

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos

FBF5777 - Tópicos Gerais em Fármacos e Medicamentos

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS**

Aluna: Francielle Regina Silva Dias

Docentes: Profa. Dra. Jeanine Giarolla Vargas

Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2019

RESUMO

Cada vez mais pesquisas são investidas e realizadas por todo o mundo em relação aos medicamentos, devido a isso, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis, sendo fundamental o desenvolvimento de rotinas de análises que, assegurem o proposto e favoreça a implantação de métodos mais eficientes e econômicos em comparação as utilizadas durante a rotina. Os métodos analíticos permitem avaliar a conformidade dos resultados de identificação e quantificação dos analíto com as especificações definidas de acordo com o produto ou processo. Para verificar se os resultados estão de acordo com as especificações dos órgãos de regulamentação, são utilizados os parâmetros de validação que são a seletividade/especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez.

A validação de um método analítico é o processo que atesta que o mesmo é adequado ao fim a que se destina. Para o uso rotineiro de um método analítico é imprescindível que este esteja validado de acordo com os órgãos responsáveis, mostrando dessa forma uma qualidade das medições e análises químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

Palavras-chave : método analítico, validação, parâmetros, controle qualidade

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	4
1.1. VALIDAÇÃO.....	5
1.2 PARÂMETROS ANALÍTICOS DE VALIDAÇÃO	7
1.2.1 SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE.....	7
1.2.2 LINEARIDADE.....	8
1.2.3 PRECISÃO.....	9
1.2.4 EXATIDÃO	10
1.2.5 LIMITE DE DETECÇÃO.....	11
1.2.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	11
1.2.7. ROBUSTEZ	12
CONCLUSÃO.....	13
REFERÊNCIAS.....	14

INTRODUÇÃO

Com o atual mercado global que está cada vez mais exigente e competitivo, as indústrias farmacêuticas visam um maior destaque, dessa forma a confiança e satisfação do consumidor são fatores de suma importância, sendo que este fator recebe cada vez mais atenção durante o processo de produção dos medicamentos [1].

Para assegurar a segurança, eficácia, qualidade e credibilidade dos produtos que estão sendo repassados ao consumidor é de extrema importância a existência do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas. O controle de qualidade por meio de um conjunto de operações, programação, coordenação e execução, objetiva assegurar e verificar se os produtos estão de acordo com as especificações farmacopeicas, atendendo os padrões de qualidade exigidos, comprovando por meio de análise e medição [2].

A qualidade analítica é importante na indústria farmacêutica, pois afeta os processos de desenvolvimento, a produção e controle da qualidade dos medicamentos, sendo necessária a validação nessas etapas. Os métodos analíticos permitem avaliar a conformidade dos resultados de identificação e quantificação dos analitos com as especificações definidas de acordo com o produto ou processo. A validação de um método analítico é o processo que atesta que o mesmo é adequado ao fim a que se destina. A validação de todos os processos de um produto farmacêutico tem que satisfazer determinados requisitos impostos legalmente pelas autoridades reguladoras e diretivas vigentes [3,4].

O desenvolvimento de novos métodos analíticos é de suma importância, sendo uma alternativa para a criação de métodos já estabelecidos pelas farmacopeias. Durante o desenvolvimento de um fármaco, é imprescindível que ao escolher uma metodologia analítica ou desenvolver uma nova, as análises gerem resultados que possam ser interpretáveis e confiáveis, para que quando for reprodutível esse atenda as especificações estabelecidas [5]. Para ocorrer sucesso na validação devem-se haver profissionais qualificados, padrões e reagente de qualidade e nos prazos de vencimento, equipamento devidamente calibrado, ambiente laboratorial adequado, dessa forma evita-se gastos desnecessários [6].

Um procedimento analítico é validado quando ele não é normalizado, ou seja foi criado pelo laboratório durante a rotina, quando o método é normalizado e mesmo

assim for utilizado fora da função para qual foi criado, houveram modificações ou ampliação. Quando houver alterações no processo de fabricação, a qualidade do produto final não estiver garantida nos limites de especificação, ocorrer troca de equipamentos e em casos de novo processo analítico, deve-se ocorrer uma revalidação ou uma nova validação [6].

Cada vez mais pesquisas são investidas e realizadas por todo o mundo em relação aos medicamentos, principalmente sobre o controle de qualidade. Devido a isso, é importante o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis, sendo fundamental o desenvolvimento de rotinas de análises que, assegurem o proposto e favoreça a implantação de métodos mais eficientes e econômicos em comparação as utilizadas durante a rotina [7].

1.1 Validação

Para o uso rotineiro de um método analítico é imprescindível que este esteja validado de acordo com os órgãos responsáveis, mostrando dessa forma uma qualidade das medições e análises químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Resultados fora de especificação não são confiáveis, podendo levar a problemas irreparáveis, conduzindo a tomada de decisões errôneas acarretando em desastres e prejuízos financeiros [8]. Validar significa garantir que o produto seja fabricado sempre com a mesma qualidade, da mesma forma, e estar de acordo com os limites de tolerância, estabelecido rigorosamente pelos órgãos fiscalizadores e farmacopeicos. [9, 10, 11].

Ao se validar um método não significa que este pode ser usado na determinação de um mesmo princípio ativo, pelo fato de que os resultados das análises sofrem influências de vários fatores, como o nível das doses terapêuticas usadas, a diferença de fórmulas farmacêuticas de um laboratório para outro e a estrutura química do fármaco. Para cada tipo de análise é necessário análises estatísticas, resultados experimentais [12].

No Brasil três agências são responsáveis em regular os procedimentos a serem utilizados durante a validação do método analítico, sendo elas: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), este sendo o único órgão responsável por regulamentar procedimentos de validação a serem utilizados para medicamentos de uso veterinário. Já no âmbito

internacional a regulamentação dos métodos a serem validados principalmente é realizada de acordo com as exigências do ICH, representado por Europa, Estados Unidos e Japão, por meio de representantes das agências reguladoras e das indústrias, em comum acordo foram definidos os parâmetros, metodologias e os requerimentos para a validação de métodos analíticos. De forma geral, o ICH está em concordância com Food and Drug Administration (FDA), a International Organization for Standardization (ISO) e a International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products [13].

De acordo com a RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017, decretada pela ANVISA, onde estabelece os critérios para a validação de métodos analíticos utilizados em produtos biológicos, insumos farmacêuticos (IFAs) e nos medicamentos, aplicando em todas as suas fases de produção, onde de acordo com o artigo 2º:

``Os parâmetros de validação e seus respectivos critérios de aceitação devem ser definidos de acordo com as características do analíto e da natureza do método.``

Os métodos microbiológicos não são aplicáveis à resolução, pois estes devem apresentar uma justificativa técnica para a abordagem que foi escolhida, sendo baseados na Farmacopeia Brasileira ou outros documentos oficiais que são reconhecidas pelo órgão [14].

Um método deve ser validado quando este não é reconhecido pela ANVISA. De acordo, com a ANVISA, a transferência de métodos entre laboratório, deve ocorrer uma validação parcial por parte do laboratório receptor, onde se avalia os parâmetros de precisão, exatidão e seletividade, desde que esse laboratório possua o mesmo sistema de gerenciamento da qualidade. Já uma revalidação ocorre quando existe alteração na composição do produto, na produção ou obtenção do IFA, no método analítico ou outras alterações em que haja impacto significativo no método validado. Após cada corrida analítica deve haver verificação do sistema. Os documentos gerados pela validação e validação parcial devem descrever os procedimentos, os parâmetros analíticos, os critérios de aceitação e os resultados, de forma detalhada, possibilitando assim sua reprodução e se necessário a avaliação estatística. O relatório de validação registrado deve possuir os dados e cálculos obtidos durante o processo de validação analítica, e as ferramentas estatística utilizadas para a avaliação dos dados [14].

De acordo com a Resolução 166 da ANVISA (2017), a validação garante por meio de estudos experimentais e testes analíticos, que o método implementado atenda as

exigências analíticas, dessa forma, irá assegurar a confiabilidade dos resultados, e que o método é adequado a sua finalidade, sendo registrados por meio de documentos comprovando a eficácia e mediante critérios objetivos. Para a farmacopeia americana [15] a validação de métodos analíticos garante que durante a rotina o método terá credibilidade. Os parâmetros de validação para uma metodologia analítica são a seletividade/ especificidade, linearidade/ faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez [16].

Portando, validar um processo, um sistema, metodologia ou equipamento é tornar que este seja legítimo, de forma comprovada em documentos, e que englobe todos os processos desde a produção, controle de qualidade, as condições ambientais, os insumos, matérias-primas que entram em sua composição [10,11].

1.2 Parâmetros analíticos de validação

1.2.1 Seletividade/Especificidade

O primeiro parâmetro a ser analisado durante a validação de um método analítico é a seletividade, já que se o método em análise não for seletivo, os demais parâmetros como linearidade, precisão e exatidão iram ser comprometidos, sendo assim, a seletividade deve ser realizada de forma continua durante a validação e execução do método [72 - 74].

A seletividade demonstra que o método analítico identifica ou quantifica o meu analito de interesse, mesmo com outros componentes presentes na amostra, como por exemplo, componentes da matriz, impurezas e diluentes. (ANVISA) A especificidade de um ensaio garante que o sinal medido provenha apenas do analito de interesse. Sendo assim quando o método possui várias respostas de diversos analito em uma matriz, porém consegue-se distinguir a resposta de um componente com o de outro, o método é seletivo, já o método que fornece resposta para apenas um analito da matriz é considerado um método específico. Devido ao fato de poucos métodos gerarem respostas específicas e por haver muitas confusões com os termos especificidade e seletividade, a IUPAC recomenda a utilização do termo seletividade. (RIBANI et al., 2004).

Por meio do estudo da seletividade podemos visualizar possíveis interferências causadas pelos componentes da matriz que podem levar a uma diminuição ou amplificação do sinal instrumental ou resposta instrumental do analito. [70] A

seletividade pode ser obtida de diversas maneiras, como por exemplo, comparando a matriz sem o analíto de interesse e a mesma matriz com o analíto de interesse (padrão) ou utilizando o método de adição de padrão.

No método da adição de padrão, os valores aceitados são entre 80% - 120% de recuperação para que o método possa ser considerado seletivo. A recuperação é averiguada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Recuperação} = \frac{|AF| - |A|}{|P|} \times 100$$

Onde $|AF|$ é a concentração da amostra com padrão; $|A|$ a concentração da amostra; $|P|$ o incremento de concentração esperado pela adição do padrão.

1.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analíto na amostra, dentro de um intervalo especificado [14] sendo obtido por meio de padronização interna ou externa, onde por meio de expressão matemática [3].

Para a se deve realizar no mínimo cinco concentrações diferentes da substância química de referência para as soluções preparadas, em triplicata no mínimo. Os cálculos utilizados para a validação do parâmetro de linearidade devem ser realizados por meio dos dados das concentrações reais e por meio das respostas analíticas individuais, sem exceções [14].

A relação entre a concentração do analíto a quantificar e o sinal obtido, é raramente conhecida, por isso é importante que se obtenha uma curva analítica usando diferentes concentrações de analíto, sob a forma de padrões, de modo a determinar a linearidade. É construído um gráfico por meio da relação dos resultados obtidos nas análises (eixo y) com as concentrações utilizadas (eixo x), o ajusto da curva de calibração é feito por ferramentas estatísticas, onde o nível de significância deve ser de 5% [20].

As duas variáveis citadas acima são relacionadas por meio da equação da reta:

$$y = a + bx$$

Onde y é a resposta medida de acordo com a finalidade do método; x a concentração; a, a interseção com o eixo y, b é o declive da curva analítica. O coeficiente de relação (R) é dado a partir da relação do sinal obtido e as concentrações, e trás a informação da qualidade da curva analítica obtida. O valor de R deve ser acima

de 0,99, esse valor significa que existe pouquíssima dispersão entre os valores obtidos e uma menor incerteza, além disso, o coeficiente angular deve ser diferente de zero [14, 21].

1.2.3 Precisão

Durante a realização de medições sempre se obtêm erros, sendo necessário durante a validação de resultados esse erro ser estimado, pois não é possível a sua erradicação, porém conhecendo a causa do problema é possível tentar fazer com que seja insignificante ou mínimo. Caso esse resultado se persiste durante várias análises, os valores individuais vão se localizar com maior incidência num valor médio [12].

Dizer que um método é preciso significa que os resultados obtidos por meio de ensaios independentes repetidos com as mesmas amostras, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas, preparadas de acordo com o método analítico a ser validado estão em valores muito próximos, a um valor central. Sendo que a precisão é expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade [14].

Na repetibilidade se considera as sucessivas medições realizadas por um único laboratório, com o mesmo responsável pela análise e utilizando sempre os mesmos equipamentos, levando a uma proximidade entre os resultados realizados por nove determinações e três concentrações, baixa, média e alta, ambas sendo compostas por três réplicas de cada, ou seis réplicas com concentração em teste individualmente preparadas. Precisão intermediária estabelece a precisão de resultados obtidos de análises feitas no mesmo laboratório, contudo ocorre um intervalo de tempo, onde as análises são realizadas em dias diferentes. E por fim, a reprodutibilidade é quando ocorre os mesmos resultados da metodologia analítica testada porém é realizada em laboratórios diferentes [14, 21]

A precisão é afetada por erros aleatórios, sendo expressa pelo desvio padrão, s , e pelo s é afetada pelos erros aleatórios e pode ser expressa pelo desvio padrão, s , pelo coeficiente de variação, CV como mostrado nas equações a seguir:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

Onde \bar{x} é a média aritmética de n número de medições; xi é o valor individual da medição efetuada. [22, 23]

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

Onde S é o desvio padrão; \bar{x} é a concentração média dos resultados obtidos.

1.2.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é obtida pela aproximação dos valores entre resultados avaliados de forma individuais da análise em relação ao valor de referência, que normalmente é dado pela análise de um material de referência certificado, MRC, ensaios interlaboratoriais, EIL, e/ou por meio de ensaios de recuperação. Esse material vem determinado o valor da concentração e da incerteza associada, que devem depois ser comparados com o valor obtido pelo laboratório. [24]. O valor obtido para comprovar que o método é exato deve ter disso verificado por no mínimo 9 determinações, por meio 3 concentrações: baixa, média e alta, em triplicata por nível, sendo as amostras preparadas de forma independentes [14].

A exatidão é dada pela relação entre a concentração média, obtida experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, de acordo com a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

A exatidão está associada a erros sistemáticos. Em laboratórios não muito confiáveis é realizado o ensaio interlaboratorial que analisa a exatidão dos métodos, onde se é determinado o Z-score, obtido pela equação:

$$Z - \text{score} = \frac{x_{\text{lab}} - x_y}{s}$$

Em que: X_{lab} – valor obtido pelo laboratório; X_y – valor de referência (valor verdadeiro); s – desvio padrão de referência.

Um bom resultado Z-score é entre -2 a +2, esse valor permite que o analista verifique o seu desempenho, e se este está dentro dos critérios pré-definidos para o

método a analisar, e assim observar erros que tragam resultados anormais, além de passar confiança em seus resultados analíticos. [25]

1.2.5 Limite de Detecção

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analíto, sendo determinado com precisão e exatidão em condições experimentais estabelecidas [14]. Para a estimativa do LQ pode ser realizado por métodos específicos para técnicas visuais, de sinal/ruído, ou pelos dados da curva analítica. O LQ é representado pela equação :

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Determinação do Limite de Quantificação com parâmetros da curva analítica.

Onde, σ é o desvio padrão, IC é o coeficiente angular da curva analítica numa proporção de 10:1 [14,17].

1.2.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analíto, sendo determinado com precisão e exatidão em condições experimentais estabelecidas [14]. Para a estimativa do LQ pode ser realizado por métodos específicos para técnicas visuais, de sinal/ruído, ou pelos dados da curva analítica. O LQ é representado pela equação :

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

Determinação do Limite de Quantificação com parâmetros da curva analítica.

Onde, σ é o desvio padrão, IC é o coeficiente angular da curva analítica numa proporção de 10:1 [14,17].

1.2.7 Robustez

Um método é robusto quando esse se pode dizer que é confiável, resiste a pequenas variações em sua condição analítica. No método quantitativo, as modificações causadas por variações no resultado final deverão ser avaliados de acordo com os critérios da exatidão. No caso de métodos qualitativos, tem que ser verificado se as variações causaram mudança na resposta analítica [14].

No quadro abaixo segue os parâmetros considerados para indicar a robustez de um método analítico.

Preparo das amostras	<ul style="list-style-type: none">• Estabilidade das soluções analíticas<ul style="list-style-type: none">• Tempo de extração• Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none">• Variação do pH da solução• Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	<ul style="list-style-type: none">• Variação do pH da fase móvel• Variação na composição da fase móvel• Diferentes lotes ou fabricantes de colunas• Temperatura e Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	<ul style="list-style-type: none">• Diferentes lotes ou fabricantes de colunas<ul style="list-style-type: none">• Temperatura• Velocidade do gás de arraste

Condições para a avaliação da robustez do método

Fonte: RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017

CONCLUSÃO

Devido a maior concorrência entre as indústrias farmacêuticas aumenta-se a pressão para essas produzirem remédios comprovadamente de qualidade, segurança e eficácia. O processo de validação assegura essas medidas, sendo necessária em todas as etapas do medicamento, desde o desenvolvimento até a prateleira das drogarias. Então de acordo com as resoluções brasileiras, que determinam os parâmetros da validação a fim de comprovar a qualidade analítica da metodologia é de suma importância que o método validado esteja dentro dos limites de especificidade e passe por todos os parâmetros .

Pode-se concluir que a validade é um processo que deve ser corretamente elaborado, atendendo aos mais altos critérios de qualidade, além de necessitar de profissionais habilitados para se empregar as funções, materiais de qualidade e equipamentos calibrados, comprovando que o método é adequado para garantir confiabilidade nas análises analíticas, conseqüentemente confiabilidade do produto analisado.

REFERÊNCIAS

- [1] KESIC, Dragan. Strategic analysis of the world pharmaceutical industry. Management: Journal of Contemporary Management Issues, {s.l.}, v. 1, n. 14, p.59-76, jan. 2009.
- [2] ROCHA, Madalena; AGUIAR, Fátima; RAMOS, Helena. O uso de esteroides androgénicos anabolizantes e outros suplementos ergogénicos – uma epidemia silenciosa. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, [s.l.], v. 9, n. 2, p.98-105, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2014.09.002>.
- [3]- ICH Harmonised Tripartite Guideline- Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005.
- [4]- United States Pharmacopeia 2014 – 1224 Transfer of analytical procedures.
- [6] VALENTINI, S.R.; SOMMER W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. Arquivos do Mudi, v.11, n. 2, p. 26-31, 2007.
- [7] LEITE, F. Validação em análises químicas. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008.
- [8] PARISOTTO, Graciele et al. Análise exploratória aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, {s.l.}, v. 41, n. 4, p.499-505, out. 2005.
- [9] WHO, World Health Organization. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report. Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.
- [10] NICOLÓSI, M. Validação de métodos analíticos. Controle de Contaminação. p. 12-21. 2003.
- [11] MORETTO L.D., SHIB M. A era da validação. Pharmaceutical Technology. 4:4-48. 2000.
- [12] GARFIELD, F. M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, p. 220. 1994.
- [13] VICH. Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, 2015.
- [14] RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>
- [15] USP. United States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention;. p.2149-63. 2000.

- [16] EMANUELLI T., SCANDIUZZI M. Validação de processos na indústria farmacêutica. In: Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos. 2000; Rio Grande do Sul: Universidade do Rio Grande do Sul. Anais. . p.57. 2000.
- [17] RIBANI, M.; BOTTALI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [18] Divisão de Acreditação de Laboratórios, Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. Coordenação Geral de Acreditação 2010.
- [19] VETERIN, M. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Brasília. 2011.
- [20] RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. Química Nova, v. 31, n.1, p.164-171, 2008.
- [21] ISO 8466-1: Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function, 2009.
- [22] HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Higher Education. 2000.
- [23] MITRA, S.;BRUKH, R., Sample Preparation: An Analytical Perspective (Chapter 1), in John Wiley & Sons, N.J.I.o.T. Department of Chemistry and Environmental Science, Newark, New Jersey, Editor. 2003.
- [24] VETERIN, M. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em Produtos para Alimentação Animal e Medicamentos Veterinários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Brasília. 2011.
- [25] THOMPSON, M. ELLISON, S. WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem 74, 835–855. 2002.