

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO NA REGIÃO DO UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE FAMOTIDINA EM CÁPSULAS

Lívia Botacini Favoretto, Juliana Maria Oliveira Souza, Rudy Bonfilio*, Roberta de Cássia Pimentel Azevedo e Magali Benjamim de Araújo

Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

Recebido em 21/10/09; aceito em 22/3/10; publicado na web em 18/6/10

VALIDATION OF AN UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR QUANTIFICATION OF FAMOTIDINE IN CAPSULES.
This work describes the validation of a method for quantification of famotidine in capsules by UV spectrophotometry using as solvents buffer solution at pH 2.5 and buffer solution at pH 4.5. The results show that the method is practical, selective, accurate, precise and linear from 10.0 to 25.0 µg/mL of famotidine in both solvents. However, a variance analysis showed a lower mean percentage of famotidine when buffer at pH 2.5 is used. This effect was attributed to the instability of famotidine in acidic media. Therefore, the use of pH 4.5 buffer was considered suitable for analysis of famotidine in capsules.

Keywords: famotidine; validation; UV spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

A famotidina (Figura 1) é um antagonista competitivo do receptor H_2 da histamina. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da secreção ácida gástrica, evitando que o seu excesso possa causar dor e mal estar. Este fármaco é utilizado no tratamento de úlceras pépticas e da hiperacidez gástrica.¹⁻³ Os bloqueadores dos receptores H_2 , como a famotidina, reduzem eficazmente a secreção ácida gástrica estimulada por alimentos, pentagastrina, insulina, cafeína ou histamina. Esta diminuição está relacionada com a redução tanto do conteúdo gástrico, quanto do volume do suco gástrico, e ocorre em indivíduos sadios e com úlceras pépticas. A famotidina é bem absorvida por via oral e atinge níveis terapêuticos em cerca de 1 h. É eliminada principalmente por via renal, sendo também excretada no leite materno.^{1,4} São raros os efeitos indesejados e, em geral, são revertidos com a interrupção do tratamento.² Pode ter sua ação diminuída por antiácidos e sucralfato, porém pode diminuir a ação do cetoconazol e itraconazol. Também pode sofrer ou provocar aumento das reações adversas com depressores da medula óssea.⁵

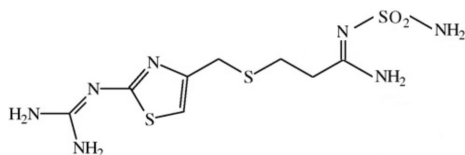


Figura 1. Estrutura química da famotidina

Na literatura encontram-se inúmeros trabalhos referentes à determinação de famotidina em formulações farmacêuticas. Dentre os métodos descritos estão a eletroforese capilar com detecção no UV,⁶⁻⁹ potenciometria,¹⁰ voltametria,¹¹ espectrofotometria,¹²⁻¹⁷ cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)¹⁸⁻³¹ e análise por injeção em fluxo.³²⁻³⁴

As Farmacopeias Brasileira e Americana registram a monografia para famotidina na forma farmacêutica comprimido com quantificação por CLAE.^{35,36} No entanto, para identificação do fármaco é utilizada a varredura espectral com solução de tampão fosfato pH 2,5,³⁵ e, ainda, no ensaio de dissolução para comprimidos a quanti-

dade de fármaco liberado da forma farmacêutica é quantificada por espectrofotometria utilizando-se solução de tampão fosfato pH 4,5.³⁶

A forma farmacêutica cápsulas contendo famotidina não se encontra inscrita, até o presente momento, em compêndios oficiais e, dentre os medicamentos manipulados em farmácias, este fármaco tem se destacado para o atendimento de pacientes com transtornos gástricos. Tendo em vista o grande número de métodos espectrofotométricos utilizados na rotina de laboratórios de controle de qualidade devido à facilidade, economia e rapidez dessa técnica, o presente trabalho teve por objetivo validar um método analítico por espectrofotometria no UV para quantificação de cápsulas de famotidina 40 mg, visando a aplicação em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Produtos farmacêuticos, padrão de referência e reagentes

Cápsulas de famotidina 40 mg foram adquiridas de três farmácias de manipulação e codificadas como amostras A, B e C, respectivamente. A amostra A contém como excipientes amido 99% e aerosil 1%. A amostra B contém os excipientes hidroxipropilmetilcelulose PA 10%, aerosil 1%, celulose microcristalina 20%, estearato de magnésio 1% e amido (quantidade suficiente para uma cápsula). A amostra C contém os excipientes celulose microcristalina 30%, aerosil 1% e amido (quantidade suficiente para uma cápsula).

A famotidina Galena (Brasil), lote FTE0280404, validade em 03/09, foi utilizada como padrão de referência, apresentando teor declarado de 99,8%.

Os reagentes empregados foram grau analítico (P.A.) e adquiridos da Vetec[®], (Brasil): acetato de sódio tri-hidratado; ácido acético glacial; ácido clorídrico; ácido fosfórico; fosfato de potássio monobásico; hidróxido de sódio e trietilamina. Os solventes metanol e acetonitrila foram grau UV/HPLC (Vetec[®], Brasil).

Equipamentos

Para execução dos ensaios foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu[®] (Japão), modelo UV-1601 PC; balança analítica modelo 410 (Kern[®], Alemanha); medidor de pH modelo PA 200 (Marconi[®], Brasil); banho ultrassônico modelo

*e-mail: rudybonfilio@yahoo.com.br

USC 2800A (Unique®, Brasil); sistema de purificação de água TKA modelo LAB-UPW (Carl Zeiss Jena®, Alemanha); sistema de filtração a vácuo (Millipore®, Brasil) e membrana PTFE de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro (Millipore®, Brasil).

Método

Espectro de absorção

Varreduras espectrais, nas faixas de absorção entre 400 e 200 nm, foram realizadas para identificação do pico de máxima absorção da famotidina, a partir de soluções estoque de famotidina padrão, utilizando-se como solventes soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente, nas concentrações finais de 25 µg/mL.

Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com especificações da literatura,³⁷ da RE nº 899 de 29/5/2003³⁸ e do ICH.³⁹

Linearidade

Para construção da curva analítica, preparou-se solução do padrão, na concentração de 250 µg/mL, dissolvendo-se a famotidina em soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente. Alíquotas de 1,0; 1,3; 1,8; 2,2 e 2,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 13,0; 18,0; 22,0 e 25,0 µg/mL. Foram preparadas 5 réplicas de cada concentração, para cada condição de pH, procedendo-se às leituras das soluções em espectrofotômetro a 265 nm. A curva analítica foi construída correlacionando-se os valores médios das absorvâncias em função da concentração.

Seletividade

Foram preparadas soluções do padrão, da forma farmacêutica cápsulas (amostras A, B e C) e dos excipientes (amostras A, B e C) nas concentrações finais de 18,0 µg/mL de famotidina, utilizando-se soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente, como solventes. Foram realizadas varreduras espectrais (400-200 nm) do padrão, das amostras e dos excipientes.

Precisão

A precisão do método foi avaliada aos níveis de repetibilidade e de precisão intermediária. Na repetibilidade prepararam-se 12 réplicas das soluções de famotidina padrão para cada pH das soluções de tampão fosfato (2,5 e 4,5) nas concentrações finais de 18,0 µg/mL. Procederam-se às leituras das soluções em espectrofotômetro a 265 nm, registrando-se os valores das absorvâncias e efetuando-se o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo entre as determinações. A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as leituras de uma mesma concentração realizadas por analistas diferentes em dias diferentes. Foram preparadas 6 réplicas de soluções de famotidina padrão, em cada dia, utilizando-se soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente, nas concentrações finais de 18 µg/mL. Procederam-se às leituras das soluções em espectrofotômetro a 265 nm, registrando-se os valores das absorvâncias e efetuando-se o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo das determinações.

Exatidão

A exatidão do método de análise foi determinada pelo teste de adição e recuperação, onde soluções da famotidina padrão e da forma farmacêutica cápsulas (amostras A, B e C) com concentrações finais de 250 µg/mL foram preparadas, utilizando-se soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente. Alíquotas de 1,0 mL das soluções das amostras a 250 µg/mL foram transferidas para 9 balões volumétricos de 25,0 mL. Posteriormente, foram adicionados em

triplicata 0,3; 0,8 e 1,2 mL da solução contendo o padrão a 250 µg/mL. Dessa forma, foram obtidos adicionados contendo amostras na concentração final de 10 µg/mL e padrões nas concentrações de 3,0 (23,1% de padrão); 8,0 (44,4% de padrão) e 12,0 µg/mL (54,5% de padrão). Portanto, a exatidão foi verificada contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas cada. Os valores de recuperação, expressos em porcentagem, foram determinados a partir das respostas analíticas obtidas com os adicionados em função da quantidade teórica de padrão adicionado.

Limite de detecção (LD)

O limite de detecção das amostras (A, B e C), sob as condições experimentais estabelecidas, foi determinado efetuando-se 20 leituras correspondentes ao branco (soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5). A estimativa do limite de detecção foi determinada através da seguinte equação:

$$LD = (DP \times 3)/IC$$

em que DP é o desvio padrão relativo entre as leituras do branco e IC é a inclinação da curva analítica.

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação das amostras (A, B e C) foi estabelecido a partir de 20 leituras do branco (soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5). A estimativa do limite de quantificação foi determinada através da seguinte equação:

$$LQ = (DP \times 10)/IC$$

em que DP é o desvio padrão relativo entre as leituras do branco e IC é a inclinação da curva analítica.

Aplicação do método às amostras de cápsulas

Determinação de peso médio

Para determinação do peso médio das cápsulas das amostras das farmácias A, B e C, respectivamente, seguiu-se o método descrito na Farmacopeia Brasileira,³⁵ pesando-se individualmente 20 cápsulas, removendo-se o conteúdo de cada uma e pesando-as novamente. O peso médio foi calculado pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e a vazia.

Doseamento das amostras

A partir do peso médio das amostras A, B e C, respectivamente, foram preparadas soluções previamente filtradas, em quintuplicata de cada amostra e do padrão, em triplicata, em soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente, nas concentrações finais de 18 µg/mL. As soluções foram analisadas por espectrofotometria. Os valores de famotidina em cada amostra foram expressos em porcentagem da quantidade declarada e foram obtidos através da divisão da média das respostas das amostras (n=5) pela média das respostas do padrão (n=3), multiplicado pelo valor declarado do padrão (99,8%).

Uniformidade de conteúdo das amostras

O conteúdo de 10 cápsulas de cada amostra (A, B e C) foi transferido individualmente para balões volumétricos de 100 mL, utilizando-se soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente. Alíquotas de 2,25 mL das amostras, previamente filtradas, foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 18 µg/mL. Foram preparadas soluções padrão em triplicata, na concentração final de 18 µg/mL.

As soluções foram analisadas por espectrofotometria. Os valores de famotidina em cada cápsula foram expressos em porcentagem da quantidade declarada e foram obtidos através da divisão da resposta de cada cápsula pela média das respostas do padrão (n=3), multiplicado pelo valor declarado do padrão (99,8%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na monografia da 4ª ed. da Farmacopeia Brasileira, para a forma farmacêutica comprimido,³⁵ é descrito um ensaio para identificação de famotidina por espectrofotometria no UV, utilizando-se solução de tampão fosfato pH 2,5 como solvente. Na monografia da 30ª ed. da Farmacopeia Americana, o ensaio de dissolução com quantificação por espectrofotometria é descrito utilizando-se como solvente uma solução de tampão fosfato pH 4,5.³⁶ Varreduras espectrais entre 400 e 200 nm foram realizadas para identificação do pico de máxima absorvância da famotidina, a partir de soluções padrão, utilizando-se como solventes soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente, nas concentrações finais de 25 µg/mL, comprovando um máximo de absorção do fármaco no comprimento de onda relatado ($\lambda = 265$ nm).

Foram construídas curvas analíticas para famotidina, utilizando-se como solventes soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, respectivamente. Os resultados foram avaliados por meio da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, em que a equação obtida, quando da utilização de solução de tampão fosfato pH 2,5, foi $y = 0,0307x + 0,0164$ e o coeficiente de correlação linear, r, igual a 0,9998. Quando da utilização de solução de tampão fosfato pH 4,5 a equação obtida foi $y = 0,0308x + 0,0109$ e seu coeficiente de correlação linear, r, igual a 0,9999, com estimativa de desvio padrão relativo entre as determinações inferior a 2%, em ambos os valores de pH, demonstrando haver correlação linear entre as concentrações de famotidina e as absorvâncias lidas.^{38,39}

Os excipientes presentes nas formulações das amostras A, B e C, respectivamente, não apresentaram interferência na quantificação da famotidina, visto que não absorveram significativamente na região espectral próxima a 265 nm, com os solventes utilizados, mostrando a seletividade do método (Figuras 2 a 7).

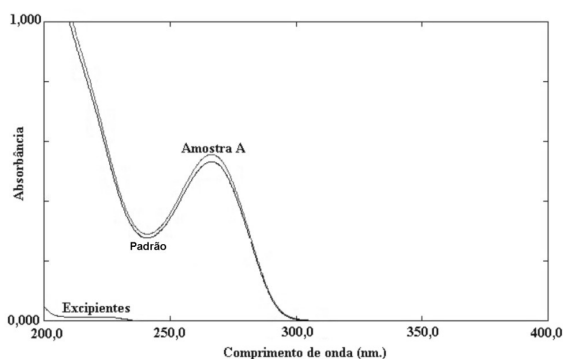


Figura 2. Varredura espectral da amostra A, excipiente A e padrão, em solução tampão fosfato pH 2,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

A precisão do método, sob as condições previamente fixadas (Tabelas 1 e 2), foi determinada pela estimativa do desvio padrão relativo. Os valores médios das estimativas de desvio padrão relativo foram de 0,74% (repetibilidade) e 0,80% (intermediária) quando da utilização de solução tampão pH 2,5 como solvente e de 0,35% (repetibilidade) e 0,43% (intermediária) quando utilizada solução tampão pH 4,5 como solvente. São aceitáveis valores de desvio padrão relativo igual ou abaixo de 5%.³⁷ Além disso, a precisão pôde ser confirmada nos ensaios de exatidão demonstrados nas Tabelas 1 e 2 e no ensaio de

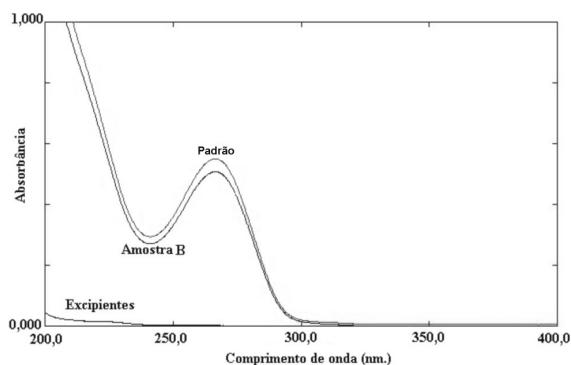


Figura 3. Varredura espectral da amostra B, excipiente B e padrão, em solução tampão fosfato pH 2,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

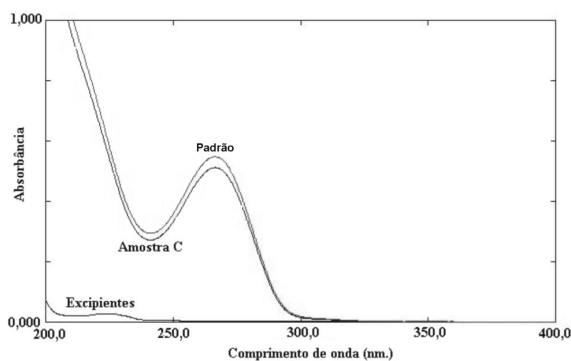


Figura 4. Varredura espectral da amostra C, excipiente C e padrão, em solução tampão fosfato pH 2,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

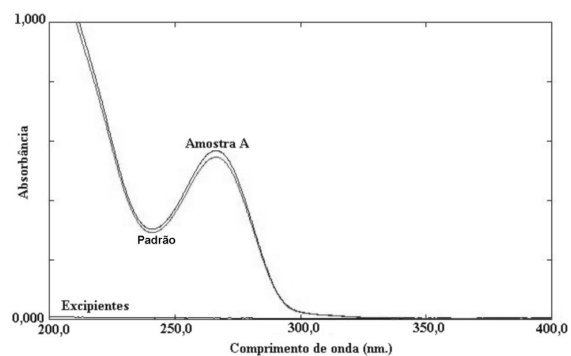


Figura 5. Varredura espectral da amostra A, excipiente A e padrão, em solução tampão fosfato pH 4,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

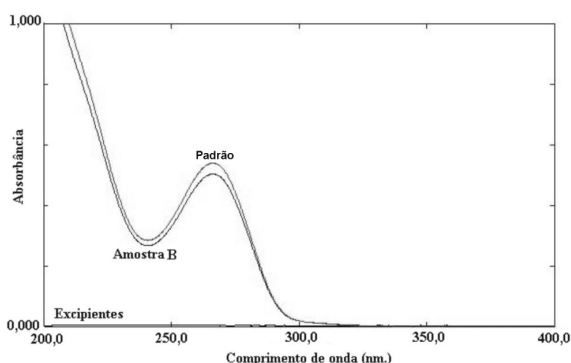


Figura 6. Varredura espectral da amostra B, excipiente B e padrão, em solução tampão fosfato pH 4,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

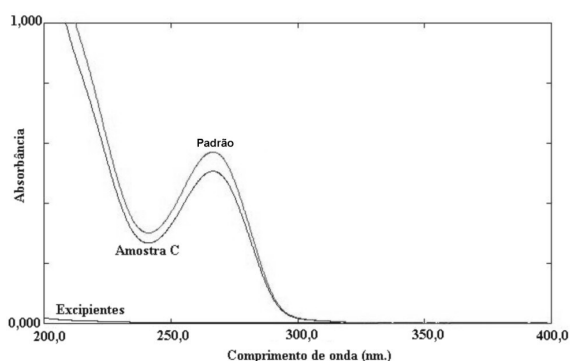


Figura 7. Varredura espectral da amostra C, excipiente C e padrão, em solução tampão fosfato pH 4,5 nas concentrações finais de 18 µg/mL

doseamento demonstrado na Tabela 3, onde as estimativas de desvio padrão relativo entre as leituras dos adicionados e das amostras foram inferiores a 5% em todos os casos.

O método espectrofotométrico desenvolvido demonstrou boa exatidão, que foi constatada pelo teste de recuperação. Valores médios entre 98,0 e 102,0% para as amostras A, B e C, respectivamente, para soluções de tampão pH 2,5 e 4,5 indicaram exatidão adequada (Tabelas 1 e 2).³⁷

O método demonstrou sensibilidade para os dois solventes utilizados. Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, de 0,094 e 0,314 µg/mL quando da utilização de solução de tampão fosfato pH 2,5 como solvente e 0,043 e 0,145 µg/mL quando utilizada solução de tampão fosfato pH 4,5. A diferença nos valores de LD e LQ para os diferentes valores de pH pode ser justificada por oscilações do equipamento, já que a sensibilidade é praticamente a mesma para ambos.

Os valores de teor apresentados no ensaio de doseamento das amostras A, B e C, respectivamente, atenderam aos requisitos da legislação,^{38,39} que estabelece limites entre 90,0 e 110,0% da quantidade declarada para o produto acabado (Tabela 3).

Foi realizado o teste de uniformidade de conteúdo das cápsulas de cada amostra (Tabela 4) e verificou-se que as amostras dos produtos A, B e C apresentaram valores aceitáveis, utilizando-se como solventes

Tabela 1. Resultados obtidos na determinação dos parâmetros de validação do método para famotidina, utilizando como solvente solução de tampão fosfato pH 2,5 a 265 nm

Parâmetros	Condições	Níveis de concentração (µg/mL)	Médias das absorvâncias	DPR (%)	Percentual médio de recuperação (%)
Repetitividade	1ª Série	18	0,540	1,04 (n=6)	
	2ª Série	18	0,541	0,43 (n=6)	
Precisão intermediária	1º dia	18	0,568	0,81 (n=6)	
	2º dia	18	0,550	0,80 (n=6)	
Exatidão	Amostra A	13,0	0,407	0,57 (n=3)	98,79
		18,0	0,569	0,00 (n=3)	
		22,0	0,731	0,16 (n=3)	
	Amostra B	13,0	0,402	0,29 (n=3)	101,61
		18,0	0,547	0,28 (n=3)	
		22,0	0,697	0,25 (n=3)	
	Amostra C	13,0	0,385	1,29 (n=3)	101,88
		18,0	0,512	0,41 (n=3)	
		22,0	0,655	0,55 (n=3)	

Tabela 2. Resultados obtidos na determinação dos parâmetros de validação do método para famotidina, utilizando-se como solvente solução de tampão fosfato pH 4,5 a 265 nm

Parâmetros	Condições	Níveis de concentração (µg/mL)	Médias das absorvâncias	DPR (%)	Percentual médio de recuperação (%)
Repetibilidade	1ª Série	18	0,568	0,18 (n=6)	
	2ª Série	18	0,570	0,49 (n=6)	
Precisão intermediária	1º dia	18	0,569	0,29 (n=6)	
	2º dia	18	0,575	0,57 (n=6)	
Exatidão	Amostra A	13,0	0,426	1,21 (n=3)	100,09
		18,0	0,591	0,10 (n=3)	
		22,0	0,737	0,41 (n=3)	
	Amostra B	13,0	0,384	0,15 (n=3)	101,84
		18,0	0,532	0,38 (n=3)	
		22,0	0,685	0,08 (n=3)	
	Amostra C	13,0	0,391	0,00 (n=3)	98,46
		18,0	0,550	0,28 (n=3)	
		22,0	0,706	0,08 (n=3)	

Tabela 3. Valores obtidos no doseamento de famotidina das amostras A, B e C, respectivamente, por espectrofotometria no UV, utilizando-se como solventes soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5 a 265 nm

	Padrão		Amostra A		Amostra B		Amostra C	
	2,5	4,5	2,5	4,5	2,5	4,5	2,5	4,5
Médias das absorvâncias	0,505	0,540	0,491	0,545	0,480	0,537	0,482	0,544
Teor (%)	-	-	96,99	100,67	94,82	99,08	95,26	100,44
DPR (%)	-	-	1,24	1,63	1,85	3,22	3,20	4,37

Tabela 4. Valores obtidos no teste de uniformidade de conteúdo das cápsulas (amostras A, B e C), utilizando-se como solventes soluções de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5

Cápsulas	Teor amostra A (%)		Teor Amostra B (%)		Teor amostra C (%)	
	pH 2,5	pH 4,5	pH 2,5	pH 4,5	pH 2,5	pH 4,5
1	95,10	99,01	94,75	92,50	98,99	91,73
2	100,84	97,75	96,23	90,20	86,04	87,63
3	101,40	99,38	90,70	90,73	91,96	88,52
4	103,99	94,67	92,91	91,08	86,78	89,24
5	103,80	99,01	92,54	90,55	88,81	86,56
6	101,21	102,81	96,41	92,32	87,33	87,10
7	93,81	97,38	94,20	90,02	86,78	89,24
8	99,54	101,37	90,88	90,20	98,99	83,89
9	95,84	97,75	92,17	93,91	93,07	88,70
10	103,80	101,00	95,49	90,90	86,78	87,81
DPR (%)	3,78	2,35	2,24	1,39	5,55	2,32

tampão fosfato pH 2,5 e 4,5. A uniformidade de conteúdo do produto acabado deve estar entre 85,0 e 115,0% e a estimativa de desvio padrão relativo entre as determinações deve ser inferior a 6,0%.³⁵

O método espectrofotométrico utilizando como solventes tampão fosfato pH 2,5 e 4,5 foi aplicado à forma farmacêutica cápsula das amostras A, B e C, respectivamente. Os resultados de teor de cada amostra, expressos utilizando cada solução tampão, foram comparados estatisticamente. Para análise estatística dos dados, utilizou-se esquema fatorial 3 x 2 x 5 (3 farmácias, 2 solventes e 5 repetições). A comparação foi realizada através do teste de Tukey ao nível de

significância de 5%. Comparando-se as amostras de famotidina das farmácias avaliadas verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre elas. Comparando-se o uso dos solventes, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias percentuais de teor de famotidina, sendo que o método espectrofotométrico que utiliza tampão fosfato a pH 2,5 apresentou médias de teores de famotidina estatisticamente inferiores aos valores resultantes da aplicação do método espectrofotométrico utilizando tampão fosfato pH 4,5 como solvente, segundo o teste de Tukey ($p < 0,05$). Esse resultado foi atribuído à instabilidade do fármaco em condições de pH ácido. Relatos da literatura mostram que a estabilidade da famotidina é fortemente dependente da temperatura e do pH em solução aquosa e independente da exposição à luz, sendo que sua estabilidade máxima é verificada em pHs próximos a 4,0 (comparado ao pH próximo a 2,0).⁴⁰

CONCLUSÃO

Nas condições descritas, o método espectrofotométrico para determinação quantitativa de famotidina, utilizando como solvente solução de tampão fosfato pH 2,5 e 4,5, mostrou estar de acordo com os parâmetros de validação exigidos pela legislação vigente. Apresentou resultados satisfatórios de linearidade nas faixas de 10,0 a 25,0 µg/mL, precisão, exatidão e seletividade. Porém, a análise estatística revelou uma menor média percentual de famotidina expressa quando o método é empregado utilizando-se o tampão pH 2,5, em relação ao uso do tampão pH 4,5 como solvente. Esse resultado foi atribuído à forte instabilidade da famotidina em pH ácido. O método espectrofotométrico utilizando tampão pH 4,5 como solvente é considerado, portanto, adequado para análises de rotina do setor de controle de qualidade, visto ser de baixo custo, rápido, fácil de executar.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Equivalência Farmacêutica do Núcleo Controle de Qualidade (CEFAR-NCQ/UNIFAL-MG) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Korolkovas, A.; *Dicionário Terapêutico Guanabara*, ed. 2006/2007, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.
- Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P.K.; *Farmacologia*, 5ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.
- Ikawa, J.; Tomohiko, S.; Seiichi, H.; Norifumi, M.; Susumu, T.; *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1003.
- Silva, P.; *Farmacologia*, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.
- GUIA de Remédios*, 5ª ed., Ed. Escala Ltda: São Paulo, 2001.
- Wu, S. M.; Ho, Y. H.; Wu, H. L.; Chen, S. H.; Ko, H. S.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2717.
- Wu, S. M.; Ho, Y. H.; Wu, H. L.; Chen, S. H.; Ko, H. S.; *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2758.
- Pérez-Ruiz, T.; Martínez-Lozano, C.; Tomás, V.; Bravo, E.; Galera, R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *30*, 1055.
- Helali, N.; Tran, N. T.; Monser, L.; Taverna, M.; *Talanta* **2008**, *74*, 694.
- Ayed, M.; Shalab, A.; Abdellatef, H. E.; Elsaid, H.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 247.
- Squella, J. A.; Rivera, C.; Lemus I.; Nunez-Vogara, L. J.; *Microchim. Acta* **1990**, *100*, 343.
- Zuhri, A. Z. A.; Shubietah, R. M.; Badah, G. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *21*, 459.
- Nassr, S.; Brunet, M.; Lavoie, P.; Brazier, J.; *J. Liq. Chromatogr.* **2001**, *24*, 265.
- Kelani, K.; Azziz, A.; Hegazy, M.; Fattah, L. A.; *Spectrosc. Lett.* **2002**, *35*, 543.
- Amin, A.; Shama, S.; Ahmed, I.; Gouda, E.; *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 1851.
- Rahman, N.; Kashif, M.; *II Farmaco* **2003**, *58*, 1045.
- Reddy, N. R.; Prabhavathi, K.; Reddy, Y. V. B.; Chakravarthy, I. E.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2006**, *68*, 645.
- Suleiman, M.; Muti, H.; Abdel-Hamid, M.; Hassan, M.; El-Sayed Y.; Najib, N.; *Anal. Lett.* **1989**, *22*, 1499.
- Maurer, H.; *J. Chromatogr.* **1990**, *531*, 369.
- Zoest, A.; Wanwimoluk, S.; Hung, C.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1991**, *572*, 227.
- Kamath, B.; Shivram, K.; Newalkar B.; Shah, A.; *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 1007.
- Carlucci, G.; Mazzeo, P.; Vetuschi, C.; Di Giuseppe, E.; *Int. J. Pharm.* **1994**, *102*, 271.
- Carkir, B.; Tosun, A.; Sahin, M.; *Pharm. Sci.* **1997**, *3*, 493.
- Zhong, L.; Yeh, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *16*, 1051.
- Novakovic, J.; *J. Chromatogr., A* **1999**, *864*, 193.
- Dowling, T.; Frye, R.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1999**, *732*, 239.
- Chih, H.; Hsi-Min, H.; Shu-Ying, H.; Ching-Yih, S.; Ber-Lin, C.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 379.
- Campanero, M.; Bueno, I.; Arangoa, M.; Escolar, M.; Quetglas, E.; Lopez-Ocariz, A.; Azanza, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *763*, 21.
- Singh, S.; Kumar, S.; Sharda, N.; Chakraborti, A.; *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 253.
- Zarghi, A.; Shafaati, A.; Foroutan, S. M.; Khoddam, A.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 677.
- Sultana, N.; Arayne, M. S.; Naneed, S.; Shamshad, H.; *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 547.
- Helali, N.; Adhoum, N.; Monser, L.; *J. Flow Injection Anal.* **2005**, *22*, 129.
- Walash, M.; Sharaf-El Din, M.; Metwally, M.; Shabana, M.; *Chin. Chem. Soc.* **2005**, *52*, 71.
- Tzavaras, P. D.; Themelis, D. G.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *588*, 1.
- Farmacopéia Brasileira*, 4ª ed., Atheneu: São Paulo, 1988.
- United States Pharmacopoeia*, 30ª ed., United States Pharmacopoeia Convention: Rockville, 2007.
- Marques, M. R. C.; Brown, W.; *Rev. Analytica* **2002**, *1*, 48.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RE nº899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de junho de 2003.
- ICH Q2(R1), International Conference on Harmonization, *Validation of analytical procedures: Text and methodology*, 2005, <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>, acessada em Fevereiro 2010.
- Wu, Y.; Fassih, R.; *Int. J. Pharm.* **2005**, *290*, 1.