultados estão expressos na Tabela 2.

A titulometria é um método absoluto, pois não depende do uso de padrões de referência na determinação do teor. Apesar de ser um método preciso, não apresenta uma boa exatidão uma vez que a não-especificidade desta análise é evidente. Na maioria dos casos, as impurezas orgânicas apresentam os mesmos grupos funcionais em que o método se baseia (GÖRÖG, 2005).

Por ser um método que dispensa o uso de padrões de referência, a titulometria não pode ser utilizada na determinação do teor de padrões secundários, no entanto esta técnica tem sua valia na confirmação da qualidade do material a ser padronizado.

A análise por CLAE, quando devidamente validada, apresenta seletividade suficiente para obtenção de uma boa exatidão. No entanto, o método cromatográfico apresenta uma precisão limitada. Segundo Görög (2008), o desvio-padrão relativo (DPR) de uma análise típica de CLAE é de 0,5 a 1%. Uma forma de melhorar a precisão das análises cromatográficas está em aumentar o número de amostras a serem analisadas (HOFER et al., 2007). A repetição das análises em dias diferentes também é útil para aumentar a confiabilidade dos resultados (SOARES, 2001).

Tabela 2. Teores obtidos nas análises de doseamento dos dois métodos utilizados e substâncias relacionadas.

Amostra	Doseamento por Titulometria	Doseamento por CLAE	Substâncias relacionadas
Data Análise	8/8/2010	5/8/2010	5/8/2010
1	100,4	100,29	0,035
2	99,84	98,58	0,034
3	99,36	100,09	0,032
4	100	98,99	0,032
5	99,64	99,54	0,032
6	99,52	99,5	0,032
Média	99,79	99,5	0,033
DPR (%)	0,37	0,65	4,05
Data Análise	10/8/2010	15/8/2010	15/8/2010
7	100,19	99,32	0,037
8	99,34	100,21	0,035
9	99,39	100,28	0,037
10	99,22	99,86	0,036
11	99,63	99,69	0,038
12	100,17	99,19	0,036
Média	99,66	99,76	0,037
DPR (%)	0,43	0,45	2,87
Média Total	99,73	99,63	0,035
DPR (%)	0,39	0,55	3,47

Na padronização, o teor do candidato frente ao padrão primário por CLAE foi de 99,63% sendo o DPR de 0,55%. Já o teor obtido por titulação foi de 99,73%, e o DPR de 0,39%. Analisando os valores de DPR, pode-se verificar que os resultados encontram-se dentro do descrito pela literatura, atestando a maior precisão do método titulométrico. Contudo, os teores obtidos nos diferentes métodos

não diferem muito entre si, isto pode ser explicado pelo baixo teor de impurezas orgânicas presentes no material candidato (0,035%). Os valores expressos estão em matéria ativa, ou tal qual, onde não é desconsiderada a presença de umidade.

Padrões expressos em matéria ativa são preferenciais, pois dispensam qualquer tratamento prévio à sua utilização. No entanto, é preciso verificar se os valores de umidade continuam constantes durante o período de utilização. Padrões higroscópicos devem ser dessecados antes da sua utilização, e no caso de a substância ser instável a temperaturas altas, deve se fazer a correção do teor em base anidra após determinação da umidade (perda por dessecação ou teor de água) em outra porção do material no momento da utilização (USP, 2008a).

Como apresentado na Tabela 1, o teor da matéria-prima deve estar entre 99,0 a 101,0 em relação à substância dessecada. Para determinar o teor em base anidra, deve-se utilizar a seguinte fórmula:

$$BA\% = \frac{MA\% \times 100}{100 - U\%}$$

em que:

BA representa o resultado em base anidra, MA é a matéria ativa determinada no doseamento e U(%) é a umidade que foi determinada por perda por dessecação. O teor obtido em BA do candidato em comparação ao padrão primário foi de 99,85%.

O teor de impurezas totais foi de 0,035%, estando dentro do limite especificado de 0,5%. A determinação de impurezas é útil na verificação da qualidade da substância candidata à padronização, pois traz informações quanto à presença de outras substâncias orgânicas além do composto de interesse e, principalmente, a respeito da estabilidade durante o armazenamento.

Não há uma forma segura de se determinar previamente a validade dos padrões de referência. Assim, a avaliação da estabilidade dos padrões durante o período de sua utilização é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados.

Os órgãos farmacopeicos possuem uma abordagem singular a respeito da validade dos padrões primários, como regra, a validade dos padrões é determinada apenas após a disponibilização de um novo lote aprovado (COUNCIL OF EUROPE, 2008; USP, 2008a; WILLIAMS, 2006). Isto significa que os padrões anteriores precisam ser substituídos pelo novo lote vigente.

German et al. (2010) obtiveram resultados satisfatórios após avaliar a estabilidade de quatro

padrões primários (Oxitetraciclina, Doxiciclina, Colistina e Espiramicina) após longo período de armazenamento (27 a 54 anos). Os autores também questionam o prazo curto para substituição dos padrões após a introdução de um novo lote pelas farmacopeias.

Uma forma de avaliar a estabilidade é por intermédio de retestes durante o período de utilização do padrão (WHO, 1999). Geralmente, os fatores avaliados vão depender das características da substância, como higroscopicidade, estabilidade e armazenamento (COUNCIL OF EUROPE, 2008).

O acondicionamento e armazenamento do candidato foi definido com base nas recomendações presentes no certificado que acompanha o padrão primário: frasco fechado, protegido da luz e mantido em dessecador a 25°C.

Estas recomendações conferem maior estabilidade ao material armazenado, uma vez que dentre as principais causas de degradação do diclofenaco estão: ciclização indolinônica, fotodegradação e oxidação (MÜLLER et al., 2004).

Não há uma regra para se estabelecer os limites de aceitação entre os resultados obtidos no reteste com o valor declarado na padronização (WHO, 1999), no entanto, em artigo publicado pelo Project Team 4, grupo vinculado à Farmacopeia Americana (WILLIAMS, 2006), os autores sugerem que o padrão seja substituído, ou repadronizado caso haja alteração de 0,5% de conteúdo para substâncias com pureza superior a 98%, ou 1% para substâncias com pureza inferior a 98%.

Conclusão

As técnicas de análises adotadas para a caracterização e qualificação do padrão secundário de DS permitiram-no classificar como apto a ser utilizado no controle de qualidade de medicamentos, pois atende às recomendações da legislação vigente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Indústria Farmacêutica Prati-Donaduzzi pela disponibilização dos equipamentos e materiais utilizados neste trabalho.

Referências

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Anexo da Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003.

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução RDC nº 17**, de 16 de abril de 2010.

BROWNE, D. C. Reference-standard material qualification. **Pharmaceutical Technology**, v. 33, n. 4, p. 66-73, 2009.

COUNCIL OF EUROPE. **The European Pharmacopoeia**, General Text 5.12. 5th ed. Strasbourg, 2008.

CULBERT, P. A.; JOHNSON, B. D. Reference standards. In: AHUJA, S.; ALSANTE, K. M. (Ed.). **Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals**. San Diego: Academic Press, 2003.

FDA-Food and Drug Administration, **Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods**. Rockville, 1994.

GÖRÖG, S. The sacred cow: the questionable role of assay methods in characterizing the quality of bulk pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 931-937, 2005.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 247-253, 2008.

GERMAN, R.; BUKOWSKA, B.; PAJCHEL, G.; GRZYBOWSKA, W.; TYSKI, S. Extremely long time stability of selected antibiotic standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 758-763, 2010.

HOFER, J. D.; OLSEN, B. A.; RICKARD, E. C. Is HPLC assay for drug substance a useful quality control attribute? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 4, p. 906-913, 2007.

ISO-International Organization for Standardization, **Guide 34. General requirements for the competence of reference material producers**. 2. ed. Geneva: ISO Press, 2000.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, D.; MIN, D.; MARKOVICH, A.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 627-631, 2009.

MÜLLER, C. R.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 555-560, 2004.

SANTOS, L.; GUTERRES, S. S.; BERGOLD, A. M. Preparação e avaliação de cápsulas gastro-resistentes de diclofenaco de sódio. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 355-361, 2007.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

USP-United States Pharmacopeial Convention. **General Chapter, 11**. Reference Standards. 31-NF 26. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc., 2008a.

USP-United States Pharmacopeial Convention. **General Chapter, 621**. Chromatography. 31-NF 26. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc., 2008b.

WHO-World Health Organization. **General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical references substances**. WHO Technical Reports Series, n. 885, Part A, 5. Geneva: World Health Organization, 1999.

WILLIAMS, R. L. Official USP Reference Standards Metrology concepts, overview and scientific issues and opportunities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 1, p. 3-15, 2006.

ZHOU, L. Z. Application of LC-NMR in Pharmaceutical Analysis. In: AHUJA, S.; DONG, M. W. (Ed.).

Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. San Diego: Academic Press, 2005.

Received on November 8, 2010.

Accepted on January 26, 2011.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.