

# VALIDAÇÃO DE MÉTODO



**Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço**

# DEFINIÇÃO DE VALIDAÇÃO



## **Validação é?**

A avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.

(RDC 166/2017 – Anvisa)

# CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE



Validação de métodos analíticos:

- Especificidade/seletividade
- Exatidão
- Precisão
- Linearidade/Faixa
- Limite de Detecção/Quantificação
- Robustez

# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Especificidade / Seletividade
  - Especificidade: “Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico.”
  - Seletividade: “Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo.”

# ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE



- Impurezas
  - Orgânicas, inorgânicas, etc.
  - Substâncias relacionadas
  - Produtos de degradação
- Na ausência de SQR das impurezas
  - Hidrólise Ácida
  - Hidrólise Básica
  - Degradação térmica
  - Oxidação

# ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

TIPO DE REAÇÃO	CAT.	PROD. DE DEGRADAÇÃO	EXEMPLOS
<b>HIDRÓLISE</b> ■ Ésteres ■ Lactonas ■ Amidas ■ Lactamas ■ Éteres	■ Água	■ Ácido + álcool ou fenol ■ Ácido hidróxi ■ Ácido + Amina ■ Aminoácido ■ Álcool e/ou fenol	■ Ácido Acetilsalicílico ■ Ácido Ascórbico, Pilocarpina ■ Lidocaína, Peptídeos ■ Antibióticos beta-lactâmicos, Benzodiazepínicos ■ Glicosídeos
<b>ALCOÓLISE</b> ■ Ésteres ■ Lactonas ■ Amidas ■ Lactamas	■ Álcool	■ Éster + álcool ■ Éster hidróxi ■ Éster + Amina ■ Éster aminoácido	■ Formas Farmacêuticas com excipientes contendo grupos hidróxi (etanol, glicerol, macrogols, etc)
<b>CICLIZAÇÃO</b> ■ Aminoácidos  ■ Ácidos Hidroxicarboxílicos		■ Lactama, produtos de policondensação ■ Lactona, produtos de policondensação	■ Inibidores da ACE (produtos de degradação: dicetopiperazina), peptídeos ■ Ácido Láctico

# ESPECIFICIDADE/ SELETIVIDADE

TIPO DE REAÇÃO	CAT.	PROD. DE DEGRADAÇÃO	EXEMPLOS
<b>OXIDAÇÃO</b> ■ Fenóis ■ Olefinas ■ Eno-dióis ■ $\alpha$ -Cetóis ■ Álcoois Aromáticos ■ Aminas ■ Tioéteres	■ O <sub>2</sub>	■ Quinonas, Polímeros ■ Peróxidos, Aldeídos ■ $\alpha$ -Dicetonas ■ Cetonas ■ Aldeídos e Ácidos Carboxílicos ■ Aminóxidos ■ Sulfóxidos, Sulfonas	■ Eserina → Eserolina → Rubreserina ■ Corticosteróides ■ Ácido Ascórbico → Ácido Desidróxiascórbico ■ Corticosteróides → 17-Cetoesteróides ■ Álcool Benzílico  ■ Fenotiazinas sulforadas ■ Fenotiazinas sulforadas
<b>ISOMERIZAÇÃO CIS-TRANS</b>	■ Luz	■ Cis → Trans ■ Trans → Cis	■ Cisplatina
<b>EPIMERIZAÇÃO</b>	■ Ácido ou Base		■ Pilocarpina → Isopilocarpina ■ Tetraciclina → Epitetraciclina

# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Exatidão (Acurácia)
  - Definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro

# EXATIDÃO (ACURÁCIA)



- Materiais de Referência Certificados
  - Amostras simuladas (placebo)
  - Recuperação (“spike”)
- Comparações interlaboratórias
- Comparação de métodos

# TESTES t-STUDENT

A 3D bar chart with several bars of varying heights and colors (green, blue, red) on a light blue grid background.

H0: igualdade vs. H1: diferença

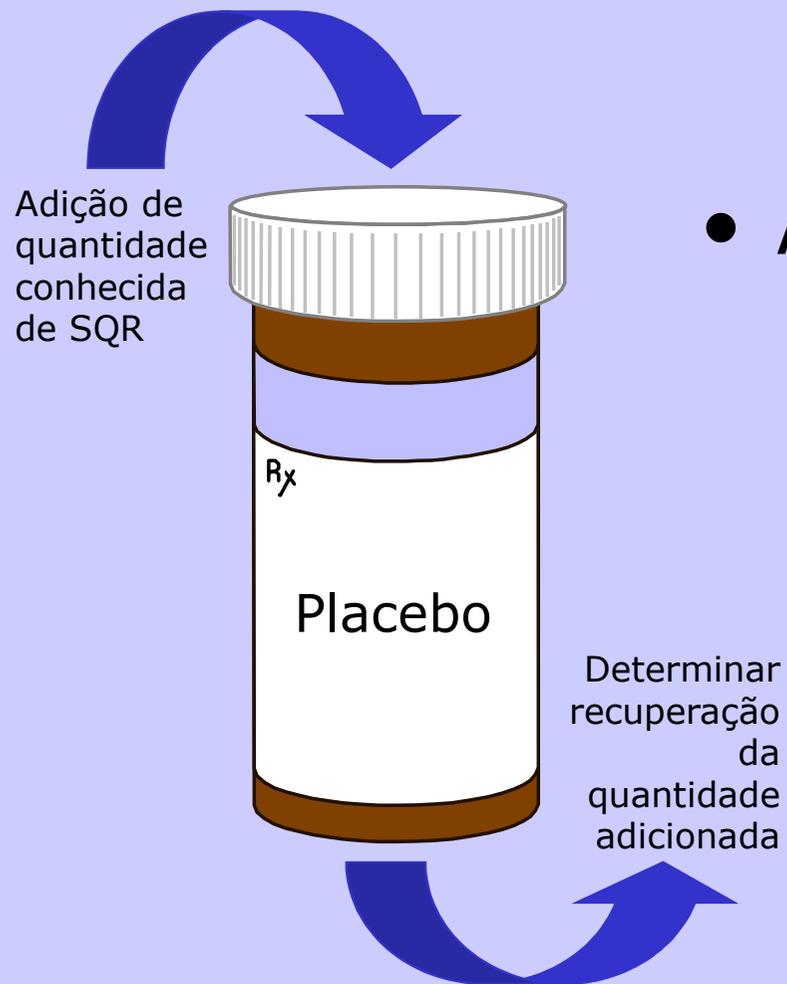
- Teste t simples
- Teste t para duas médias

H0: diferença vs. H1: equivalência

- TOST (Two One-Sided Test)

Formulados para rejeitar H0

# EXATIDÃO: MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO



- Amostras simuladas (Placebo)

$$Rec = \frac{Conc. Experimental}{Conc. Teórica} \times 100$$

# EXATIDÃO: TESTE $t$ PARA 1 AMOSTRA

$H_0: \mu = 100$

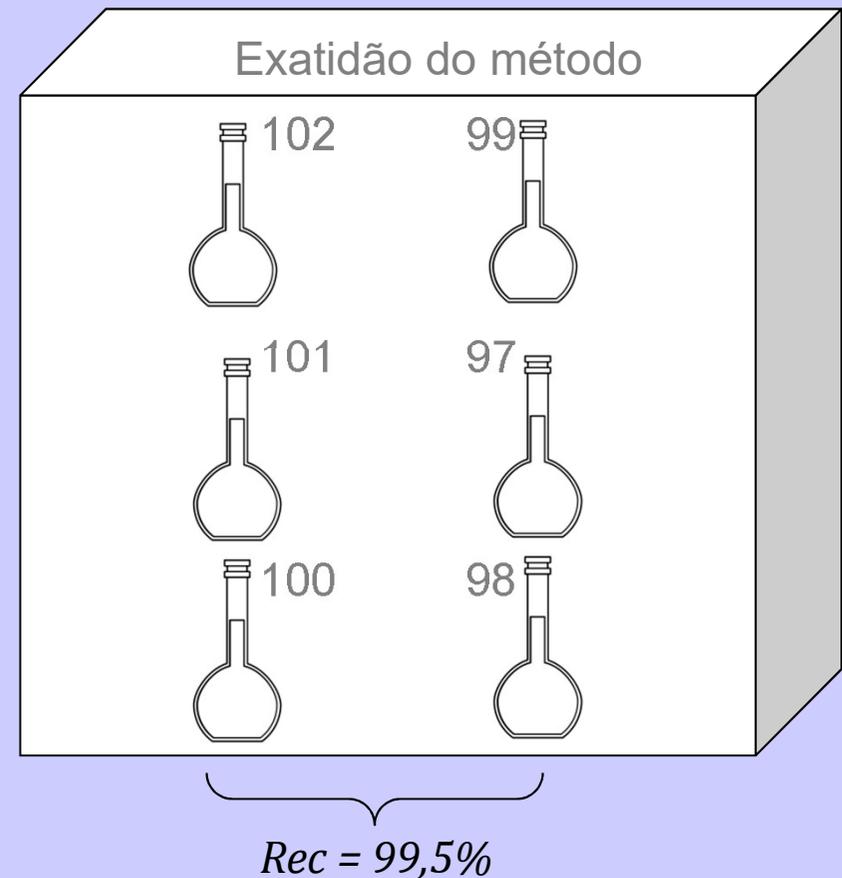
$H_1: \mu \neq 100$

$$t = \frac{Rec - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

→ Stat

→ Estatísticas Básicas

→ Teste  $t$  para 1 amostra...



# EXATIDÃO: TESTE $t$ PARA 1 AMOSTRA

## Teste T para Uma Amostra: Rec

### Estatísticas Descritivas

N	Média	DesvPad	EP Média	IC de 95% para $\mu$
6	99,500	1,871	0,764	(97,537; 101,463)

$\mu$ : média de Rec

### Teste

Hipótese nula  $H_0: \mu = 100$

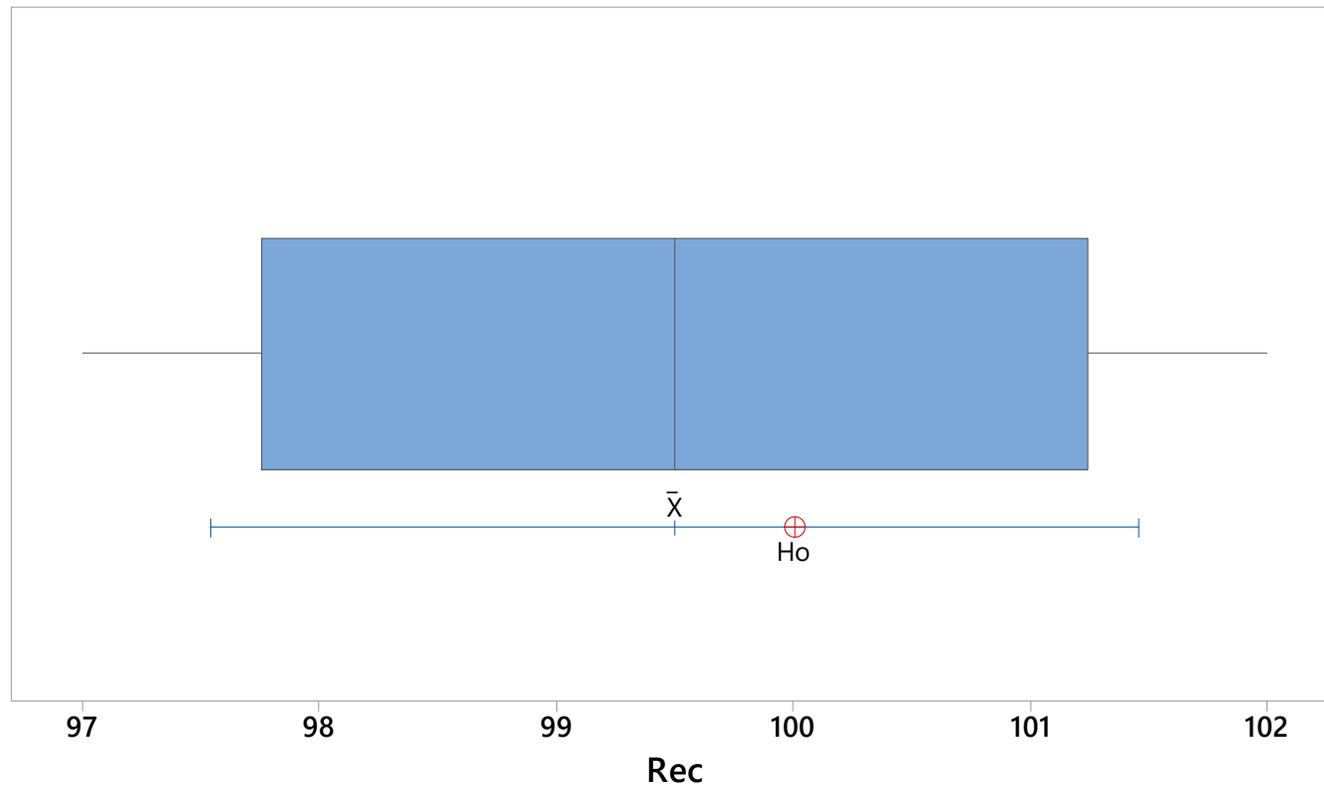
Hipótese alternativa  $H_1: \mu \neq 100$

Valor-T	Valor-p
-0,65	0,542

### Boxplot de Rec

# EXATIDÃO: TESTE $t$ PARA 1 AMOSTRA

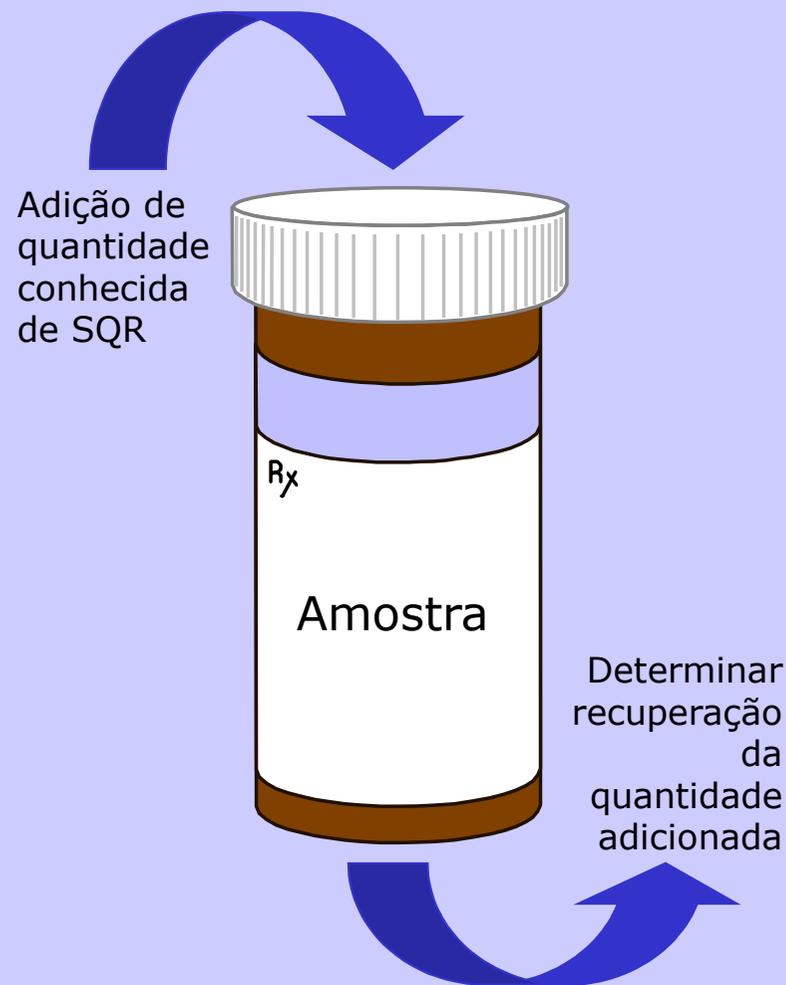
Boxplot de Rec  
(com  $H_0$  e intervalo de 95% de confiança  $t$  para a média)



# EXATIDÃO: MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO

- Adição de padrão ("spike")

$$Rec = \frac{Conc. Ad. - Conc. controle}{Conc. Teórica} \times 100$$

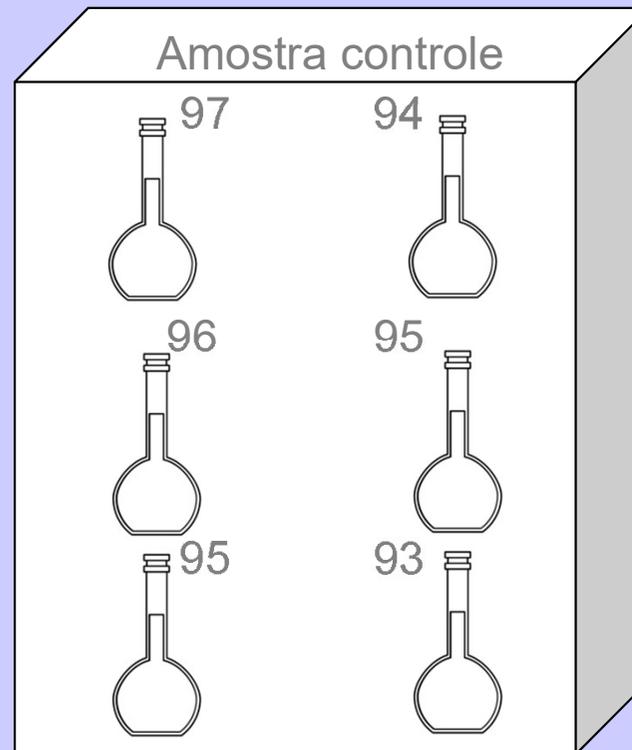


# EXATIDÃO: TESTE t PARA DUAS AMOSTRAS

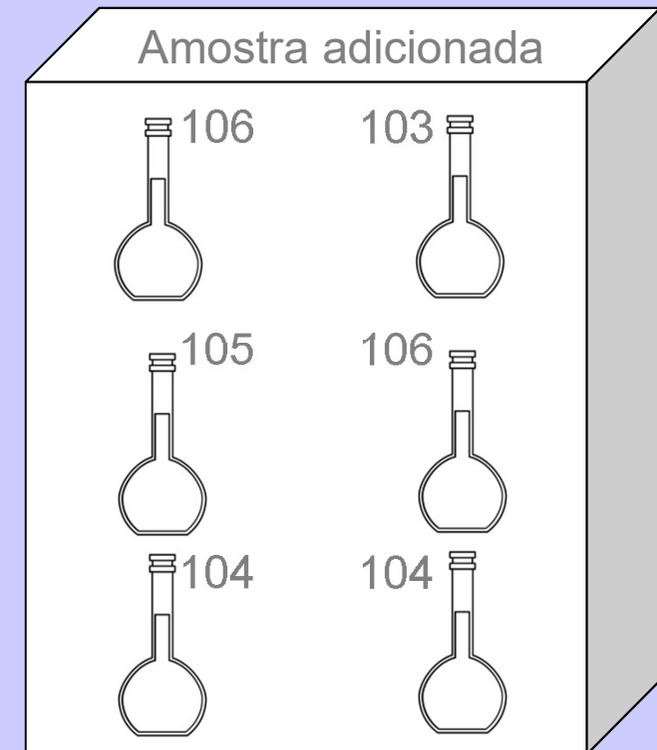
$$H_0: \mu_a - \mu_c = 10$$

$$H_1: \mu_a - \mu_c \neq 10$$

$$t = \frac{(X_a - X_c) - 10}{\sqrt{s_0^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$



$$X_c = 95,0$$



$$X_a = 104,7$$

→ Stat

→ Estatísticas Básicas

→ Teste t para 2 amostras...

$$Rec = \frac{104,7 - 95,0}{10} \times 100 = 97,0\%$$

# EXATIDÃO: TESTE t PARA DUAS AMOSTRAS

## Teste T para Duas Amostras e IC: Amostra adicionada; ... tra controle

### Método

$\mu_1$ : média de Amostra adicionada

$\mu_2$ : média de Amostra controle

Diferença:  $\mu_1 - \mu_2$

*Não assumiu-se igualdade de variâncias para esta análise.*

### Estatísticas Descritivas

Amostra	N	Média	DesvPad	EP Média
Amostra adicionada	6	104,67	1,21	0,49
Amostra controle	6	95,00	1,41	0,58

### Estimativa da diferença

Diferença	IC de 95% para a Diferença
9,667	(7,947; 11,386)

### Teste

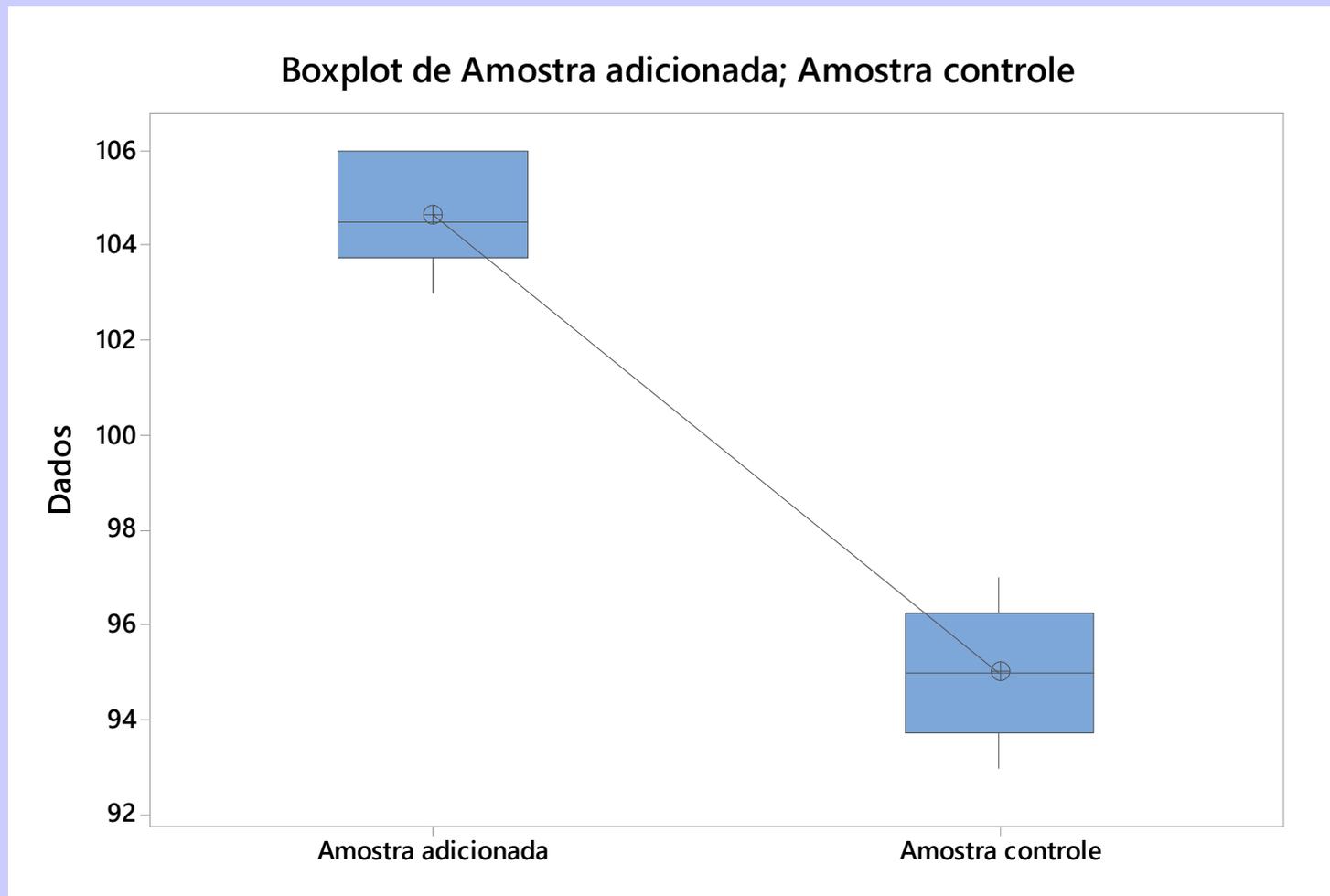
Hipótese nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 10$

Hipótese alternativa  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 10$

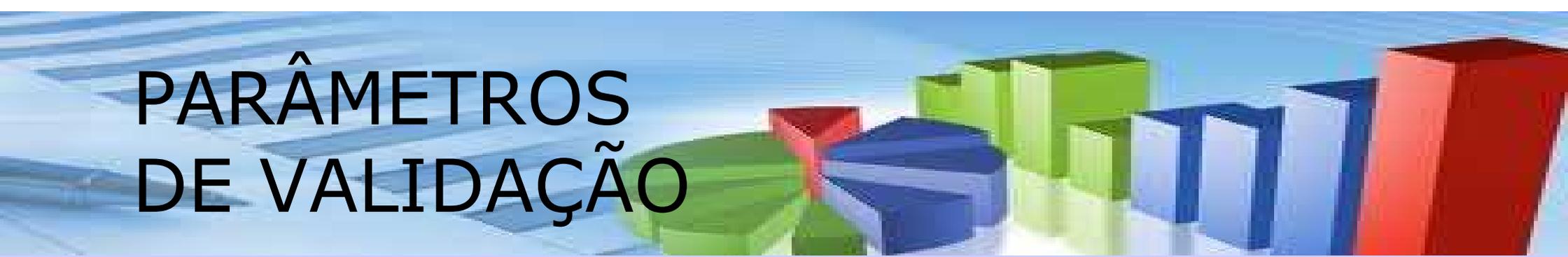
Valor-T	GL	Valor-p
-0,44	9	0,671

### Boxplot de Amostra adicionada; Amostra controle

# EXATIDÃO: TESTE $t$ PARA DUAS AMOSTRAS



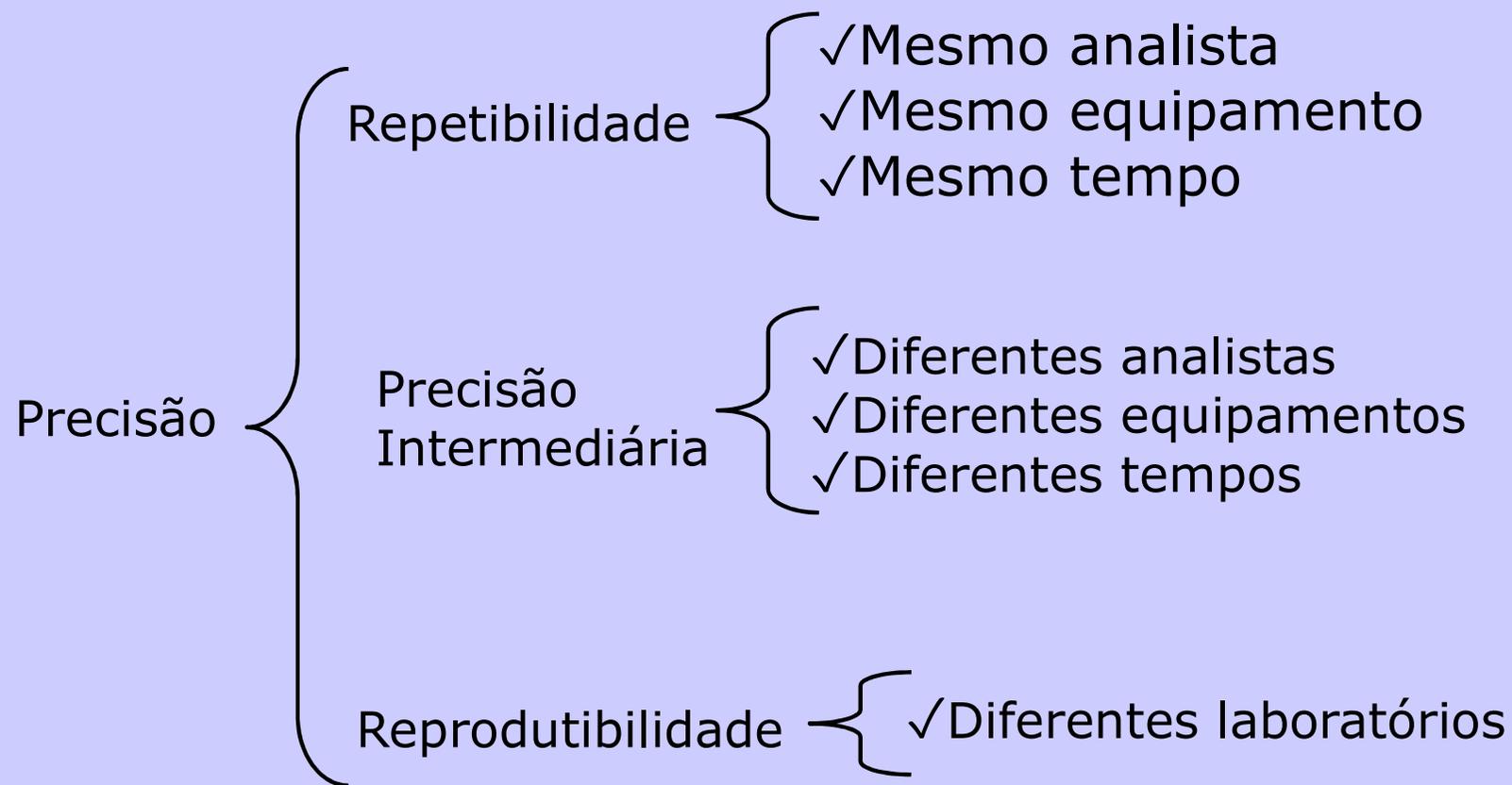
# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



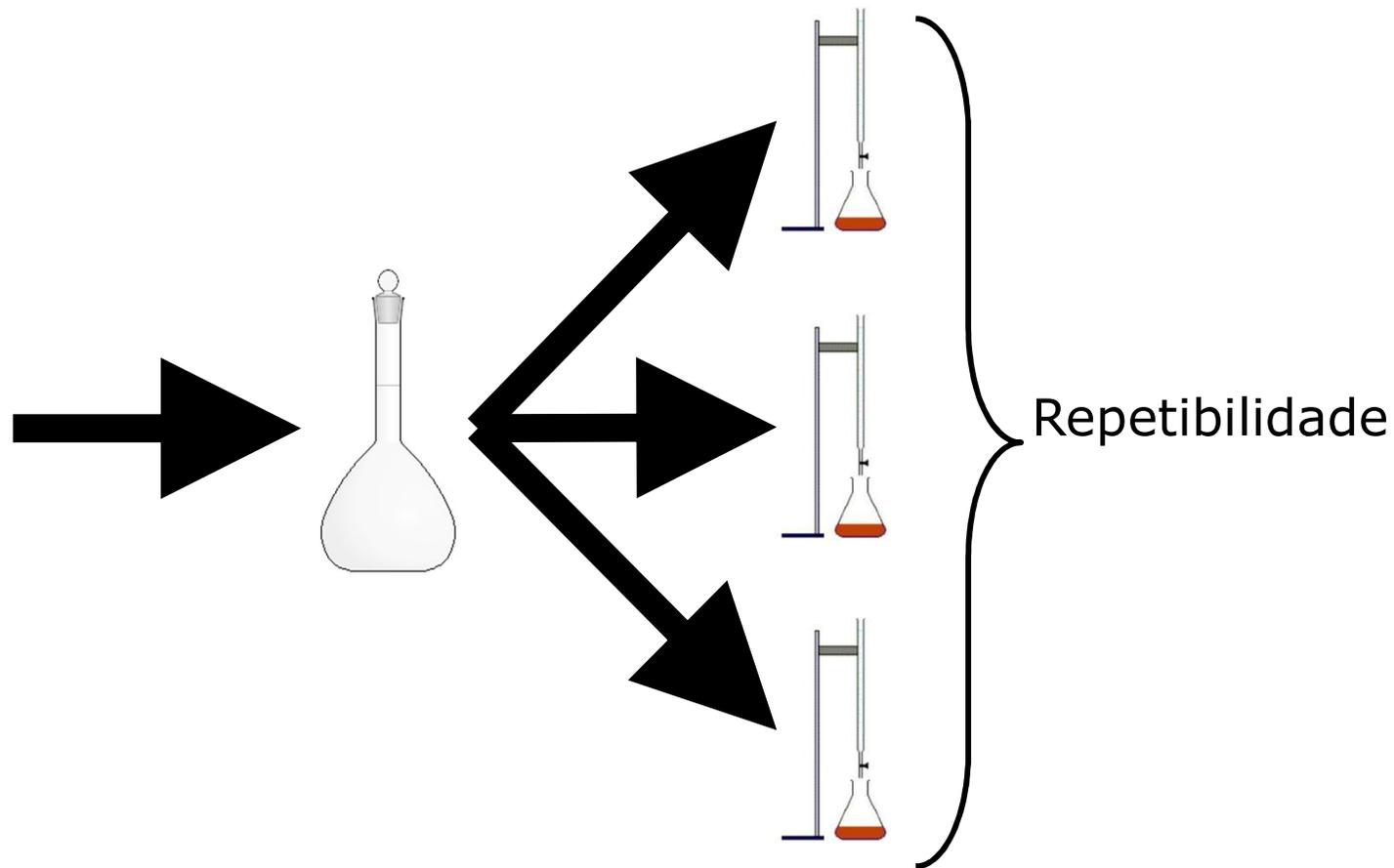
- Precisão

- Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo.

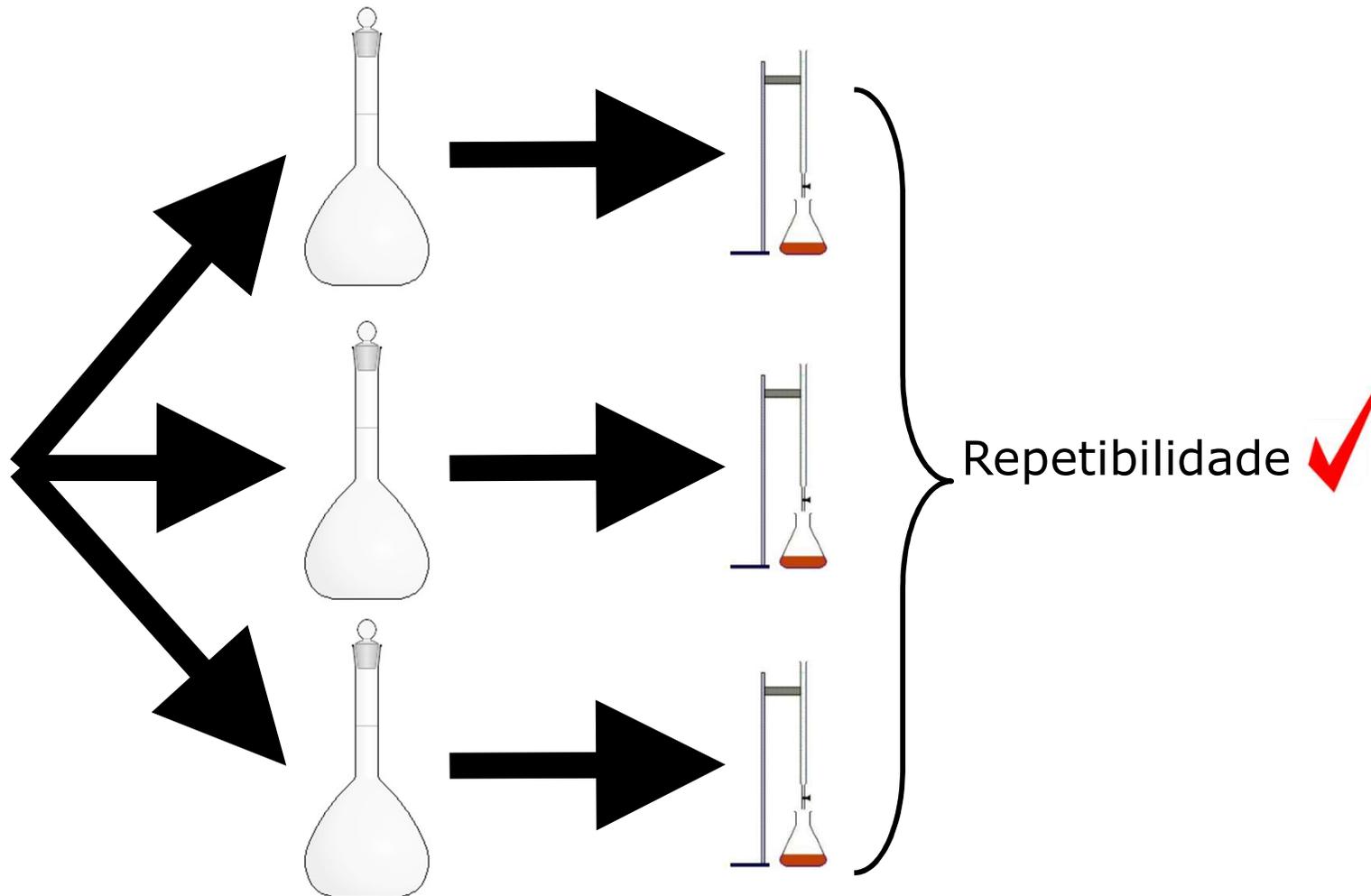
# REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE



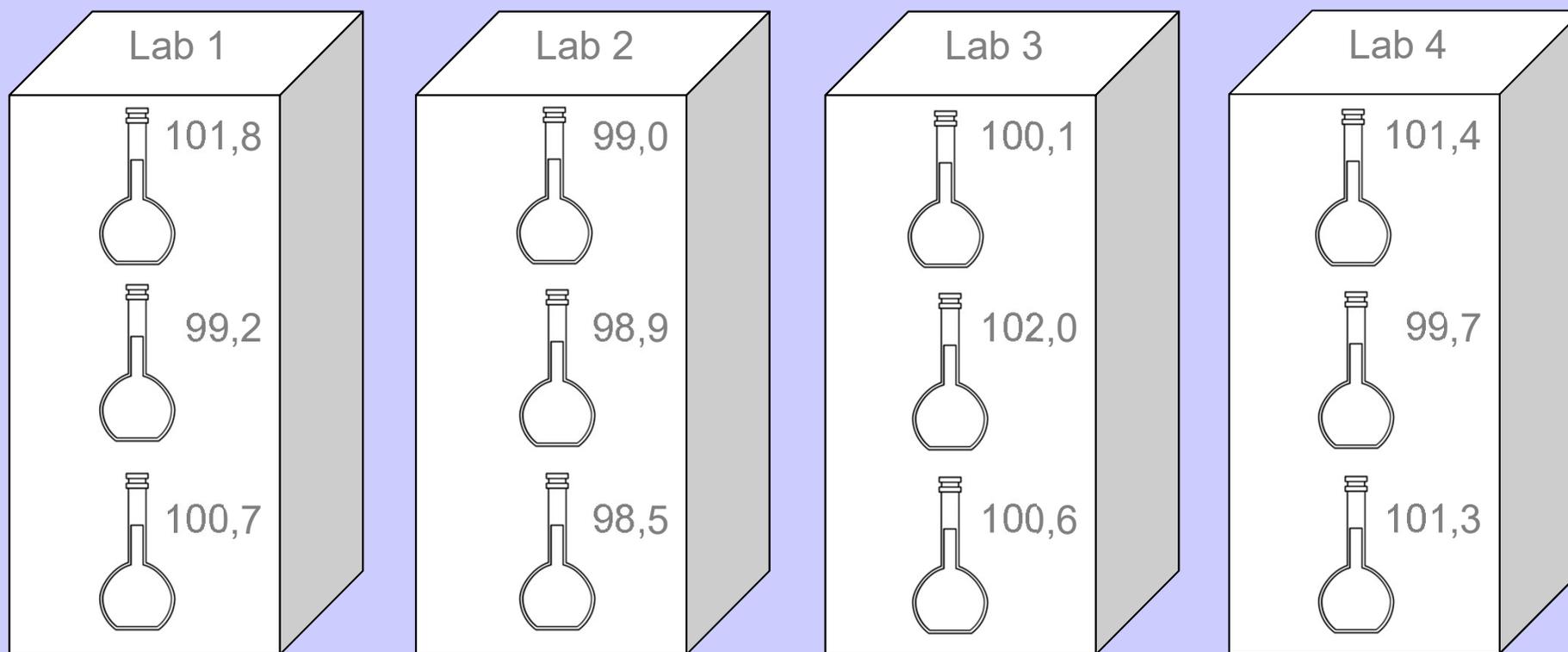
# REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIVILIDADE



# REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIVILIDADE



# PRECISÃO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA



# PRECISÃO: ANÁLISE DE VARIÂNCIA

<b>Fonte</b>	<b>g.l.</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>
<b>Between</b>	$k-1$	$SQB$	$\frac{SQB}{k-1}$	$\frac{QMB}{QMW}$
<b>Within</b>	$nk-k$	$SQW = SQT - SQB$	$\frac{SQW}{nk-k}$	
<b>Total</b>	$nk-1$	$SQT$		

# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

## ANOVA com um fator: Resultado versus Laboratorio

### Método

Hipótese nula	Todas as médias são iguais
Hipótese alternativa	Nem todas as médias são iguais
Nível de significância	$\alpha = 0,05$

*Assumiu-se igualdade de variâncias para a análise*

### Informações dos Fatores

Fator	Níveis	Valores
Laboratorio	4	1; 2; 3; 4

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Laboratorio	3	8,780	2,9267	3,20	0,083
Erro	8	7,307	0,9133		
Total	11	16,087			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,955685	54,58%	37,55%	0,00%

### Médias

Laboratorio	N	Média	DesvPad	IC de 95%
1	3	100,567	1,305	(99,294; 101,839)
2	3	98,800	0,265	(97,528; 100,072)
3	3	100,900	0,985	(99,628; 102,172)
4	3	100,800	0,954	(99,528; 102,072)

*DesvPad Combinado = 0,955685*

### Gráfico de Intervalos de Resultado versus Laboratorio

### Normplot dos Resíduos para Resultado

# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

## Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Laboratorio	3	8,780	2,9267	3,20	0,083
Erro	8	7,307	0,9133		
Total	11	16,087			

$$s_{Repe} = \sqrt{QM_{Erro}}$$

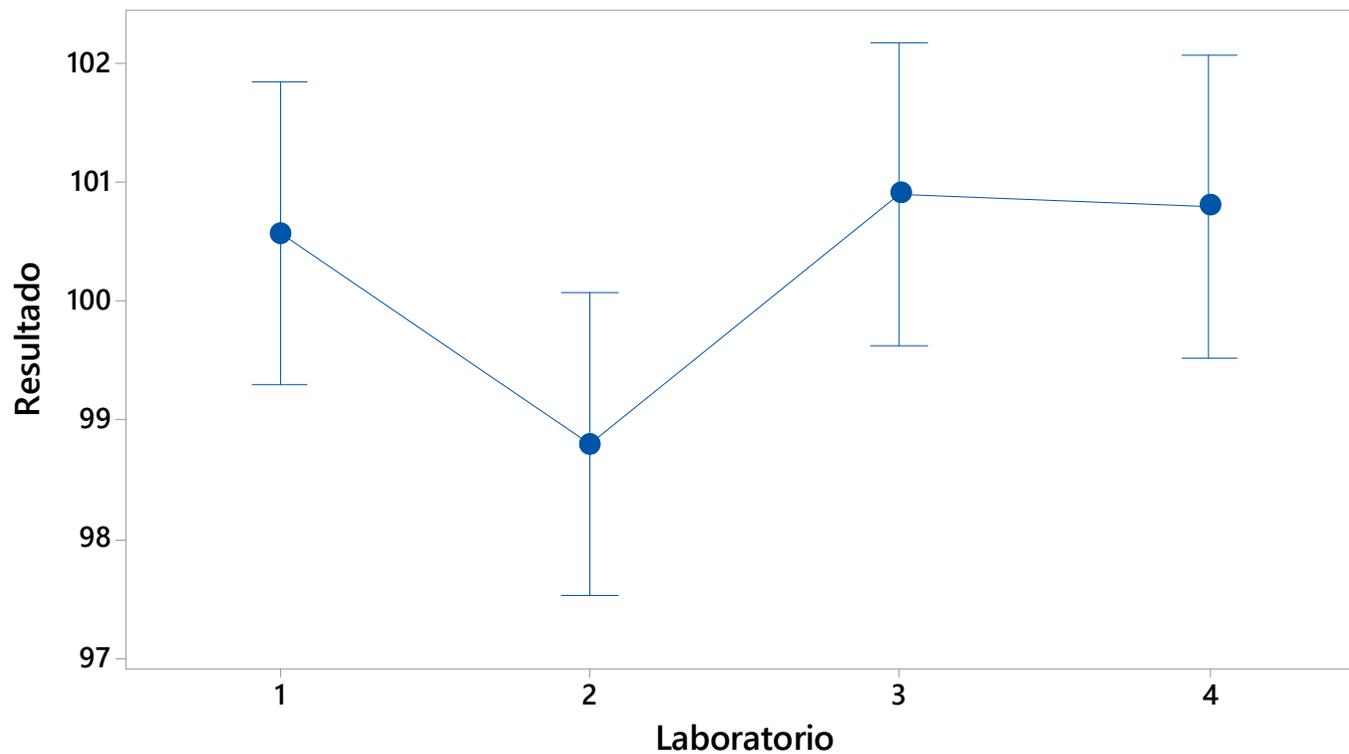
$$s_{Repe} = \sqrt{0,913} = 0,96$$

$$s_{PI} = \sqrt{QM_{Erro} + QM_{Dia}}$$

$$s_{PI} = \sqrt{0,913 + 2,927} = 1,96$$

# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

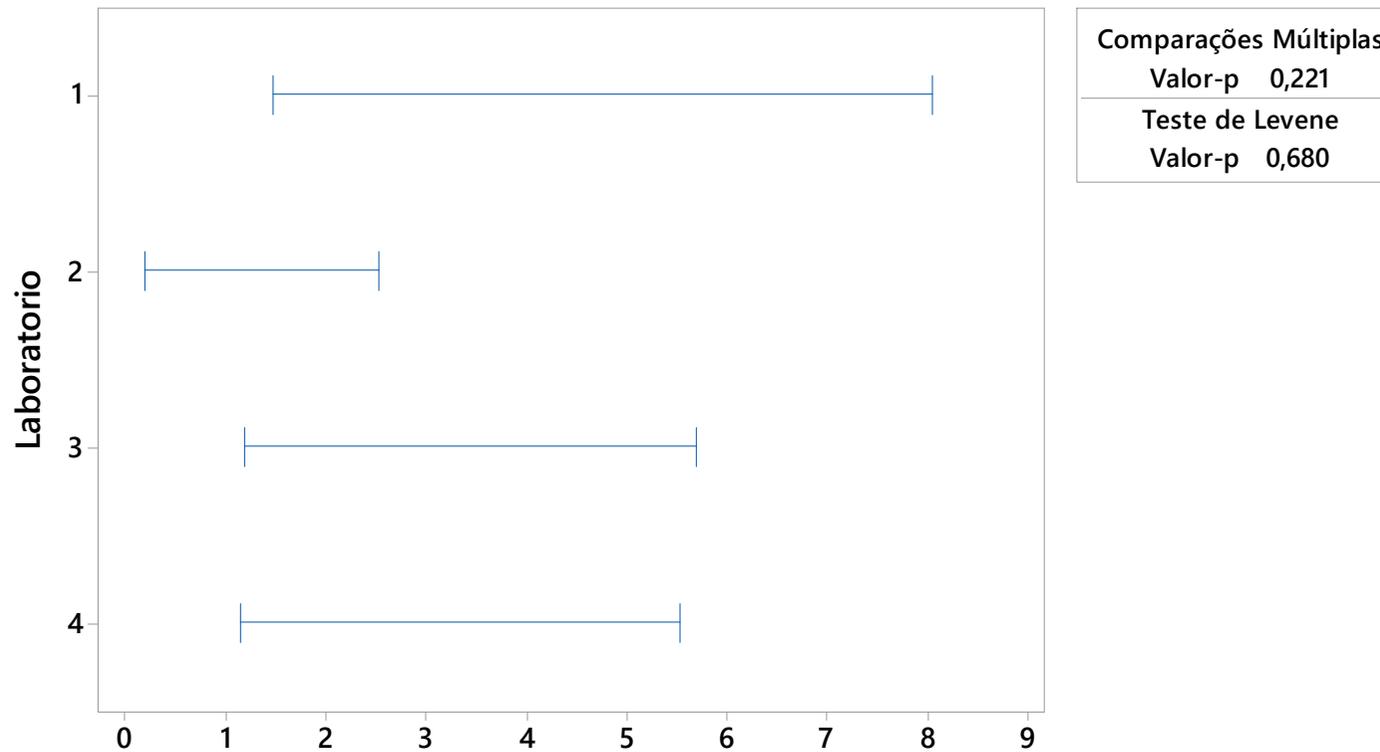
Gráfico de Intervalos de Resultado versus Laboratorio  
IC de 95% para a Média



*O desvio padrão combinado foi usado para calcular os intervalos.*

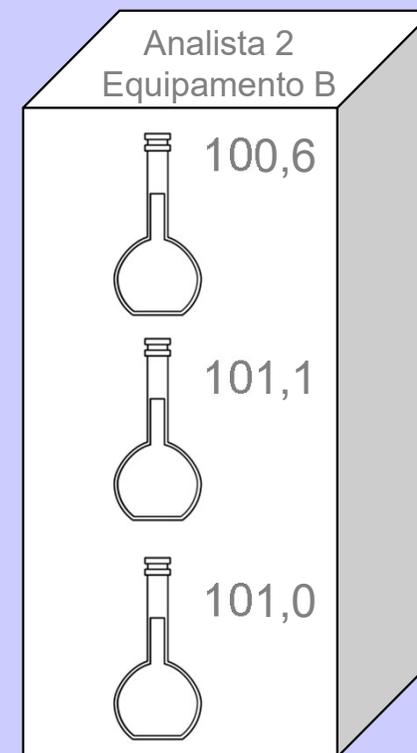
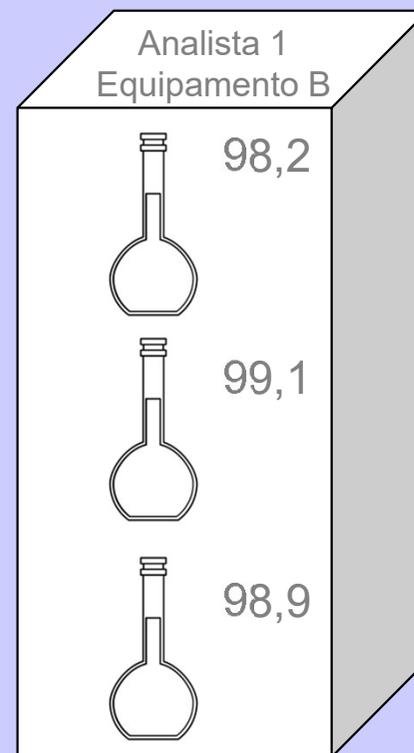
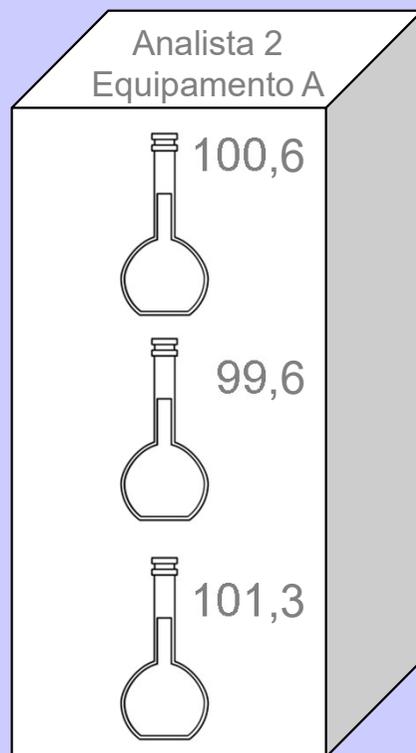
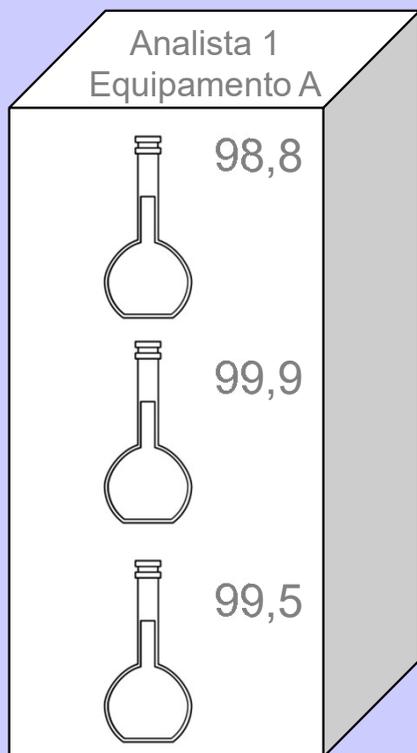
# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Teste para Igualdade de Variâncias: Resultado versus Laboratorio  
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão,  $\alpha = 0,05$



*Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.*

# PRECISÃO: ANOVA 2-FATORES



# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

## Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Analista	1	7,2075	7,2075	19,66	0,002
Equipamento	1	0,1408	0,1408	0,38	0,553
Analista*Equipamento	1	1,1408	1,1408	3,11	0,116
Erro	8	2,9333	0,3667		
Total	11	11,4225			

81,4%

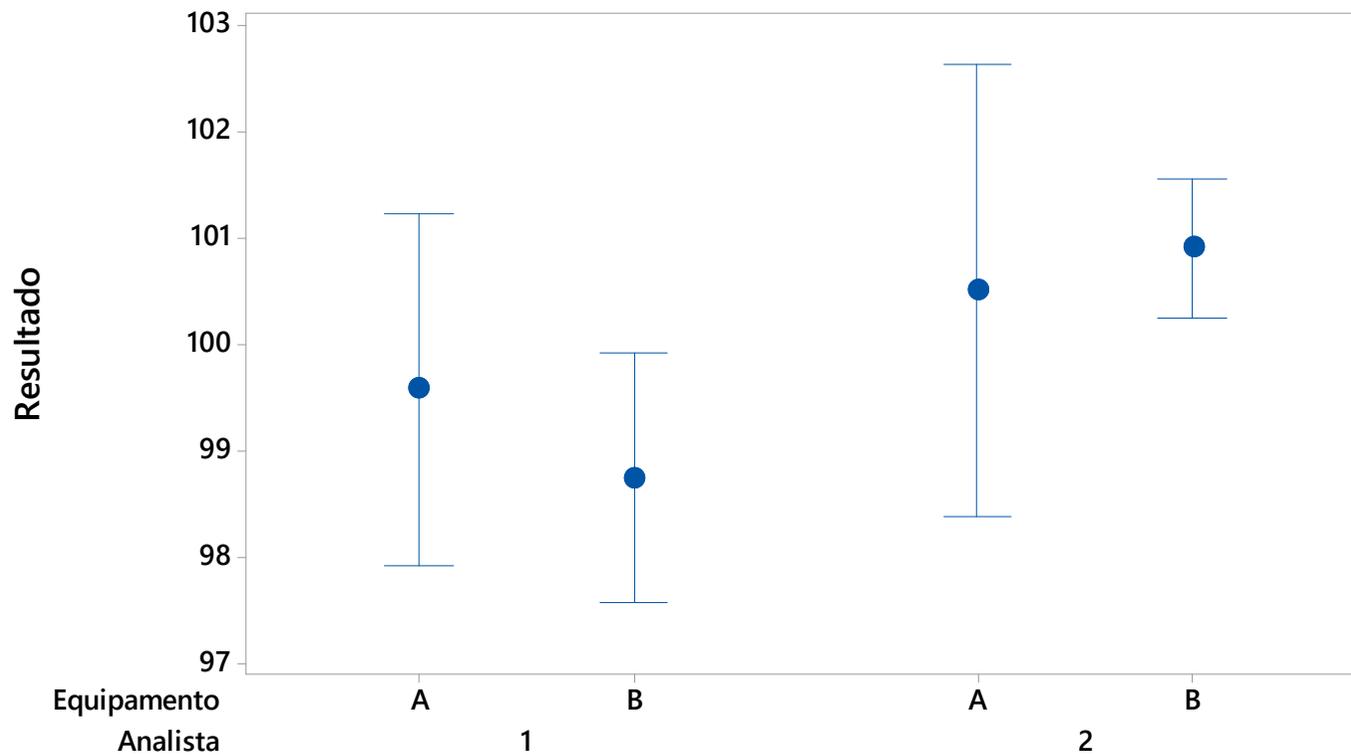
1,6%

12,9%

4,1%

# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Gráfico de Intervalos de Resultado  
IC de 95% para a Média

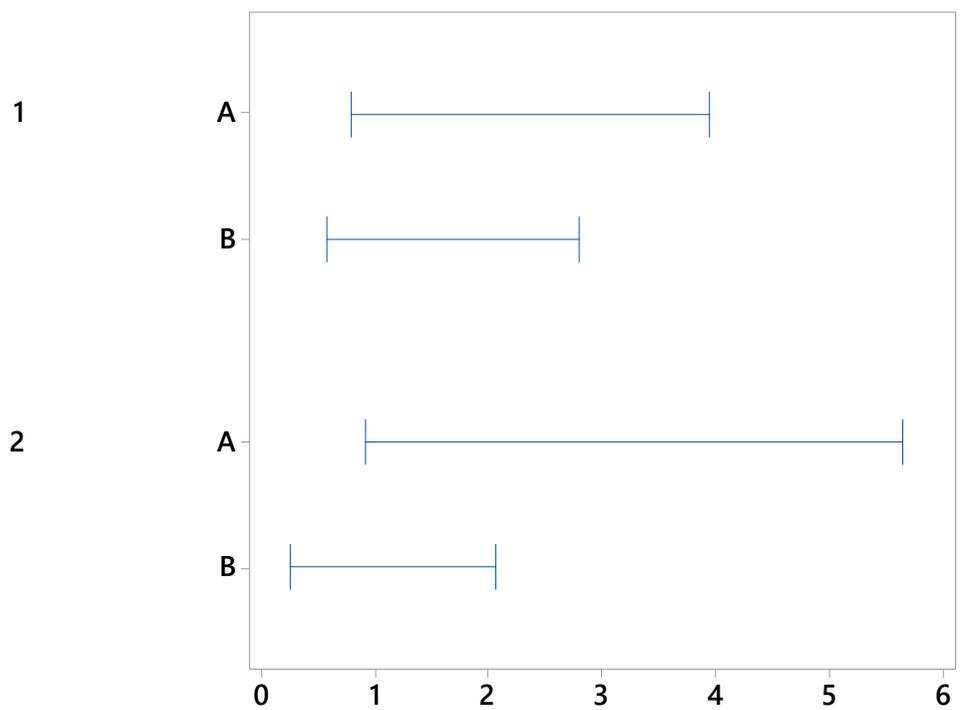


*Os desvios padrão individuais foram usados para calcular os intervalos.*

# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Teste para Igualdade de Variâncias: Resultado versus Analista; Equipamento  
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão,  $\alpha = 0,05$

Analista Equipamento

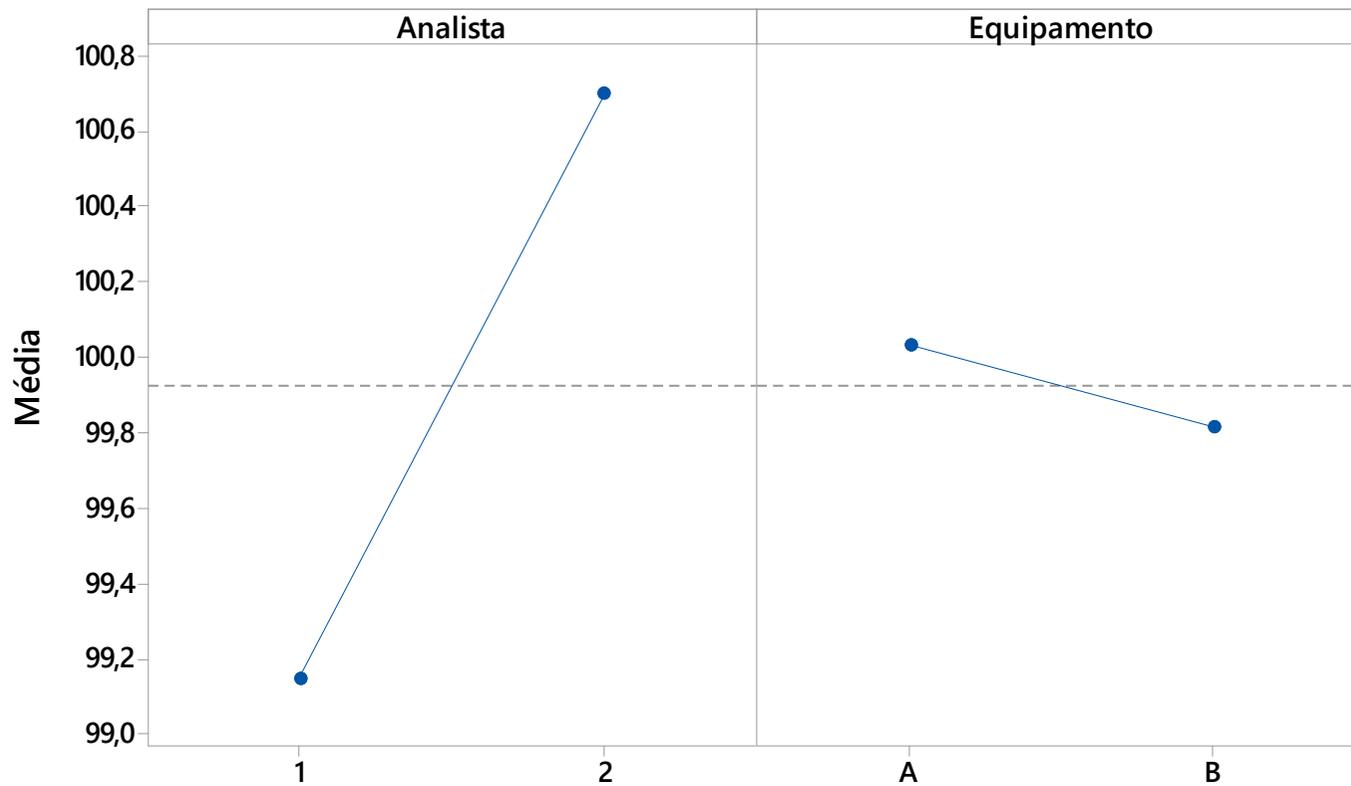


Comparações Múltiplas
Valor-p 0,431
Teste de Levene
Valor-p 0,742

*Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.*

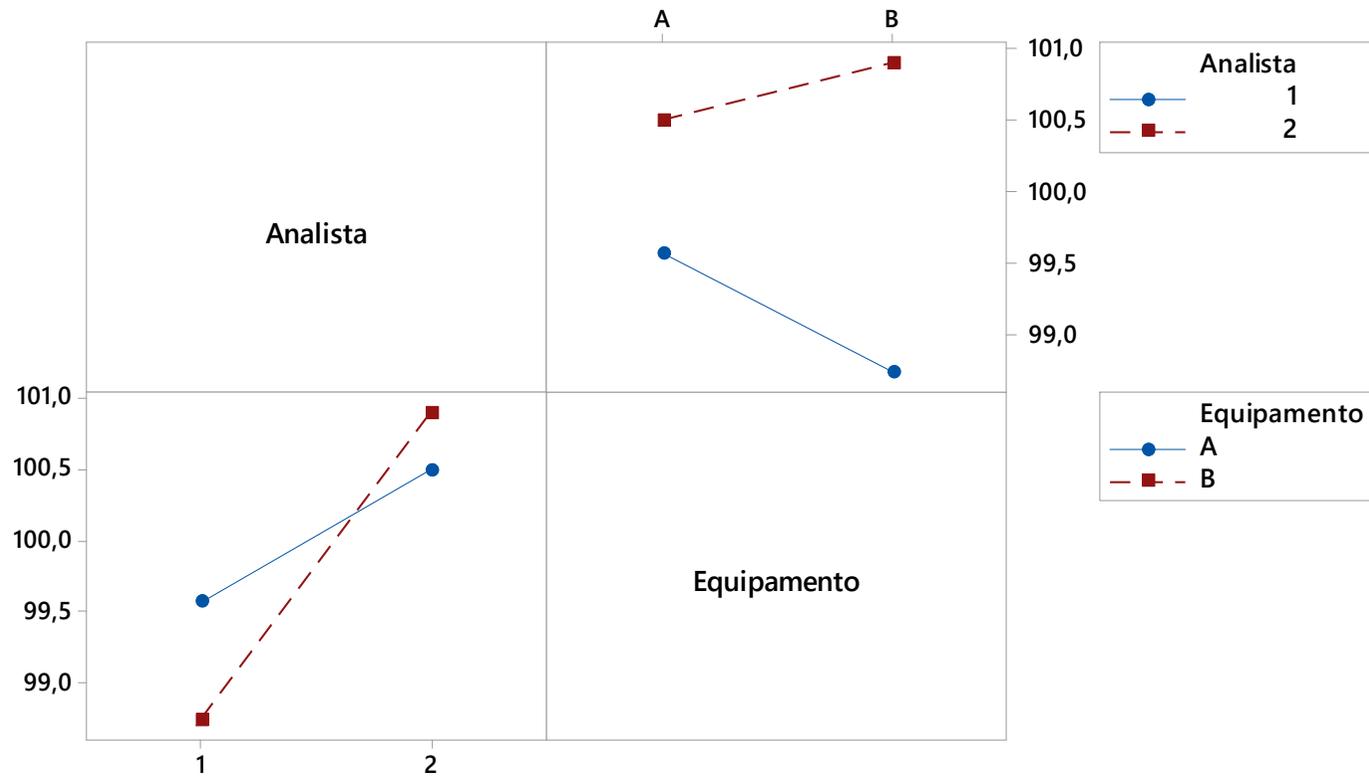
# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Gráfico de Efeitos Principais para Resultado  
Médias dos Dados

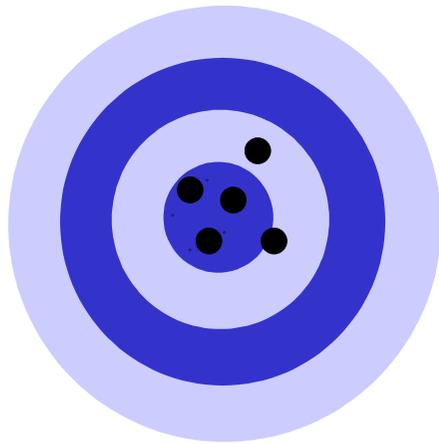


# REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

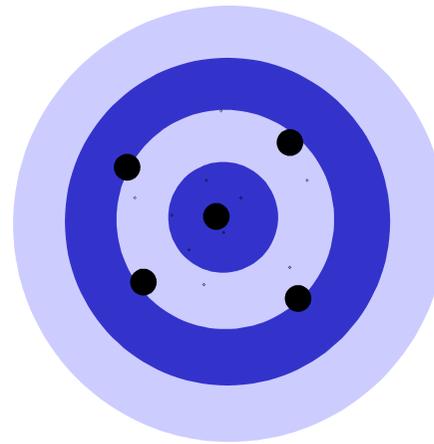
Gráfico de Interação para Resultado Médias dos Dados



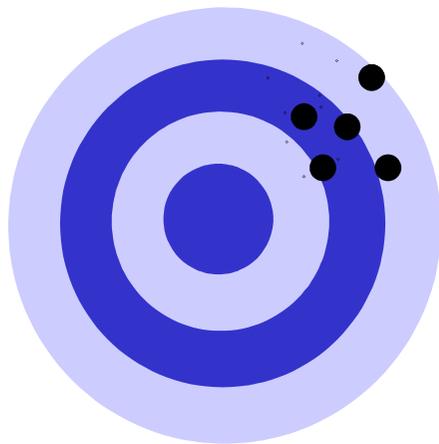
# EXATIDÃO (ACURÁCIA) X PRECISÃO DO MÉTODO



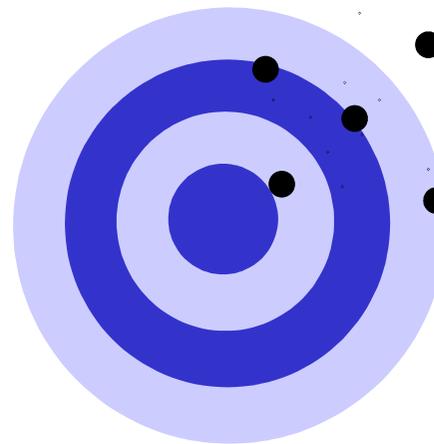
Exato  
Preciso



Exato  
Impreciso

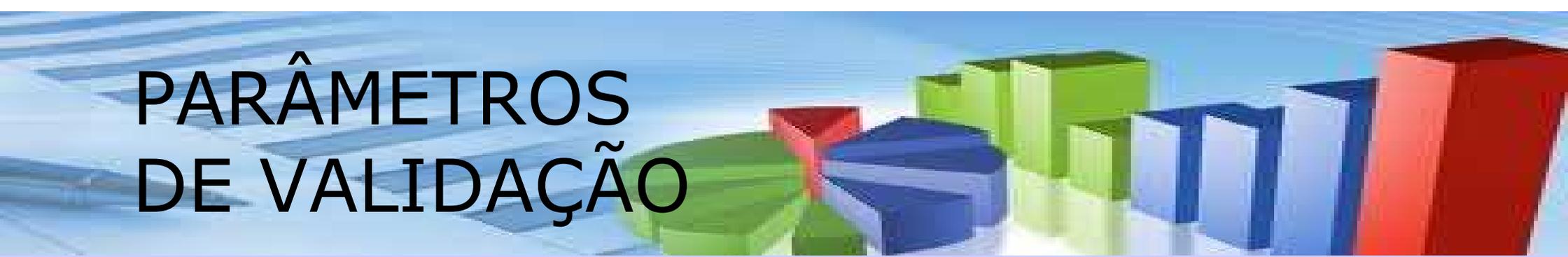


Inexato  
Preciso



Inexato  
Impreciso

# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



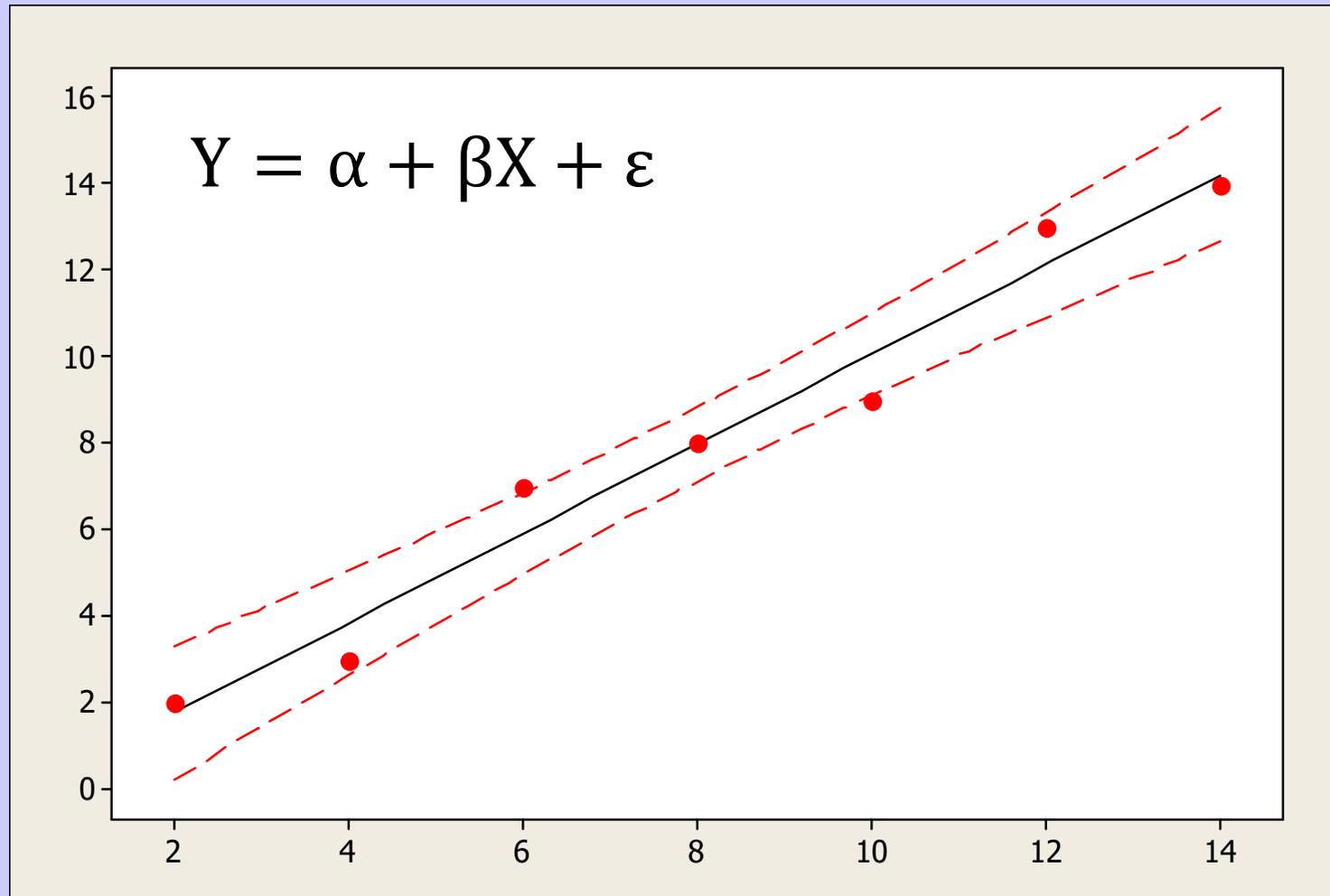
- Linearidade / Faixa linear
  - Capacidade do método de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado

# NOÇÕES DE REGRESSÃO?



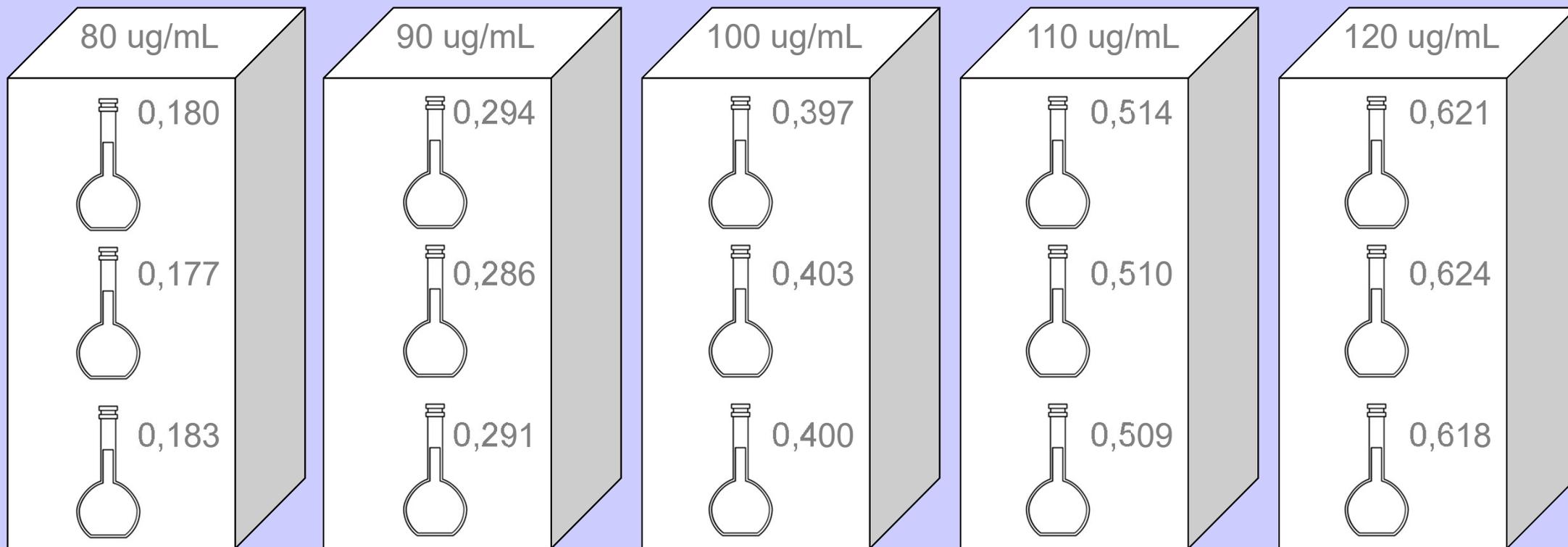
- Função de  $X$  que explica  $Y$
- Método dos mínimos quadrados
- Regressão linear simples:  $Y = a + bX$

# REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



Método dos mínimos quadrados

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



Minitab

→ Stat

→ Regressão

→ Gráfico de Linha Ajustada

→ Stat

→ Regressão

→ Regressão

→ Ajustar Modelo de Regressão

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	0,364762	0,364762	46672,32	0,000
Concentração	1	0,364762	0,364762	46672,32	0,000
Erro	13	0,000102	0,000008		
Falta de ajuste	3	0,000001	0,000000	0,03	0,992
Erro puro	10	0,000101	0,000010	*	*
Total	14	0,364864			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0027956	99,97%	99,97%	99,96%

### Coefficientes

Termo	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P	VIF
Constante	-0,70220	0,00515	-136,22	0,000	
Concentração	0,011027	0,000051	216,04	0,000	1,00

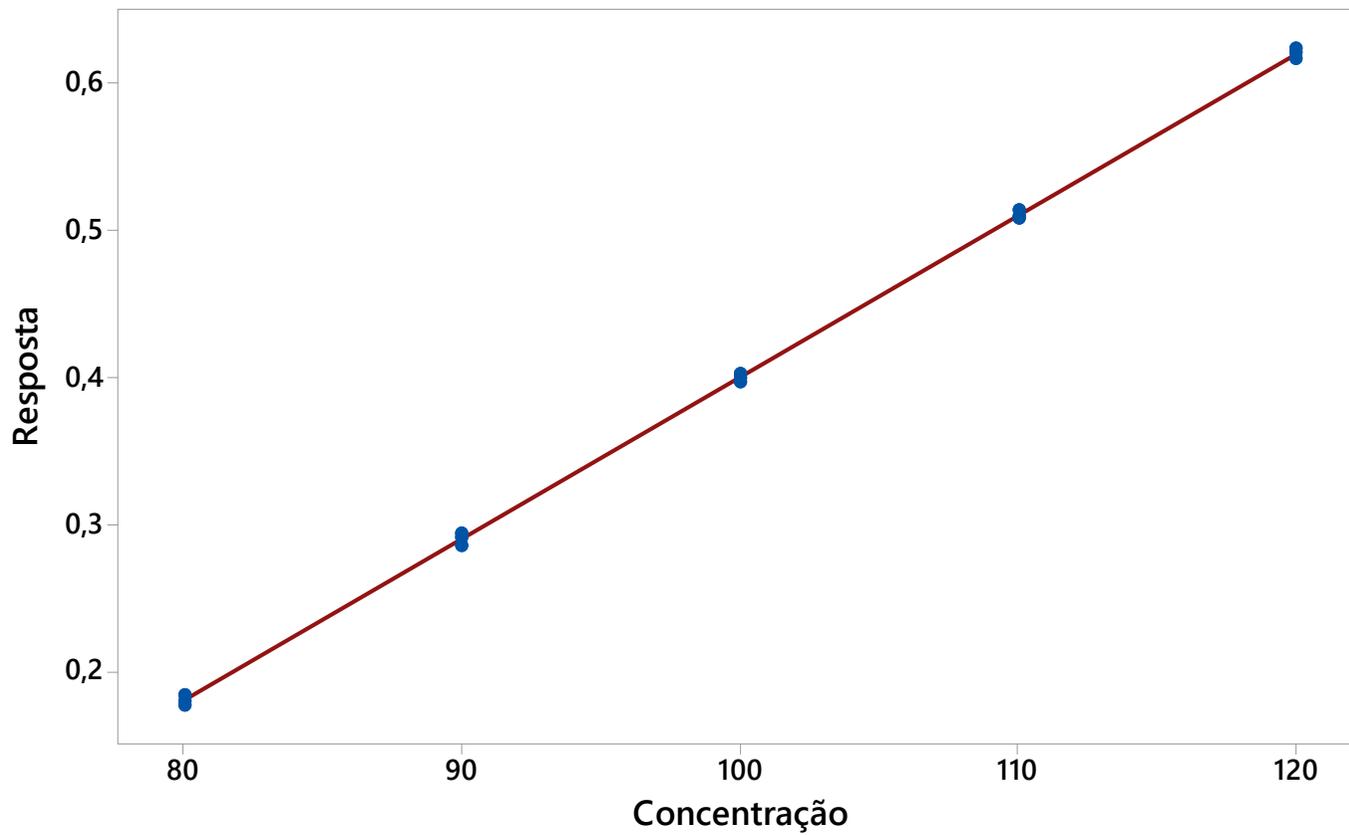
### Equação de Regressão

Resposta =  $-0,70220 + 0,011027$  Concentração

### Gráficos de Resíduo de Resposta

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

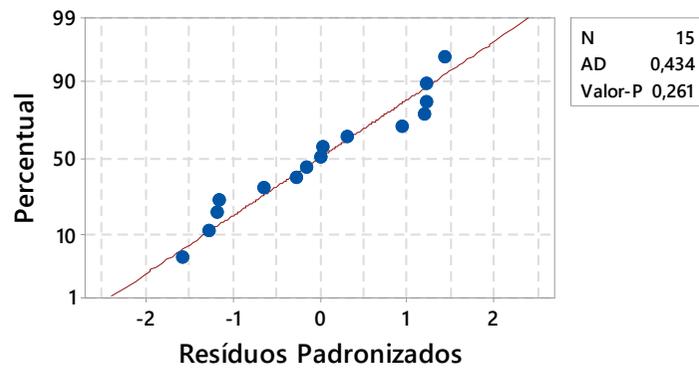
Gráfico de Dispersão de Resposta versus Concentração



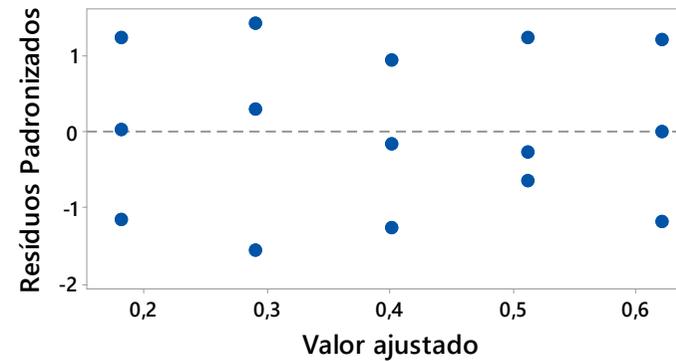
# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Gráficos de Resíduo de Resposta

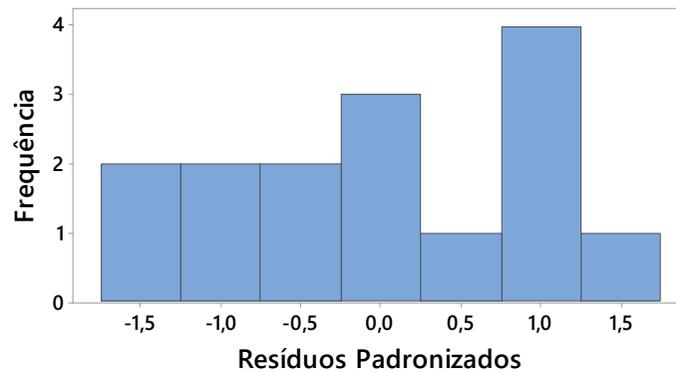
### Gráfico de Probabilidade Normal



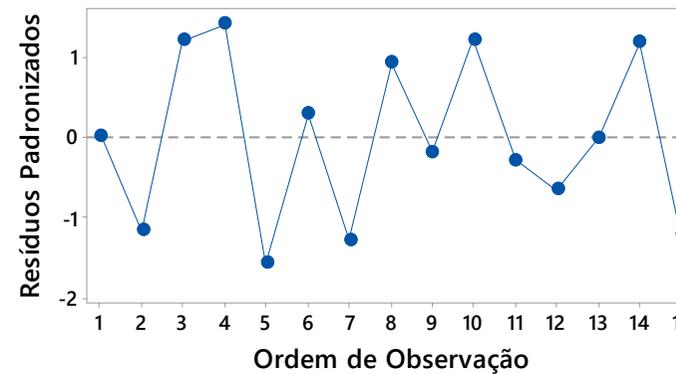
### Versus Ajustados



### Histograma

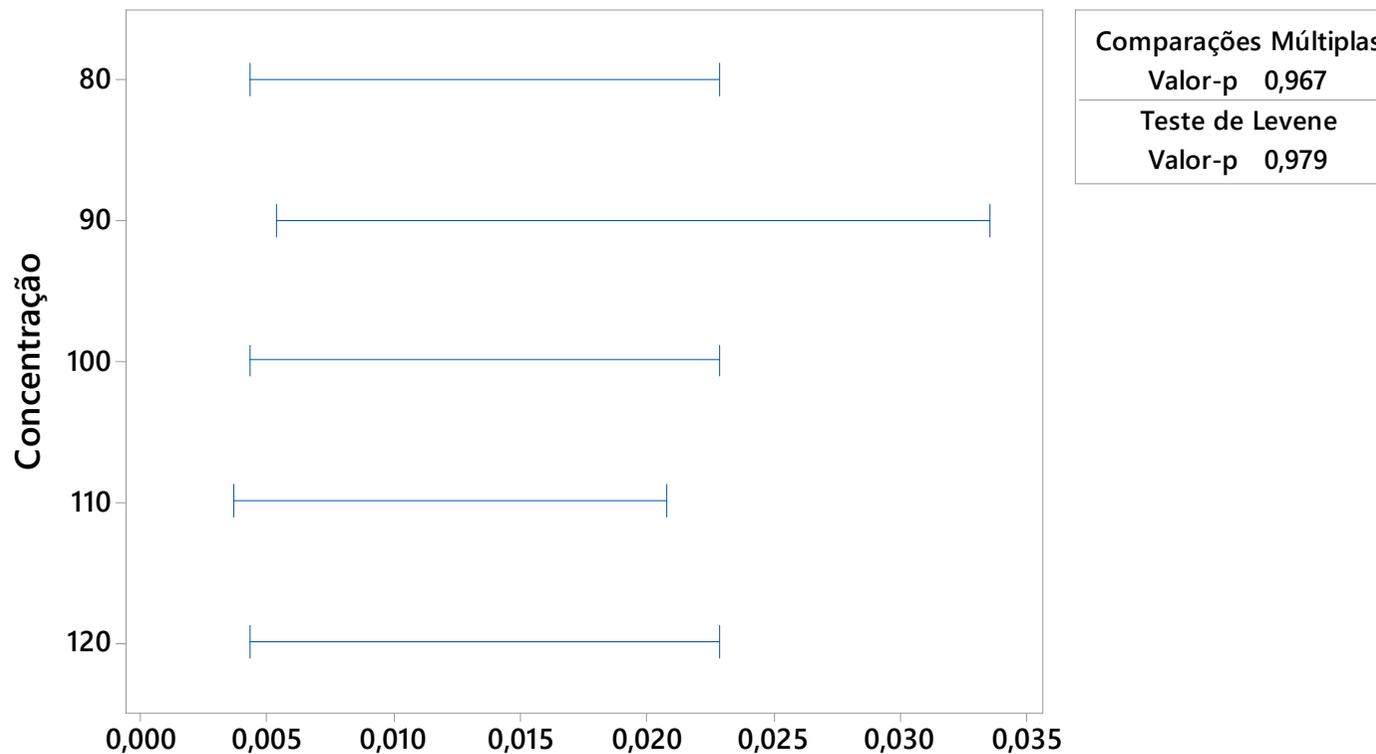


### Versus Ordem



# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Teste para Igualdade de Variâncias: Resposta versus Concentração  
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão,  $\alpha = 0,05$



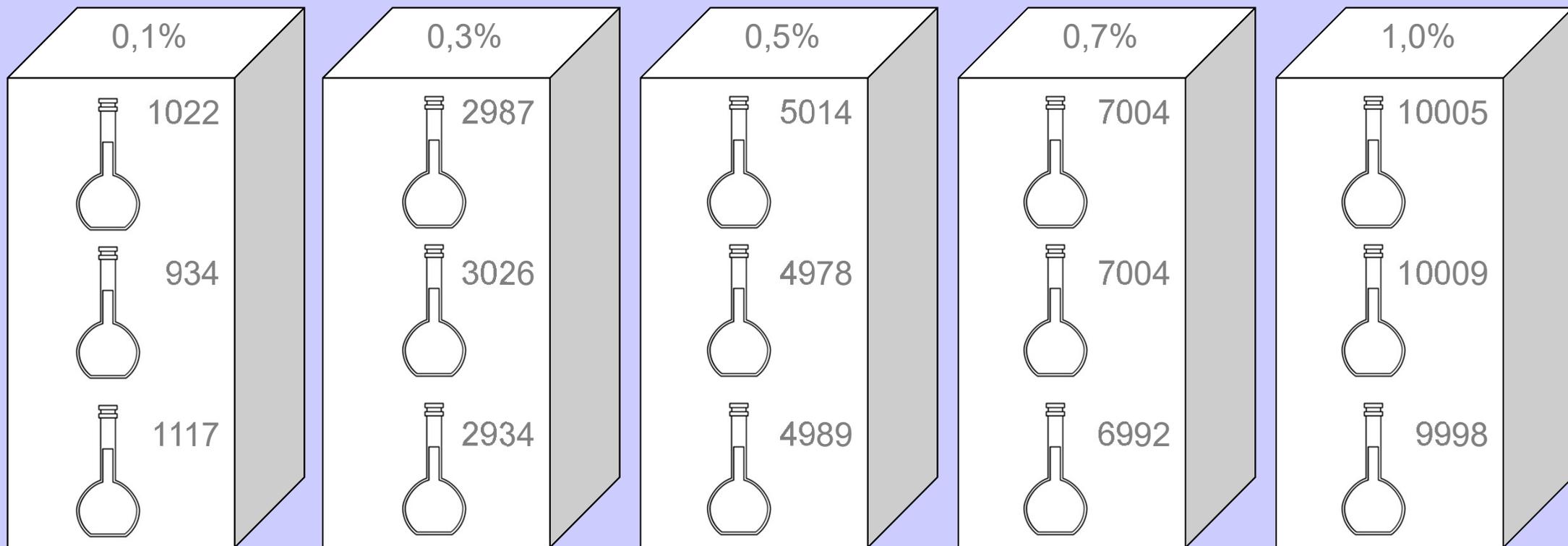
*Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.*

# PRESSUPOSIÇÕES BÁSICAS

A 3D bar chart with several bars of varying heights and colors (green, blue, red) set against a light blue background with a grid pattern.

1. Homocedasticidade
2. Independência dos dados
3. Distribuição normal

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	146142913	146142913	77189,93	0,000
Concentração	1	146142913	146142913	77189,93	0,000
Erro	13	24613	1893		
Falta de ajuste	3	2757	919	0,42	0,742
Erro puro	10	21856	2186	*	*
Total	14	146167526			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
43,5120	99,98%	99,98%	99,98%

### Coefficientes

Termo	Coef	EP de		Valor-T	Valor-P	VIF
		Coef	Coef			
Constante	5,4	21,8	0,25	0,25	0,807	
Concentração	9991,2	36,0	277,83	277,83	0,000	1,00

### Equação de Regressão

Resposta = 5,4 + 9991,2 Concentração

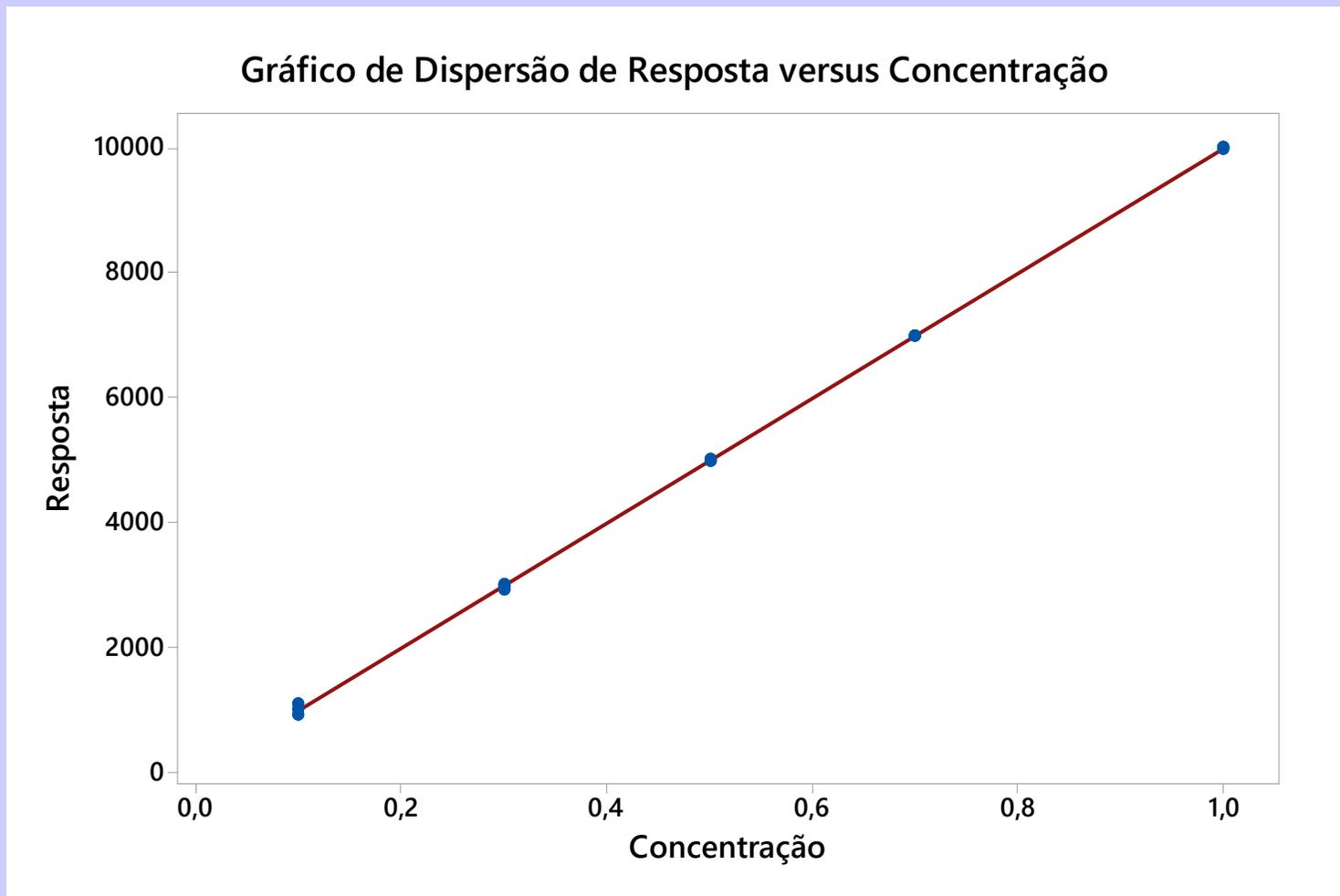
### Ajustados e Diagnósticos para Observações Atípicas

Obs.	Resposta	Ajuste	Resid	
			Resid	Pad
3	1117,0	1004,6	112,4	2,87 R

R Resíduo grande

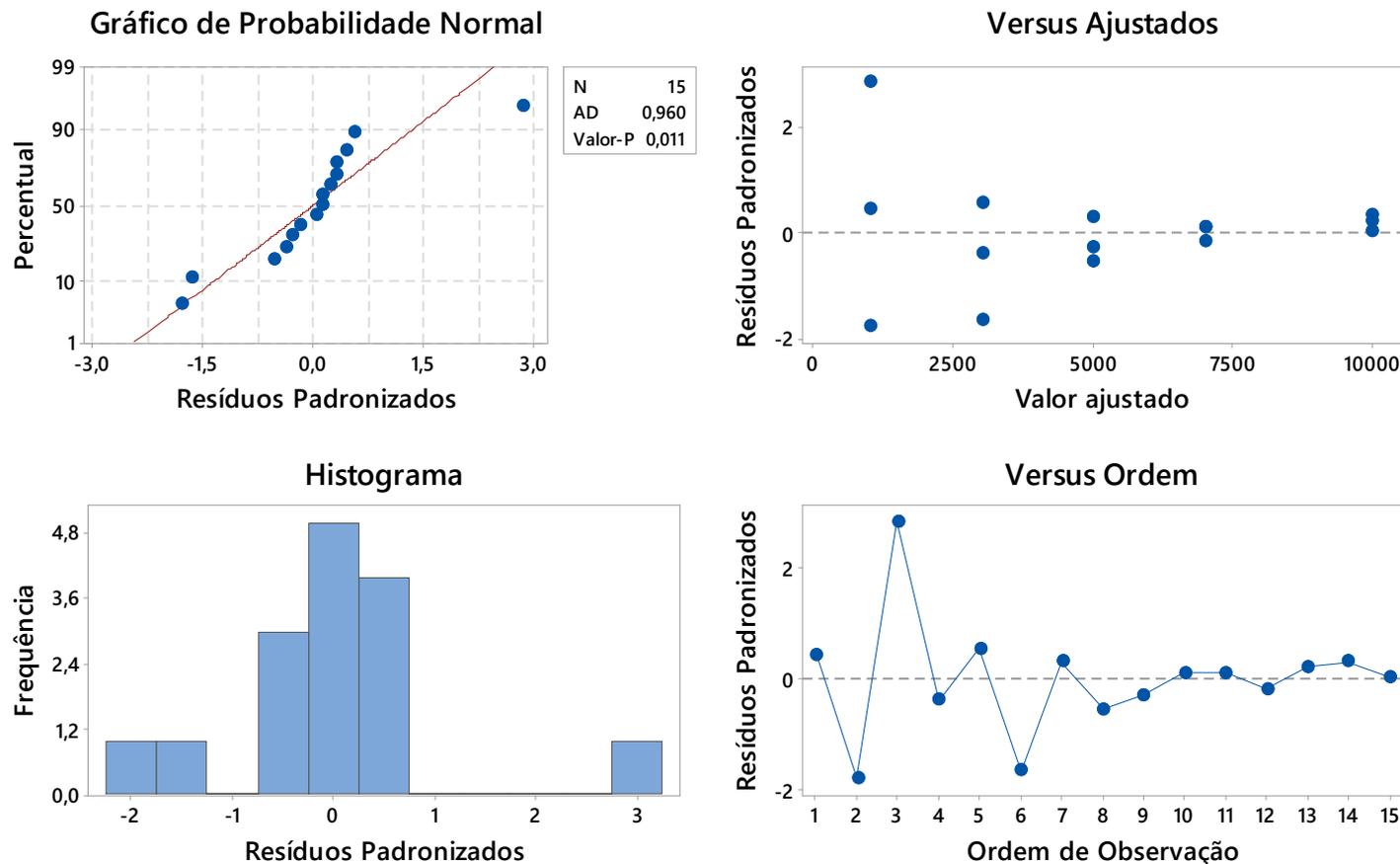
### Gráficos de Resíduo de Resposta

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES



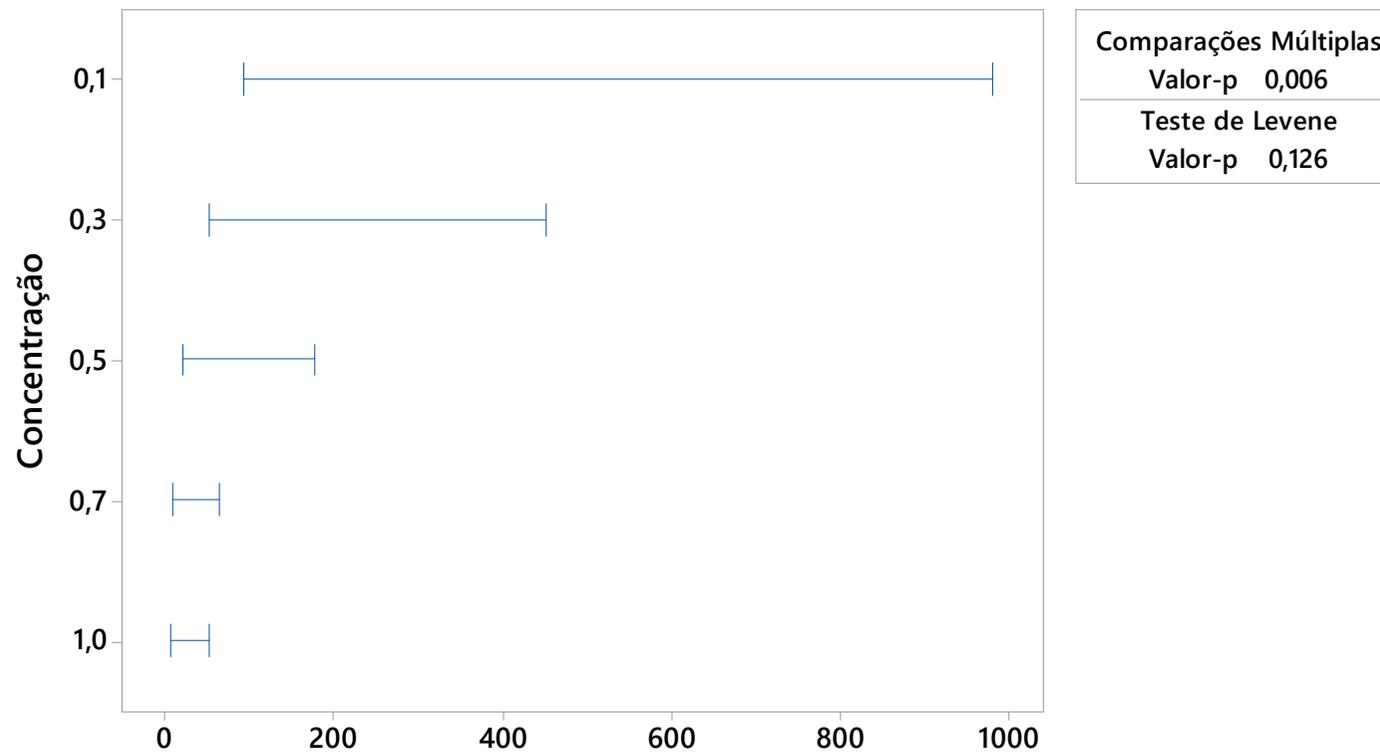
# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Gráficos de Resíduo de Resposta



# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

Teste para Igualdade de Variâncias: Resposta versus Concentração  
Intervalos de comparação múltipla para o desvio padrão,  $\alpha = 0,05$



*Se os intervalos não se sobrepuserem, os desvios padrão correspondentes serão significativamente diferentes.*

# REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PONDERADOS

Pesos usualmente utilizados

$$\frac{1}{X}$$

$$\frac{1}{X^2}$$

$$\frac{1}{Y}$$

$$\frac{1}{Y^2}$$

$$\frac{1}{s^2}$$

$$\frac{1/s_i^2}{n \sum_i^n 1/s_i^2}$$

# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Análise de Regressão: Resposta versus Concentração

### Método

Pesos w

### Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Regressão	1	1872588	1872588	645869,91	0,000
Concentração	1	1872588	1872588	645869,91	0,000
Erro	13	38	3		
Falta de ajuste	3	2	1	0,22	0,878
Erro puro	10	35	4	*	*
Total	14	1872626			

### Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
1,70274	100,00%	100,00%	100,00%

### Coefficientes

Termo	Coef	EP de		Valor-T	Valor-P	VIF
		Coef	Valor-T			
Constante	-11,6	10,9	-1,06	0,308		
Concentração	10015,7	12,5	803,66	0,000	1,00	

### Equação de Regressão

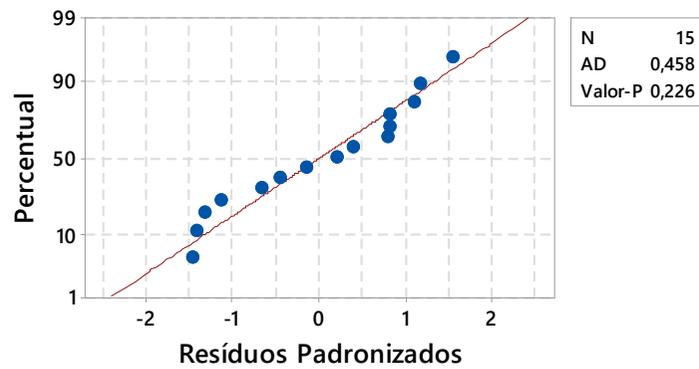
Resposta = -11,6 + 10015,7 Concentração

### Gráficos de Resíduo de Resposta

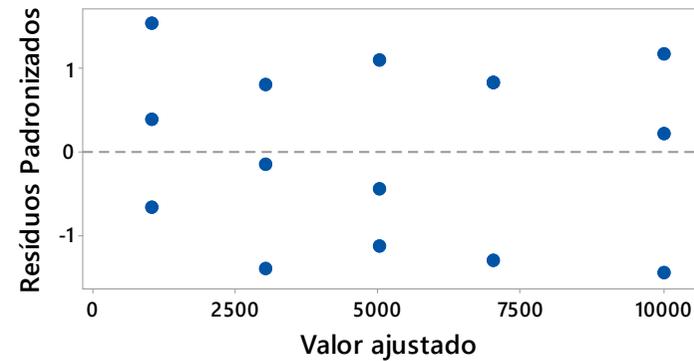
# LINEARIDADE: REGRESSÃO LINEAR SIMPLES

## Gráficos de Resíduo de Resposta

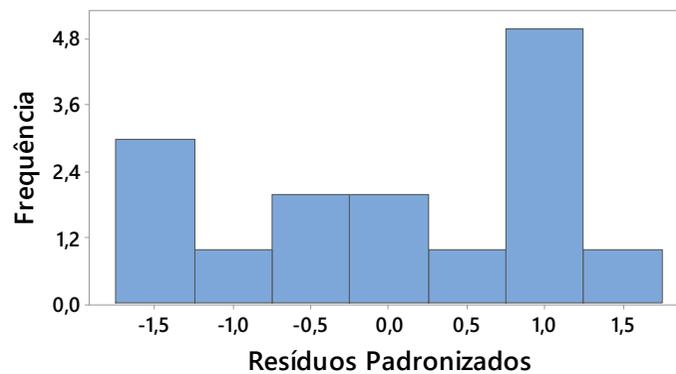
### Gráfico de Probabilidade Normal



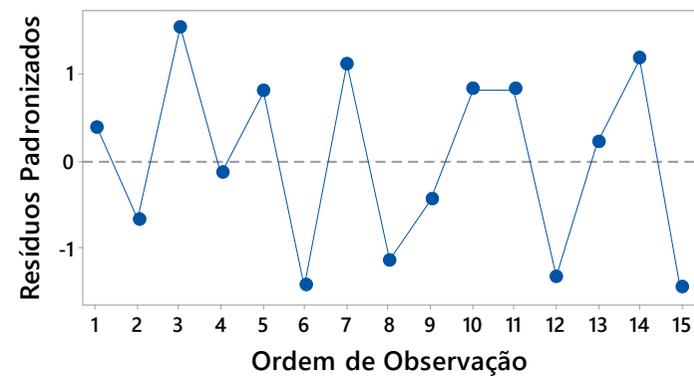
### Versus Ajustados



### Histograma



### Versus Ordem

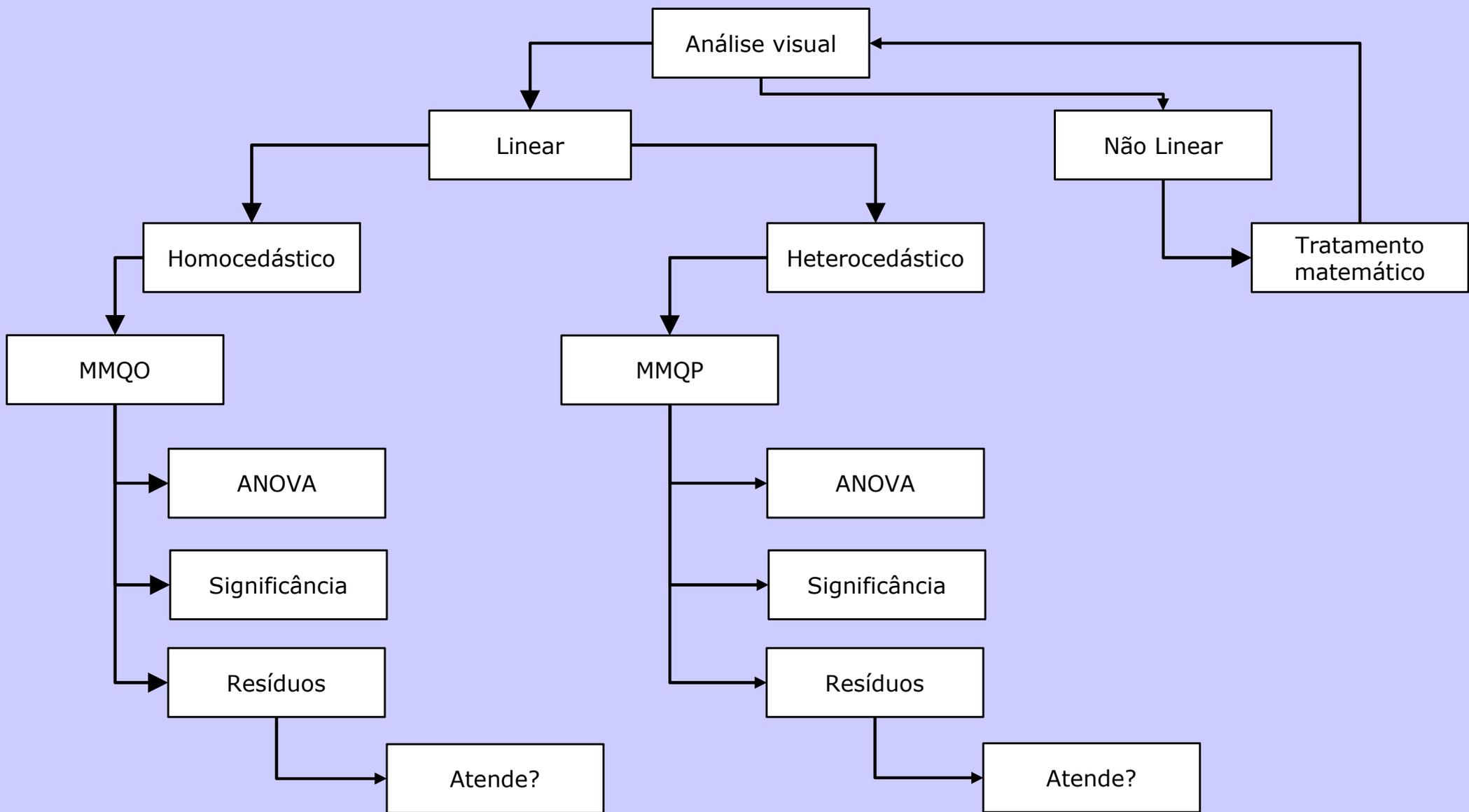


# ADEQUAÇÃO DO AJUSTE LINEAR

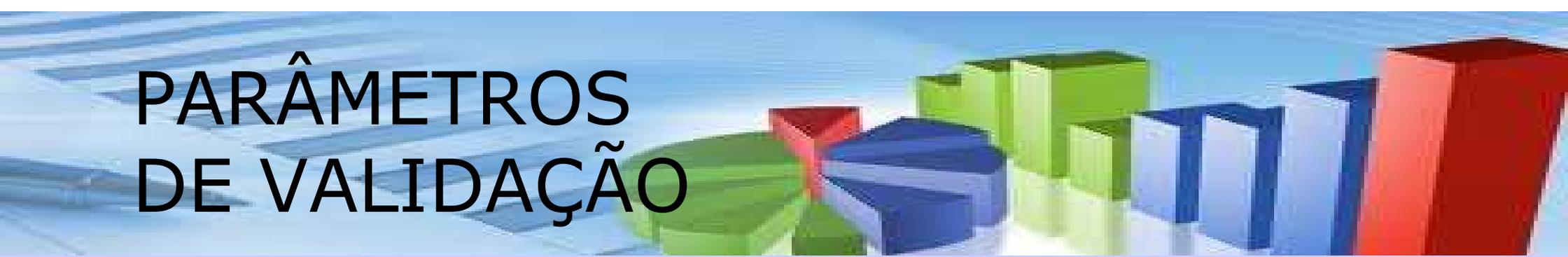
A 3D bar chart with several bars of varying heights and colors (green, blue, red) set against a light blue background with a grid pattern.

1. Significância da regressão
2. Análise dos resíduos
3. Erro puro e falta de ajuste
4. Coeficiente de determinação ( $R^2$ )

# REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS

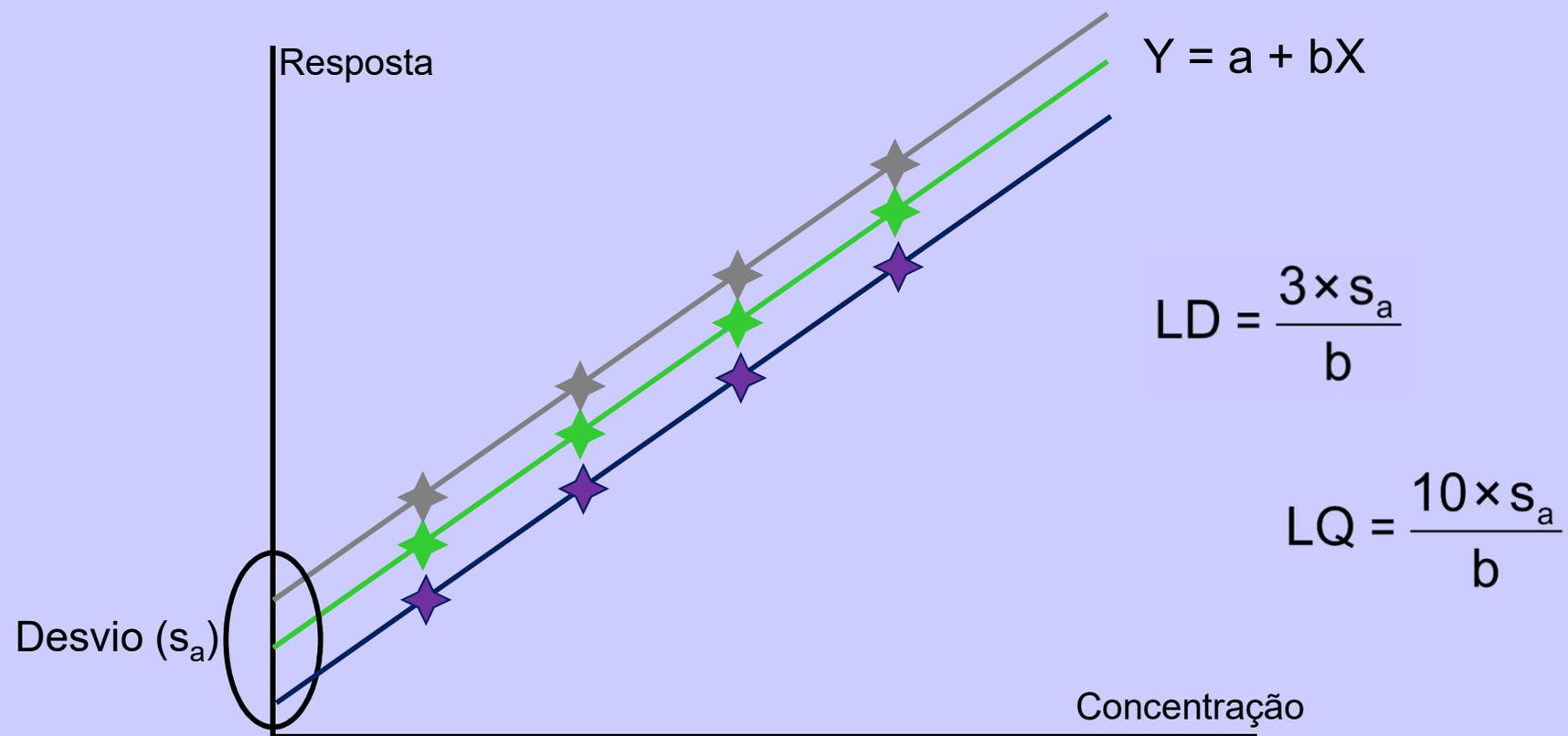


# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

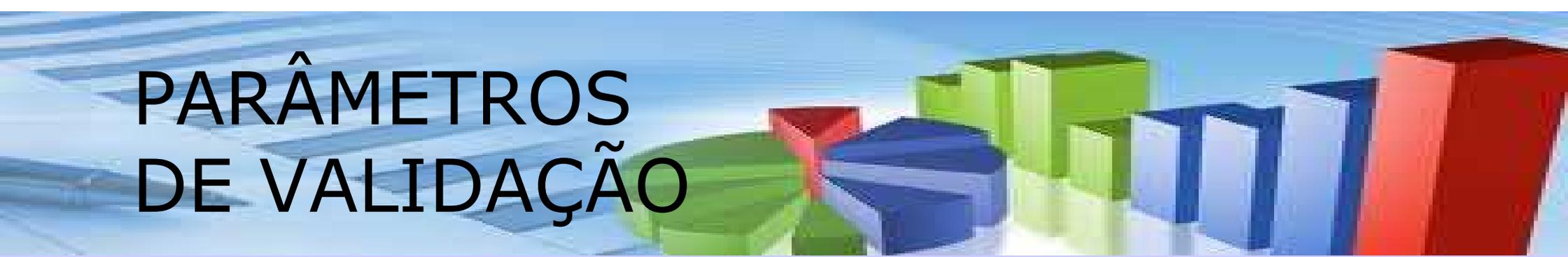


- Limite de Detecção / Quantificação
  - Detecção: menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser detectada
  - Quantificação: menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser quantificada

# LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) / LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)



# PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO



- Robustez
  - É a medida de capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

# ROBUSTEZ DO MÉTODO ANALÍTICO

## Espectrofotometria

- ✓Variação de pH
- ✓Temperatura
- ✓Diferentes fabricantes de solventes
- ✓Variação do comprimento de onda

## Cromatografia Líquida

- ✓Variação de pH da FM
- ✓Variação da composição da FM
- ✓Temperatura
- ✓Diferentes colunas
- ✓Fluxo da FM

## Cromatografia Gasosa

- ✓Temperatura
- ✓Diferentes colunas
- ✓Velocidade do gás de arraste
- ✓Modo de injeção

## Doseamento biológico

- ✓Variação de pH e composição do meio
- ✓Temperatura e tempo de incubação
- ✓Volume da camada inoculada
- ✓Tipo e concentração do inóculo
- ✓Pré-difusão / Pré-incubação

# VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO



## **Nas condições otimizadas**

- Especificidade/seletividade
- Linearidade
- Exatidão
- Precisão
- LD/LQ (quando aplicável)
- Faixa
- Robustez

## **Na região de operação do método (MODR)**

- Exatidão
- Precisão

# ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Devem ser estabelecidas considerando:

- O conhecimento obtido durante a etapa de desenvolvimento e validação (MODR);
- Pode incluir carta controle de parâmetros críticos (resolução entre picos, tempo de retenção, etc.);
- Garantia de boa relação entre o propósito do método e a sua performance (atendimento ao ATP).

# MELHORIA CONÍNUA



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. Ribeirão Preto: Funpec Editora, 2002.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- CAMPOS, M.S. Desvendando o Minitab. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2003.
- CIENFUEGOS, F. Estatística aplicada ao laboratório. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.
- LEITE, F. Validação em análise química. 4ª Ed. Campinas: Editora Átomo, 2002.
- MONTGOMERY, D.C. Introdução ao controle estatístico da qualidade. 4ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2004.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. Princípios de bioestatística. São Paulo: Pioneira Thompson Learning, 2004.
- VIEIRA, S. Análise de variância (ANOVA). São Paulo: Atlas, 2006.
- VIEIRA, S. Bioestatística: tópicos avançados. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1980.



# OBRIGADO!!!

Felipe R. Lourenço  
feliperl@usp.br