

## Desenvolvimento e validação de método analítico para nistatina creme vaginal por cromatografia líquida de alta eficiência

Zênia Maria Maciel Lavra, Fabiane Sônego, Rosali Maria Ferreira da Silva, Flávia Patrícia Morais de Medeiros\*

Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE

*A nistatina é um antibiótico poliênico, com características fungistáticas e fungicidas, que age desestruturando a membrana celular de fungos e leveduras. O creme vaginal de nistatina é usado para o tratamento da candidíase vaginal. Até recentemente, os compêndios oficiais preconizavam o ensaio microbiológico para doseamento deste antibiótico, método este considerado inviável na rotina de centros de controle de qualidade, devido ao tempo excessivo para liberação dos resultados. Visando obter um método alternativo para o doseamento do creme vaginal de nistatina, procurou-se desenvolver e validar um método cromatográfico (CLAE). O método desenvolvido utilizou como fase estacionária uma coluna de fase reversa,  $C_{18}$ , 3,9 x 150 mm, 4 mm, à temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída por tampão fosfato de sódio 0,25 mM e EDTA 0,025 mM, pH 6,00, metanol e acetonitrila (40:30:30), vazão de 1,0 mL/minuto e comprimento de onda 305 nm. O método validado revelou-se exato, preciso, robusto, linear e específico, além de rápido e prático, podendo ser utilizado para o doseamento analítico de creme vaginal de nistatina.*

### Unitermos

- Nistatina/doseamento
- Cromatografia líquida de alta eficiência/validação de método
- Método analítico/validação

\*Correspondência:

F. P. M. Medeiros  
Laboratório Farmacêutico do Estado  
de Pernambuco – LAFEPE  
Largo de Dois Irmãos, 1117 - Dois  
Irmãos  
52171-010 - Recife – PE, Brasil  
E-mail: flavia.morais@lafepe.pe.gov.br

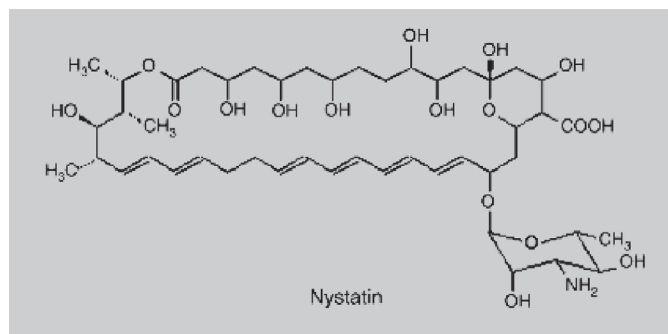
## INTRODUÇÃO

A nistatina (Figura 1), primeiro antibiótico poliênico antifúngico, descoberto no início dos anos 50, é produzida pelo crescimento de certas cepas de *Streptomyces noursei* (Groll *et al.*, 1999). Age principalmente na permeabilidade da membrana celular, onde liga-se ao ergosterol (Bennett, 2003). Apresenta ação farmacológica contra *Candida spp.* e é amplamente utilizada no tratamento de infecções vaginais (Baratieri *et al.*, 2006). Entre outras formas farmacêuticas, é comercializada como creme vaginal, produzido por diversos laboratórios farmacêuticos, incluindo o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE.

Para garantir a qualidade final do creme vaginal de nistatina, é necessário, entre outros parâmetros, o doseamento do princípio ativo. A Farmacopéia Brasileira e, até recentemente, a Farmacopéia Americana preconizavam o método microbiológico para tal doseamento. No entanto, este método revela-se inviável na rotina de um laboratório farmacêutico haja vista o tempo excessivo para o fornecimento do resultado e a necessidade de rapidez para liberação, principalmente, do produto em processo.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método analítico alternativo para o doseamento de creme vaginal de nistatina, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que apre-

sente baixo custo, boa segurança e praticidade aos centros de controle de qualidade.



**FIGURA 1** - Estrutura química da nistatina (Groll *et al.*, 1999).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes e produtos farmacêuticos

Para desenvolver e validar o método foi utilizado dimetilsulfóxido (Vetec® - lote 0506423), metanol grau HPLC (JTBaker® - lote B37E73), N-N- dimetilformamida (Nuclear® - lote 04050642), acetonitrila grau HPLC (JTBaker® - lote B07C51), fosfato de sódio monobásico monoidratado (Merck® - lote 407), EDTA dissódico (Nuclear® -lote 04060875) e hidróxido de sódio (Nuclear® - lote 04101343).

O creme vaginal de nistatina 25.000 UI/g, utilizado como amostra, foi produzido pelo LAFEPE (lote 05120182). Como padrão para as análises, utilizou-se nistatina matéria-prima (lote LAFEPE 13601), secundarizada previamente a partir de um padrão primário USP, o qual apresentou teor de 102,04%.

### Vidrarias e Equipamentos

Foram utilizadas vidrarias certificadas por lote pelo fabricante (Pyrex®).

Os equipamentos e instrumentos certificados necessários à execução do estudo foram: aparelho de purificação de água (Milli-Q Millipore Corporation®), sistema de filtração a vácuo (Millipore®), lavadora ultrassônica (Ultrasonic Cleaner Unique®), pHmetro (Tecnal® Tec-3MP), balança analítica (Mettler Toledo® XS 205), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu®) equipado com bomba binária LC 10ATVP, autoinjeter SIL 10ADVP, detector UV-visível SPD 10AVP, controlador SCL 10AVP e forno CTO 10ASVP. Ainda, foram utilizadas colunas de separação cromatográfica (C<sub>18</sub>, fase reversa, Novapak®, 3,9 x 150 mm, 4 µm, 60 Å e C<sub>18</sub>, fase

reversa, MicroBondapak®, 3,9 x 300 mm, 10 µm, 125 Å), membrana filtrante 0,45 µm (Millex Millipore®) e papel de filtro faixa preta (Vetec®).

### Desenvolvimento do método analítico

Variações na preparação das amostras e nos parâmetros cromatográficos foram testados por CLAE, com base em referências bibliográficas que envolviam a análise de nistatina ou anfotericina B, antibiótico antifúngico pertencente à mesma classe farmacológica da nistatina e de estrutura química semelhante (Lambros, Abbas, Bourne, 1996; Liu, Davoudi, Last, 1995; Lopes *et al.*, 1998). Inicialmente, testaram-se duas colunas de separação cromatográfica (C<sub>18</sub>, fase reversa, Novapak®, 3,9 x 150 mm, 4 µm, 60 Å; e C<sub>18</sub> e fase reversa, µBondapak®, 3,9 x 300 mm, 10 µm, 125 Å) e duas fases móveis distintas (uma composta por tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 0,25 mM e EDTA dissódico 0,025 mM, pH 6,00±0,05 (ajustado com NaOH 1M) : acetonitrila : metanol (40:30:30); e outra composta por EDTA dissódico 0,025 mM e acetonitrila, na proporção 70:30). Os parâmetros vazão da fase móvel (0,5 e 1,0 mL/min), temperatura do forno (30 e 35 °C), comprimento de onda (290, 305 e 322 nm) (Glasby, 1978) e proporção dos constituintes da fase móvel (40±2 : 30±2 : 30±2 de tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado:acetonitrila:metanol, respectivamente) foram testados para otimização do método.

O padrão secundário foi pesado, dissolvido em 50 % do volume total de N-N-dimetilformamida e sonificado durante 15 minutos. Em seguida, o volume foi completado com metanol, o qual foi o solvente da diluição posterior, obtendo-se concentração final de 175 UI/mL, semelhante à do padrão.

Para obtenção das amostras, o creme vaginal de nistatina foi pesado e cuidadosamente homogeneizado em alíquotas de N-N-dimetilformamida, perfazendo 50 % do volume total da primeira etapa da diluição. Após 15 minutos de sonicação, o volume foi completado com metanol, solvente utilizado na diluição seguinte, atingindo concentração final de 175 UI/mL.

As soluções padrão e amostra foram preparadas utilizando vidrarias protegidas da luz e lidas imediatamente após preparo, para evitar a degradação da nistatina ocasionada pela exposição à luz.

As condições cromatográficas satisfatórias para a metodologia desenvolvida incluem a coluna de separação cromatográfica de fase reversa, C<sub>18</sub>, Novapak®, 3,9 x 150 mm, 4 µm, com uma temperatura controlada de 30 °C e detecção em 305 nm. A eluição cromatográfica foi realizada com fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 0,25 mM e EDTA dissódico

0,025 mM, pH 6,00±0,05 (ajustado com NaOH 1M) : acetonitrila : metanol (40:30:30), com vazão de 1,0 mL/min.

### Validação do método analítico

A validação do método analítico desenvolvido para doseamento do creme vaginal de nistatina seguiu os parâmetros preconizados pela Resolução RE nº 899/03 da ANVISA (Brasil, 2003).

A linearidade foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados a partir de 4 curvas autênticas com 5 pontos cada, testada num intervalo de 40 a 200% da concentração de análise. As concentrações mínima, média e máxima (70, 175 e 350 UI de nistatina/mL) foram escolhidas para construção da curva controle.

A robustez foi avaliada partindo-se de pequenas variações na proporção da fase móvel, fluxo e temperatura do forno. Considerando que a acetonitrila e o metanol são solventes voláteis e possuem valores de pH muito próximos, e sendo o tampão aquoso menos volátil que os outros solventes, com valor de pH ajustado entre 5,95 e 6,05, que é diferente dos solventes orgânicos, testou-se fases móveis nos quais a proporção do tampão foi modificada, com conseqüentes alterações nos dois solventes. Dessa forma, as fases móveis testadas tiveram proporções: 42:30:28; 38:30:32; 42:28:30 e 38:32:30, de tampão, acetonitrila e metanol, respectivamente, variando-se portanto o pH da fase móvel de 7,15 a 7,33. Para a variação da vazão foram testados os desvios de ± 0,01 mL/ minuto e para a temperatura de ± 2 °C.

A robustez foi concluída a partir de dados de seis replicatas tratados estatisticamente por teste *t de Student*, considerando a comparação entre as diferentes proporções de fase móvel, fluxos e temperaturas testadas frente as condições do método desenvolvido (40:30:30, 1 mL/min e 30 °C).

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetitividade (precisão intracorrída,  $n = 6$ ), e precisão intermediária (precisão intercorrída, dois analistas diferentes, em dias diferentes,  $n = 8$  por analista). Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando o teste *t de Student*.

A exatidão foi verificada através da análise de amostras de placebo contaminado em concentrações equivalentes a 50, 100 e 150 %, em relação à concentração analítica de 180 UI/mL, contando com  $n = 6$ , avaliando-se assim o percentual de recuperação.

A especificidade foi verificada a partir da análise de um lote de bancada do placebo do creme vaginal.

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram estimados pela divisão do desvio padrão dos coeficientes lineares das 4 curvas do ensaio de linearidade pelas médias dos coeficientes angulares das respectivas

curvas, multiplicando-se por 3,0 e 10,0 respectivamente (Rolim Neto *et al.*, 2006), conforme fórmula descrita na RE nº 899/03 – ANVISA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desenvolvimento do método analítico

Os resultados obtidos a partir dos testes realizados utilizando diferentes composições para a fase móvel, diferentes colunas cromatográficas, e diferentes solventes, descritos na literatura (Groll, 1999; Liu, 1995; Lopez, 1998; Lambros, 1996), foram avaliados considerando resolução do pico, maior eficiência na determinação do teor e menor interferência dos solventes. Diante disto, a coluna C<sub>18</sub>, fase reversa, Novapak®, 3,9 x 150 mm, 4 µm foi a selecionada para a execução do ensaio, assim como a composição da fase móvel foi tampão fosfato de sódio monobásico monoidratado 0,25 mM e EDTA dissódico 0,025 mM, pH 6,00±0,05, acetonitrila e metanol (40:30:30). Os solventes revelados como mais adequados para preparação da amostra, considerando a quantidade de nistatina quantificada, interferência no método, custo e toxicidade, foram N-N-dimetilformamida para a solubilização e metanol para posterior diluição da amostra. Estes solventes, quando testados individualmente, nas concentrações em que estão presentes no método desenvolvido, apresentaram picos em tempos de retenção semelhantes. As áreas observadas refletem uma possível interação entre a N-N-dimetilformamida e o metanol. No entanto, tais interações não comprometem a quantificação do princípio ativo, quando em análise, já que o tempo de retenção dos solventes é distinto daquele da nistatina.

Os melhores resultados obtidos referiram-se à fase móvel na proporção de 40:30:30 (tampão:acetonitrila:metanol) e com a temperatura do forno a 30 °C, escolhidos após avaliação da performance do sistema cromatográfico através dos parâmetros: assimetria do pico (1,02), fator de capacidade (3,10) e número de pratos teóricos (1460,95), conforme demonstrado na Figura 2.

As interferências na linha de base foram menores nos resultados de maior vazão, admitindo-se vazão de 1,0 mL/min. Ainda, como era esperado, o tempo de retenção diminuiu cerca de 50 % com este fluxo, contribuindo para a agilidade do trabalho.

Dados preliminares mostraram que a nistatina tem sua absorção máxima em 305 nm. Mesmo assim, os três comprimentos de onda citados na literatura (Glasby, 1978) foram testados (290, 305 e 322 nm), e sendo confirmada a absorção máxima na região de 305 nm, definindo-se a detecção nesse comprimento de onda.

O volume de injeção utilizado foi de 20 µL, o que corresponde a 3,5 UI de nistatina. O tempo de retenção evidenciado foi 3,1 minutos estabelecendo-se, portanto, tempo total de corrida de 4 minutos.

Após definição das condições cromatográficas, a metodologia foi validada. A Figura 2 apresenta o cromatograma da nistatina creme vaginal 25.000 UI.

### Validação do método analítico

Os resultados obtidos a partir das pequenas variações em determinados parâmetros metodológicos, pertencentes à robustez, foram tratados estatisticamente por teste *t de Student*, considerando 95% de confiança. Dentre as variações testadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros alterados em comparação com os valores obtidos nas condições definidas como padrão (Tabelas I e II).

A evidência de que o método em questão é linear foi obtida ao tratar matematicamente os resultados, fornecendo, a partir de então, a equação da reta:

$$Y = 11282,6 X - 56073,3$$

Nesta equação, o *y* representa a área do pico no cromatograma obtido e *x* a concentração de nistatina, em UI/ mL (Gráfico 1). Os dados foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se coeficiente de correlação igual a 0,9992 para as concentrações entre 70 e 350 UI de nistatina/ mL.

Os valores dos limites de detecção e quantificação foram estimados, respectivamente, em 0,5933 UI/mL e 0,8989 UI de nistatina/ mL, segundo equações presentes na RE nº 899/2003 - ANVISA.

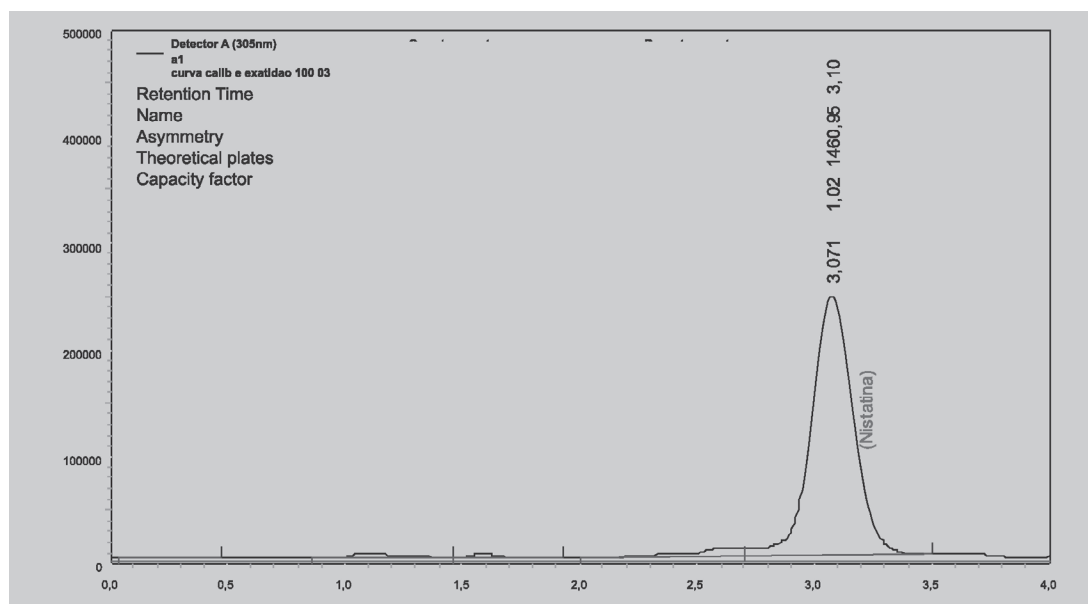
A precisão do método foi determinada pela repetitividade e pela precisão intermediária. O coeficiente de variação (CV%) obtido para a repetitividade foi de 1,30% (Tabela III), e para a precisão intermediária foi, para o analista 1, 0,89% e 1,91%, e para o analista 2, 1,59% e 1,73% (Tabela IV), sendo menores que 5%, máximo aceito (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária, com analistas e dias distintos, forneceu resultados que, analisados por teste *t de Student*, não evidenciaram diferença estatisticamente significativa para os parâmetros testados, com 95 % de confiança (Tabela IV).

Com 95% de confiança, o teste *t de Student* revelou que não há diferença entre os valores obtidos e os esperados no teste da exatidão, comprovando que o método é exato. O percentual recuperado pode ser visualizado na Tabela V.

A especificidade pode ser observada no cromatograma apresentado na Figura 3, na qual não há pico referente à substância analisada. Desta forma, o método desenvolvido não apresenta interferência dos constituintes da formulação, sendo específico para a nistatina, nas condições estudadas.

O produto acabado, utilizado, foi produzido em escala piloto para desenvolvimento e validação deste método e apresentou valor médio para teor de 105,66%. Sendo



**FIGURA 2** - Perfil cromatográfico de nistatina creme vaginal na concentração de 3,5 UI/20µL, utilizando fase estacionária  $C_{18}$ , fase móvel tampão fosfato pH 6,0:acetonitrila:metanol (40:30:30), vazão 1 mL/min, 30°C e  $\lambda = 305$  nm (Número de pratos teóricos: 1460,95; Assimetria: 1,02; Fator de capacidade: 3,10).

**TABELA I** - Valores obtidos na determinação da robustez de metodologia para nistatina creme vaginal 25.000 UI/mg - Média das concentrações de nistatina (em UI/mL) obtidas a partir da análise de seis replicatas com variações na fase móvel, e respectivos valores de  $F_{\text{calculado}}$  e  $F_{\text{tabelado}}$ , com 95% de confiança

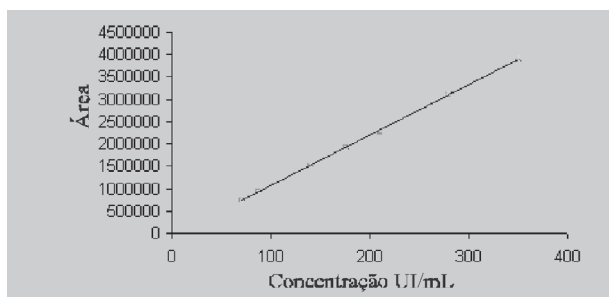
	Proporção da fase móvel (tampão : acetonitrila : metanol)				
	40:30:30	38:30:32	38:32:30	42:30:28	42:28:30
Amostra 1	193,36	191,50	192,20	185,55	182,83
Amostra 2	186,24	188,71	189,34	184,81	175,70
Amostra 3	183,73	192,79	186,99	183,48	185,34
Amostra 4	187,62	186,58	183,54	176,81	185,01
Amostra 5	184,42	189,05	190,24	186,33	187,67
Amostra 6	185,20	189,10	190,73	185,83	184,34
Média	186,76	189,62	188,46	183,80	183,48
CV%	1,88	1,16	1,65	1,94	2,25
$t_{\text{calc}}$		0,631	0,281	0,449	0,424
$t_{\text{tabelado}}$ (0,025; 5)			2,571		

**TABELA II** - Valores obtidos na determinação da robustez de metodologia para nistatina creme vaginal 25.000 UI/mg - Média das concentrações de nistatina (em UI/mL) obtidas a partir da análise de cinco replicatas com variações na temperatura da coluna, vazão da fase móvel e respectivos valores de  $t_{\text{tabelado}}$  e  $t_{\text{calculado}}$ , com 95% de confiança

	Temperatura (°C)			Fluxo da fase móvel (mL/minuto)		
	28	30	32	0,99	1,00	1,01
Média	182,78	180,73	185,00	185,63	180,73	181,90
CV%	1,08	0,9	1,58	1,34	0,9	1,45
$t_{\text{calc}}$	1,0021		1,130	1,586		0,479
$t_{\text{tabelado}}$ (0,025; 4)		2,776			2,776	

**TABELA III** - Repetitividade – Concentrações de nistatina (em UI/ mL), obtidas em sextuplicata

Amostra	1	2	3	4	5	6
Concentração (UI/mL)	180,00	179,23	183,44	180,25	177,54	184,27
Média	180,79					
CV%	1,30					

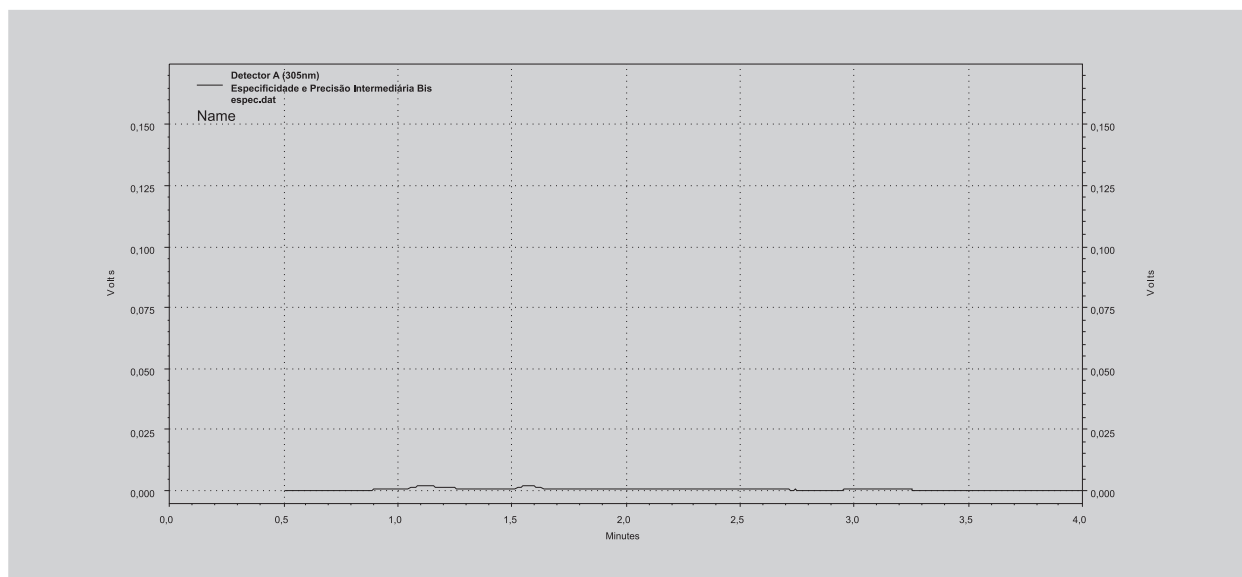
**Gráfico 1** - Curva de linearidade para Nistatina creme vaginal 25.000 UI/mL na faixa de concentração entre 70 e 350 UI de nistatina/ mL a 305 nm, utilizando como fase móvel tampão fosfato pH 6,0 : acetonitrila : metanol (40:30:30), fluxo de 1 mL/min e 30 °C de temperatura.**TABELA IV** - Precisão intermediária determinada com dois analistas, em dias distintos (n = 8)

	Analista 1		Analista 2	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Média	180,73	190,42	178,73	191,62
CV%	0,89	1,91	1,59	1,73
$t_{\text{calculado}}$ entre analistas	0,461	0,141	0,461	0,141
$t_{\text{calculado}}$ entre dias	1,738		1,912	
$t_{\text{tabelado}}$ (0,025; 6)			2,45	

**TABELA V** - Valores obtidos na exatidão do método a partir de diferentes concentrações de nistatina (50%, 100% e 150%), em sextuplicata

	Concentração teórica		
	50% (90 UI/mL)	100% (180 UI/mL)	150% (270 UI/mL)
Percentual recuperado	99,76	104,33	102,84





**FIGURA 3** - Cromatograma para verificação da especificidade do método utilizando creme vaginal placebo em sistema cromatográfico constituído de fase estacionário C<sub>18</sub>, fase móvel tampão fosfato pH 6,0:acetonitrila:metanol (40:30:30), vazão 1 mL/min, 30 °C e  $\lambda = 305$  nm.

assim, o creme vaginal de nistatina utilizado continha 26.416 UI de nistatina/4 g, (CV% = 0,88%).

Em todos os experimentos realizados, o CV% entre as amostras foi inferior ou igual a 5%.

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos a partir do método desenvolvido e validado fornece dados concisos para garantir que o mesmo é preciso, exato, específico, robusto, linear e ainda gera resultados em tempo inferior àquele necessário para o doseamento de nistatina creme vaginal por método microbiológico.

Portanto, este método está de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e apto a ser incorporado na rotina do controle de qualidade para análise da nistatina creme vaginal, sendo um método alternativo ao doseamento analítico descrito nos compêndios oficiais, que condiz com as buscas atuais de agilidade e eficiência num processo produtivo mais eficiente.

## ABSTRACT

### Development and validation of an analytical method for Nystatin vaginal cream by high performance liquid chromatography

*Nystatin is a polyenic antibiotic with fungistatic and fungicide characteristics that acts by de-structuring the cellular membrane of fungi and yeast. The nystatin vaginal*

*cream is used for the treatment of vaginal candidiasis. Until recently, the official compendia professed the microbiological trial for dosing this antibiotic, method considered as non-feasible in the routine of quality control centers due to the excessive time for release of results. Aiming at obtaining an alternative method for dosing nystatin vaginal cream, a chromatographic method (HPLC) was developed and validated. The method developed used a reversible phase column of C<sub>18</sub>, 3.9 x 150 mm, 4 mm, at 30 °C. The mobile phase was made up of a 0.25 mM sodium phosphate buffer and 0.025 mM EDTA, pH 6.00, methanol and acetonitrile (40:30:30), rate of 1.0 mL/minute and wavelength of 305 nm. The validated method showed to be accurate, precise, robust, linear and specific, in addition to being fast and practical, able to be used for analytic dosing of nystatin vaginal cream.*

*UNITERMS: Nystatin/ dosing. High Performance Liquid Chromatography/method's validation. Analytical method/ validation.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARATIERI, S. C.; BARBOSA, J. M.; FREITAS, M. P.; MARTINS, J. A. Multivariate analysis of nystatin and metronidazole in a semi-solid matrix by means of diffuse reflectance NIR spectroscopy and PLS regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.* Amsterdam, v.40, p.51-55, 2006.

- BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a publicação Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bionalíticos. *Diário Oficial da União Poder Executivo*, Brasília, 02 de jun. 2003.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 3ed. São Paulo: Atheneu, 1977. p.625-626.
- BENNETT, J. E. Antimicrobianos: Agentes Antifúngicos. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2003. cap.49, p.971-984.
- GLASBY, J. S. *Enciclopédia de antibióticos*. Madri: Editorial AC, 1978. p.515-516.
- GROLL, A. H.; MICKIENE, D.; WERNER, K.; PISCITELLI, S.; WALSH, T. J. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J. Chromatogr., B, Biomed. Sci. Appl.* Amsterdam, v.735, p.51-62, 1999.
- LAMBROS, M. P.; ABBAS, S. A.; BOURNE, D. W. A., New high-performance liquid chromatographic method for amphotericin B analysis using an internal standard. *J. chromatogr., B, Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.685, p.135-140, 1996.
- LAVRA, Z. M. M. *Obtenção Tecnológica de anti-retroviral dose fixa combinada à base de lamivudina, zidovudina e nevirapina*. Recife, 2006. 63p. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco].
- LIU, H.; DAVOUDI, H.; LAST, T. Determination of Amphotericin B in cerebrospinal fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. anal.* Amsterdam, v.13, p.1395-1400, 1995.
- LOPEZ, R.; POU, L.; ANDRES, I.; MONFORTE, V.; ROMAN, A.; PASCUAL, C.. Amphotericin B determination in respiratory secretions by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p.135-139, 1998.
- ROLIM NETO, P. J. ; SILVA, R. M. F. DA ; OLIVEIRA, F. H. C. ; STRATTMANN, R. R. ; PIMENTEL, M. F. ; MEDEIROS, F. P. M. ; ALBUQUERQUE, M. M. . Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica para Doseamento da Matéria-Prima e de Cápsula de Sulfato de Indinavir por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. *Acta Farm. Bonaer.*, Buenos Aires, v.25, p.578-582, 2006.
- UNITED States Pharmacopeia. 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006. p.1567-1572.

Recebido para publicação em 15 de maio de 2007

Aceito para publicação em 30 de julho de 2008