

Desenvolvimento, validação de método analítico para determinação da estabilidade do estolato de eritromicina associado ao ácido retinoico em forma farmacêutica magistral

Development, validation of an analytical method to determine the stability of erythromycin estolate associated with retinoic acid in master pharmaceutical form

RESUMO

O presente artigo realizou a validação de uma metodologia analítica espectrofotometria utilizando o estolato de eritromicina como padrão e posteriormente promoveu a associação da eritromicina ao ácido retinoico em formulações magistrais, analisando assim a estabilidade do produto nesta nova apresentação, inicialmente foram preparadas soluções do estolato de eritromicina com o solvente Éter metil-terc-butílico obtendo-se concentrações de 100 a 400 µg/ml. A varredura das absorvâncias foi efetuada em intervalo de 190 a 400 nm, onde apresentou pico máximo de absorvância em 215 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. Na validação o método apresentou-se linear com $r = 0,9994$; a precisão e exatidão com coeficiente de variação máximo de 1,92 com exatidão máximas de 1,24. O Método mostrou-se robusto e seletivo; no estudo de estabilidade foram realizadas análises dos produtos em estudo nos intervalos de tempo de 0, 30, 90 e 180 dias, onde as amostras apresentaram estabilidade em ambas as embalagens possibilitando assim a associação dos fármacos.

Palavras-chaves: antibacteriano, espectrofotometria, estabilidade de medicamentos

ABSTRACT

The present article performed the validation of an analytical spectrophotometric methodology using erythromycin estolate as standard and subsequently promoted the association of erythromycin with retinoic acid in master formulations, thus analyzing the stability of the product in this new presentation, initially solutions of erythromycin estolate With the solvent methyl tert-butyl ether yielding concentrations of 100 to 400 µg / ml. Absorbance scans were performed in the range of 190 to 400 nm, where the maximum absorbance peak was 215 nm using 1 cm quartz cuvettes. In the validation the method was linear with $r = 0.9994$; Accuracy and accuracy with a maximum coefficient of variation of 1.92 with maximum accuracy of 1.24. The method was robust and selective; In the stability study, the products under study were analyzed in the time intervals of 0, 30, 90 and 180 days, where the samples presented stability in both packages, thus allowing the association of the drugs.

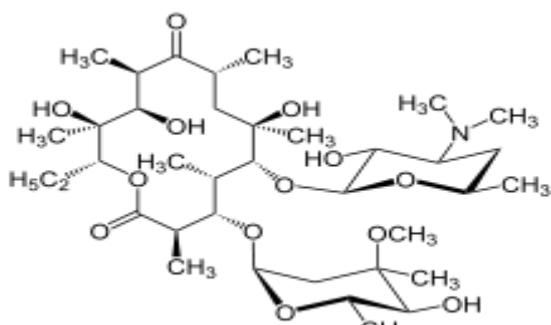
Keywords: anti-bacterial agents, spectrophotometry, drug stability

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos observou-se o crescente número de preparações e formulações farmacêuticas em farmácias magistrais e muito desse fenômeno se dá a comodidade e diversos fatores como: maior economia e possível associação de fórmulas em relação a fármacos produzidos pela indústria farmacêutica como a personalização nas suas embalagens além de atender um público com necessidades especiais com prescrições pediátricas geriátricas, da área de oncologia, insuficientes renais não apresentando limitações quanto a dosagens e números de comprimidos algo geralmente padronizado e não encontrado nas farmácias comerciais o que as limita a diversidade e as particularidades de cada cliente (POMBAL, BARATA & OLIVEIRA, 2010).

Dentre inúmeras fármacos aplicados as formulações magistrais temos eritromicina descoberta em 1952 por McGuire da cepa de streptomyces erytheus trata-se de um macrolídeo de atividade antimicrobiana habitualmente bacteriostático, mas em altas concentrações podendo ter ação bactericida, penetrando na membrana da célula bacteriana de forma reversível a subunidade 50s, a eritromicina é um protótipo que deu origem a outros análogos semissintéticos como a claritomicina e a azitromicina o que demonstra seu poder de utilização como base para possíveis novos fármacos (GOODMAN, 2012).

Figura 1 – Estrutura química do estolato eritromicina



Fonte: Google

No desenvolvimento e produção de medicamentos e de suma importância avaliar a estabilidade deste produto que implica em manter as mesmas propriedades e características ao longo do tempo desde o fabrico até a sua utilização. Os estudos de estabilidade devem ser realizados antes de disponibilizar os produtos ao consumo, requisito fundamental à qualidade e à segurança dos mesmos. Onde princípio ativo e excipiente tem que se manter de forma íntegra e com a potência descrita no rótulo assim como

física com a conservação das propriedades como aparência, sabor, dissolução além da terapêutica, toxicológica e bacteriana segundo a farmacopeia americana. Pelo perfil de estabilidade de um produto, é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além da sua aceitação pelo consumidor (POMBAL, BARATA & OLIVEIRA, 2010).

E para avaliar o teor de fármacos nas formulações e estudos de estabilidade, através de um método analítico desenvolvido é necessário segundo o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos a mesmo deve garantir, por meio de estudos experimentais que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados devendo apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de detecção, exatidão sempre adequados á análise (RESOLUÇÃO N.º 899, DE 29 DE MAIO DE 2003)

Geralmente a quantificação de ativos é realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou da determinação Eletroquímica, ou por espectrofotometria na região do UV-VIS (LIU & WU, 2011). Entre as deferentes técnicas, a espectrofotometria com detecção (UV) demonstra ser uma técnica de mais fácil execução além de custo menor mais não menos eficaz no uso em detecção e no controle de qualidade de matéria-prima e produtos farmacêuticos (MOURA, LIRA & MAGALHÃES, 2008).

Desta forma o presente artigo busca validar o método analítico utilizando a espectrofotometria possibilitando o teste da estabilidade da eritromicina associada ao ácido retinoico (tetrinoína) em fórmulas farmacêuticas magistrais.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matéria-prima, reagentes e equipamentos

Nas etapas de validação do método analítico foram utilizados o padrão estolato de eritromicina (EE), substancia na forma de pó assim como também formulações contendo eritromicina associada ao ácido retinoico em embalagem em material plástico e outra em embalagem bisnaga metal além de um creme contendo apenas eritromicina todos obtidos em farmácia magistral na cidade de Caruaru-PE, Brasil, quanto aos reagentes utilizados foram: Éter metil-terc-butilico (MTBE), $(\text{CH}_3)_3\text{-COOH}_3$. Foi utilizado Espectrofotômetro UV - VIS shimadzu modelo Uv mini-1240 serial A 109546, com cubetas de quartzo de 1,0 cm e impressora, balança analítica

modelo: AR3130BR, vortex kasvi-basic modelo. K45-2820 e vidrarias entre becker-uniclas 190.100 100ml.

2.3 Preparo das soluções

Na validação da metodologia foram pesados exatamente 20 mg e transferidos para balão volumétrico de 20 ml. E adicionado 20ml de Éter metil-terc-butílico (MTBE), e agitar vigorosamente utilizando bastão de vidro alcançou-se uma solução homogênea desta solução transferiu-se alíquotas para os respectivos balões volumétricos de 10 ml e ajustou-se o volume com MTBE. Isto par obter as soluções nas concentrações 100, 200, 250, 300, 350, e 400 µg/ml, em seguida conduzimos as amostras para o espectrofotômetro

2.4 Preparo das amostras

Pesou-se 1g da formulação, transferiu-se para um bequer de 200 ml para dissolução em 50 ml MTBE com agitação rigorosa por aproximadamente 15 min, após a dissolução o produto e transferido para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com MTBE (300 µg/ml). As amostras foram colocadas em cubetas e em seguida inseridas no espectrofotômetro para leitura.

2.5 Seleção do comprimento de onda

Estabelecidas as condições do ensaio foi determinado o espectro de absorção, transferindo-se alíquotas de 0,6 ml da solução padrão de estolato de eritromicina 1000 µg/ml para três tubos de ensaio de 10 ml e completando com MTBE para 2mL, com agitação por 30 s no vortex. As leituras das absorbâncias foram efetuadas, contra o branco, no intervalo de 190 a 400 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm.

2.6. Validação do método analítico

O método analítico foi validado segundo critérios estabelecidos na Farmacopeia Americana 29ª edição (USP, 2006) e no "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2003).

2.7. Precisão

A repetitividade do método foi determinada pela análise de seis tomadas de ensaio de 10 mg,

obtendo-se soluções na concentração final de 300 µg/mL, realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária e exatidão foram obtidos pela análise da amostra em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes, sendo as mesmas realizadas em seis replicatas, na concentração de 300 µg/mL. As absorbâncias das soluções foram medidas em 215 nm, utilizando-se MTBE ajuste do zero. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

2.8. Recuperação

A exatidão expressa, em porcentagem, foi avaliada a partir da adição e recuperação de quantidades conhecidas de Estolato de eritromicina, na amostra. Foram preparadas soluções na concentração final de 300 µg/ml. As absorbâncias das soluções foram medidas em 206 nm, utilizando-se solução da formulação sem o estolato de eritromicina em MTBE para ajuste do zero. A recuperação de 98% a 102% é recomendada para a exatidão do método. O teste foi realizado em triplicata.

2.9. Linearidade

Para o estudo do intervalo foram preparadas soluções em triplicata nas concentrações de 100 a 400 µg/ml de EE SQR em MTBE. Mediram-se as absorbâncias das soluções em 215 nm, utilizando-se MTBE para ajuste do zero. Construiu-se a curva analítica nas concentrações de 100, 200, 250, 300, 350, e 400 µg/ml. A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados. A partir dos resultados obtidos foram calculados o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR) do ensaio.

2.1. 1. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir da curva analítica e calculados pela relação: $3 \times \sigma/S$ e $10 \times \sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica.

2.1. 2. Especificidade

Com a finalidade de verificar a possível interferência dos demais componentes das fórmulas no método e determinar sua especificidade, prepararam-se amostras simuladas isentas de EE que foram submetidas ao método proposto.

2.1. 3. Robustez

O estudo da robustez foi realizado utilizando-se como variáveis o comprimento de onda (205 e 206 nm), diferentes marcas dos solventes, MTBE (Vetec, lote 110738; F2 : J.T. Baker, lote K04C55).

2.1. 4. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade do EE, nas amostras em estudo foi conduzido segundo o Guia para a Realização de Estudo de Estabilidade (BRASIL, 2005). As formulações como eritromicina associada ao ácido retinoico foram armazenadas em duas formas diferentes. A formulação em embalagem primária metálica foi armazenada a temperatura ambiente $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Já outra formulação em embalagem primária plástica foi armazenada sobre refrigeração $8 \pm 5^\circ\text{C}$. Isto de acordo com as recomendações repassadas pela farmácia de manipulação que produziu estas amostras do estudo. As formulações foram avaliadas no tempo 0, 30, 90 e 180 dias, quanto às características organolépticas e teor de ativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Seletividade

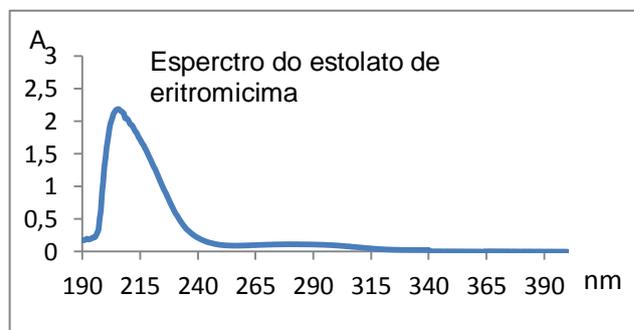
A varredura espectrofotométrica, 190-400 nm (Figura 2), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que a EE apresentou pico máximo de absorvância em 215 nm, cujo valor foi definido para utilização no desenvolvimento e validação do método analítico por espectrofotometria.

Assim, a seletividade do método foi o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, na qual foi observado que EE apresentou pico de absorção no comprimento de onda de 215 nm, o mesmo não acontecendo com a formulação Branca.

A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico. Este parâmetro deve ser avaliado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2010). A legislação preconiza que o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz, sem o fármaco, apresentar absorvância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (ICH, 2005; BRASIL, 2003)

Portanto, a metodologia proposta para quantificação do EE demonstrou ser seletiva, uma vez que não houve interferência dos componentes nos pontos específicos de detecção do fármaco (comprimento de onda de 215 nm).

Figura 2 – A varredura espectrofotométrica



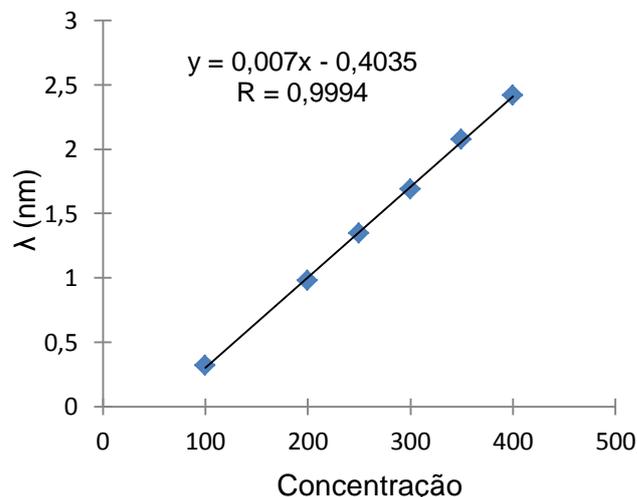
Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

Varredura onde se destaca o seu maior pico alcançando 215 nm.

Linearidade

Submetemos nossas amostras a testes para avaliar a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado conforme Figura 3.

Figura 3 – curva calibração linearidade



Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

O método proposto por espectrofotometria apresentou linearidade em uma faixa de 100 a 400 $\mu\text{g/ml}$. A curva analítica (Figura 3), obtida em triplicata, pôde ser descrita através da equação $y = 0,007x - 0,4035$, obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9994. O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade e linearidade da curva obtida, pois quanto mais

próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (NUNES et al., 2005).

A inclinação da curva (coeficiente angular) apresentou valor de desvio padrão igual a 0,00174 e coeficiente de variação de 0,335%. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 17 µg.ml⁻¹ e 40 µg.ml⁻¹, respectivamente.

As Tabelas 1 apresentam os dados obtidos durante a determinação da linearidade. Os valores de CV(%) e Exatidão, obtidos durante a avaliação foram inferiores a ±5,0%, com isso atendendo os critérios estabelecidos na RE 899 de 2003.

Tabela 1 – linearidade. Valores correspondentes (n=3) do método validado.

Conc (ug/mL)	Média (n=3)	DP	CV (%)	Exatidão (%)
100	103,69	0,54	0,52	103,69
200	198,12	1,39	0,70	99,06
250	250,07	0,14	0,06	100,03
300	298,98	0,08	0,03	99,66
350	354,40	0,59	0,17	101,26
400	403,60	0,72	0,18	100,90

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

Precisão e Exatidão

A Tabela 2 apresentam os dados obtidos durante a determinação dos parâmetros precisão e exatidão do método por espectrofotométrico. Para ambos, os valores de CV(%) obtidos durante a avaliação da precisão foram inferiores a 5,0%. Na determinação da exatidão, demonstrou-se proximidade entre os valores de concentração obtidos pelos métodos e os seus valores teóricos.

Tabela 2 - Precisão e Exatidão. Valores, em µg/mL, correspondentes aos parâmetros de Precisão e Exatidão (n=6) do método validado.

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão Repetitividade	300	298,44	1,92	-0,52
Precisão Intermediária (Dia 1)				
Analista 1	300	296,27	1,38	-1,24
Analista 2	300	297,06	1,63	-0,80
(Dia 2)	300	296,57	1,26	-1,14

Analista 1				
Analista 2	300	297,51	1,52	-0,83

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

Então, nas condições estudadas demonstrou-se que os resultados de exatidão e precisão para o método desenvolvido e validado também estão de acordo com o preconizado pela RE 899 de 2003.

Robustez

As amostras testes foram submetidas para avaliar a robustez, medida da sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções de leitura utilizando MTBE proveniente de diferentes fornecedores (F1: J.T. Baker, lote K04C55; F2 : Vetec, lote 110738); leitura das soluções em diferentes comprimentos de onda (206 e 205 nm). Foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em seis replicatas, em meio às variações realizadas. A Tabela 3 mostra os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método.

Tabela 3 – Valores, em µg/mL, correspondentes a determinação da robustez do método espectrofotométrico validado (n=6).

Parâmetro	Conc. teórica	Conc. Obtida	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	300	296,27	1,38	-1,24
B	300	295,29	0,90	-1,57
C	300	296,91	1,71	-1,34

Fonte: laboratório de pesquisa ASCES-UNITA Caruaru-PE

Legenda: A = Solução em MTBE (fornecedor 1, 206nm); B = Solução em MTBE (fornecedor 2, 206nm); C = Solução em MTBE (fornecedor 1, 205nm).

Estudo de Estabilidade

Estabilidade de EE em amostras mantidas à temperatura de 8±5°C e 25±5°C, respectivamente para as formulações armazenadas em embalagem metálica e plástica por 180 dias (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores, em µg/mL, correspondentes a determinação da estabilidade das amostras (concentração nominal de 300 µg/mL)

Amostra (n=5)	Teor 0 dias	Teor 30dias	Teor 90dias	Teor 180dias
A1	298,40 ±2,29	299,86 ±1,56	299,60 ±1,71	292,89 ±2,37
A2	295,74 ±2,79	299,96 ±1,55	302,30 ± 6,59	301,86 ±0,62

Legenda: A1 = formulação em embalagem primária metálica (armazenada temperatura de $25\pm 5^{\circ}\text{C}$); A2 = formulação em embalagem primária plástica (armazenada temperatura de $8\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Portanto, de acordo com os dados obtidos na tabela-4 observou-se que ambas as amostras mantiveram-se estáveis durante o período de análise do estudo (180 dias). Com isto, podemos concluir que uma vez esta formulação sendo armazenada na temperatura informada para a sua respectiva embalagem apresentou-se íntegra e estável sendo viável a associação do estolato de eritromicina ao ácido retinoico na formulação avaliada.

CONCLUSÕES:

O método analítico desenvolvido para quantificação de estolato de eritromicina nas amostras em estudo por meio espectrofotometria apresentou especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão. Nos estudos de estabilidade utilizando amostras tanto em plástico e metal não ocorreu degradação significativa, demonstrando viabilidade na associação das amostras analisadas. O método desenvolvido e validado apresentou as características fundamentadas a partir dos resultados encontrados e de acordo com os objetivos deste trabalho, sendo adequado a utilização em ensaios de teor ou estabilidade envolvendo o referido fármaco..

REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Anvisa. Resolução n.º 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF; 2003. 29 maio.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**. v. 13, 2003.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.C.K. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

GAYATHRI, P.; JAYAVEERA, K.N.; SASIKIRANGOUD; REDDY, N.S. RP-HPLC Method development and validation for

simultaneous estimation of imipramine and alprazolam in pharmaceutical dosage forms. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.3, n. 10, 2014.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES – **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. Geneva: ICH; 2005. Current Step 4 version Parent Guideline dated 27 October 1994 (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005)

LÄUDKE, E. Um espectrofotômetro de baixo custo para laboratórios de ensino: aplicações no ensino da absorção eletrônica e emissão de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 32, n. 1, 2010.

LIU, T. WU, D. Simultaneous determination of some ultraviolet- absorbing chemicals in sunscreen cosmetics using a high- performance liquid chromatography method. **Int J Cosmet Sci**. v. 33, n. 5, 2011.

MOURA, M.P.S; LIRA, M.C.B; MAGALHÃES, N.S.S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, 2008.

NUNES R.S.; SENNA, B.A.A.; SILVA, J.A; SANTANA, D.P. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 86, n.3, 2005.

PASCHOAL, L.R. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 1., 2003.

POMBAL, R.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R. Estabilidade dos Medicamentos Manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, n. 7. 2010.

RAMOS, T. R.; SANTORO, M.I.R.M.; HACKMANN, E. R.M.K; SINGH, A.K. Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, 2005.

RAVISANKAR, P.; GOWTHAMI, S.; RAO, A
review on analytical method development. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnolog.** v.2, n. 3, 2014.

SENA, M.M.; FREITAS, C.B.; SILVA, L.C.; PÉREZ, C.N.; PAULA, Y.O. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova.** v. 30, n. 1, 2007.

SILVA, A.M.F; COSTA, F.P; MOREIRA, M. Acne vulgar: diagnóstico e manejo pelo médico de família e comunidade. **Revista Brasileira de Medicina de Família Comunidade.** v.9, n. 30, 2014.

SILVA J.A.; BEDOR, D.C.G.; SOUSA, C.E.M.; SANTANA, D.P.; EGITO, E.S.T. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v.31, n. 1, 2010.

SILVA, J.A.; GUIMARÃES, G.P.; PATRIOTO Y.B.G.; SILVA, N.E.S.; Sousa, C.E.M.; JUNIOR, F.J.B.M.; SANTANA, D.P.; Damasceno, B.P.G.L.; Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 35, n. 4, 2014.

SILVA, R. F; FILHO, A. P. N.; MENDONÇA, D. C. Estratégias Competitivas no Mercado Farmacêutico Brasileiro: Uma Abordagem sobre o Setor Magistral. In: XIII SIMPEP – Bauru, SP, Brasil, 6 a 8 de Novembro de 2006.

SOUZA, V.B.; FERREIRA, J.R.N. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de cremes e géis contendo sementes e extratos do bagaço da uva Isabel (*Vitis labrusca* L.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v.31,n.3,2010.

