



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

RAFAEL CALDAS PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE MANITOL PELO MÉTODO POLARIMÉTRICO**

CAMPINA GRANDE
2011

RAFAEL CALDAS PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE MANITOL PELO MÉTODO POLARIMÉTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de artigo científico ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de bacharel no curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

CAMPINA GRANDE

2011

P436d

Pereira, Rafael Caldas.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de manitol pelo método polarimétrico.[manuscrito] / rafael caldas pereira. – 2011.

17 f.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart De Lima Damasceno, Departamento de Farmácia”.

1. D-manitol. 2. Validação. 3. Polarimetria. I. Título.

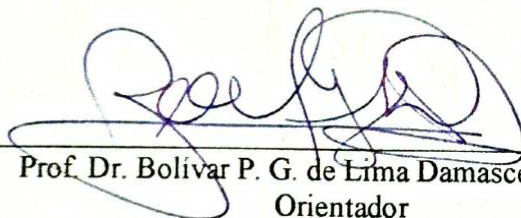
21. ed. CDD 615.4

RAFAEL CALDAS PEREIRA

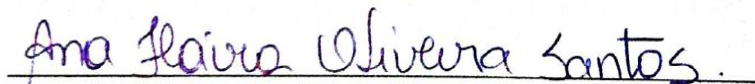
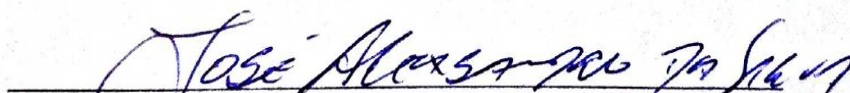
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE MANITOL PELO MÉTODO POLARIMÉTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
forma de artigo científico ao Departamento de
Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba,
como requisito para obtenção do título de
bacharel no curso de Farmácia.

Aprovado em 22/11/2011.



Prof. Dr. Bolivar P. G. de Lima Damasceno / UEPB
Orientador


Prof.ª Msc. Ana Flávia Oliveira Santos / UEPB
Examinadora
Prof. Dr. José Alessandro da Silva / UEPB
Examinador

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para esse trabalho.

À Deus, pela vida, por estar sempre no meu caminho, iluminando e guiando às escolhas certas.

À minha família, por acreditarem em mim, me ensinado a sonhar alto e, principalmente, por ter me oferecido condições para realizar estes sonhos. A você, o mérito de minhas conquistas!

Aos amigos, especialmente a turma Farmácia 2007.1, pelo apoio de sempre.

Ao meu orientador e amigo Professor Bolívar Damasceno pelo tempo e paciência a mim dedicados.

Ao amigo Leonardo Landim, pela confiança, por seu conhecimento e apoio durante todo o estágio.

À Farmace (Indústria Química Farmacêutica Cearense), local de realização deste trabalho, por ter cedido o laboratório e todas as condições para a conclusão do mesmo.

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito”.

(Aristóteles)

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE MANITOL PELO MÉTODO POLARIMÉTRICO

PEREIRA, R.C¹; LANDIM, L.P²; DAMASCENO, B.P.G.L³

RESUMO

O D-manitol é um carboidrato bastante difundido na natureza e uma matéria-prima de baixo custo, sua utilização encontra-se amplamente distribuída em vários campos, incluindo cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos, síntese orgânica, têxtil, dentre outros. O uso do CLAE para determinação do manitol é recomendado por algumas monografias oficiais, como a farmacopéia americana e a britânica, porém tal método não se mostra vantajoso devido a inúmeros fatores, tais como o tempo de análise, elevado custo e alta complexidade. Neste contexto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de solução parenteral manitol 20% e manitol matéria-prima pelo método polarimétrico, tendo em vista a simplicidade, rapidez, baixo custo e confiabilidade nos resultados obtidos por essa técnica. A validação da metodologia analítica é parte essencial para garantir a eficácia de um método. Os parâmetros investigados no processo de validação foram linearidade, exatidão, robustez, precisão, intervalo e especificidade. Os resultados obtidos comprovaram que o método é linear, preciso, exato e robusto, apresentando resultados reprodutíveis e confiáveis.

Palavras-chave: D-manitol, polarimetria, validação.

ABSTRACT

The D-mannitol is a carbohydrates widespread in nature and a raw material for low cost, its use is widely distributed in various fields, including cosmetics, food, pharmaceutical, organic synthesis, textile, among others. The use of HPLC for determination of mannitol is recommended by some official monographs, such as the American and British Pharmacopoeia, but this method is not advantageous due to several factors, such as analysis time, high cost and high complexity. In this context, this study aimed at the development and validation of analytical methodology for determination of 20% mannitol parenteral solution and mannitol raw material by polarimetric method, with a view to simplicity, speed, low cost and reliability of results obtained by this technique. The validation of analytical methodology is an essential part to ensure the effectiveness of a method. The parameters investigated in the validation process were linearity, accuracy, robustness, precision, range, and specificity. The results obtained proved that the method is linear, precise, accurate and robust, with reproducible and reliable results.

Keywords: D-mannitol, polarimetry, validation.

¹ Aluno de graduação do curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (rafaelcaldas@hotmail.com).

² Aluno de mestrado em bioprospecção molecular da Universidade Regional do Cariri (leo_landim@hotmail.com).

³ Professor Doutor do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (bolivarpagd@hotmail.com).

INTRODUÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, 2004).

A validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros (ANVISA, 2003).

A escolha do método analítico depende do objetivo da análise, ou seja, quantitativa, semi-quantitativa ou qualitativa. Além disso, outros fatores a serem considerados incluem a complexidade da amostra, sua pureza e teor (BREIER, 2007).

No Brasil, a legislação em vigor é a Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003, a qual estabelece parâmetros para a validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2003).

É de responsabilidade do analista identificar quais parâmetros devem ser avaliados para determinado método (EMER, 2001).

Para que os resultados obtidos através de estudos experimentais sejam confiáveis, a validação deve apresentar: especificidade, linearidade, intervalo, sensibilidade, limite de quantificação, precisão e exatidão (PRADO, *et al*, 2006).

Segundo Prado *et al* (2006), a linearidade é um parâmetro utilizado para verificar se os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra estudada em um intervalo de concentração apropriada. Ela pode ser representada pela curva de calibração (relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito), e é recomendado pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro e é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão) (RIBANI *et al*, 2004).

A robustez é a medida da capacidade que o método apresenta em se manter inalterável através de pequenas, mas deliberadas modificações em seus parâmetros e fornecer indicações de segurança durante o uso normal (SANTANA *et al*, 2007). De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face as pequenas variações.

Precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão deve ser considerada em três níveis (ANVISA, 2003).

a) Repetibilidade: Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Por considerar a mesma condição, é também chamada de precisão intra-corrída (ANVISA, 2003).

b) Precisão intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. É denominada, também, por precisão inter-corrídas (ANVISA, 2003).

c) Reprodutibilidade: é a concordância entre resultados obtidos em diferentes laboratórios como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. É a precisão inter-laboratorial (ANVISA, 2003).

Segundo a Portaria 899 da ANVISA, especificidade e seletividade são sinônimos, sendo a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

O D-manitol é um carboidrato natural encontrado em diversos vegetais, como beterraba, cebola, aipo, figo e azeitonas. Além disso, está presente em alguns exsudatos de árvores e algas marinhas, dos quais pode ser obtido por meio de extração com álcool a quente (OLIVEIRA; FERREIRA; SOUZA, 2009).

Na indústria farmacêutica, é usado como excipiente em comprimidos, especialmente aqueles destinados a se dissolverem na boca, devido à agradável sensação de doçura e frescor. Por não ser higroscópico, é aconselhável em comprimidos contendo compostos sensíveis à umidade, tais como ácido acetilsalicílico e vitamina C, além de possuir excelentes propriedades de compressão mecânica (OLIVEIRA; FERREIRA; SOUZA, 2009).

Algumas monografias oficiais, como a USP 34 (2011) e a britânica (2010), indicam o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do manitol, porém esse

método requer uso de equipamento de custo elevado além de procedimento complexo e demorado.

A quantificação do manitol como matéria-prima e em produtos farmacêuticos carece do desenvolvimento e validação de um método analítico que possa ser adaptado à rotina de análises de controle de qualidade da matéria-prima e produto acabado.

O uso da polarimetria surge como uma boa alternativa, pois se trata de uma técnica de execução rápida e de baixo custo em comparação a técnicas mais complexas como a CLAE. A rotação específica é utilizada como critério de identidade e pureza de algumas substâncias e as farmacopéias estabelecem os limites específicos para algumas delas. A rotação específica ou poder rotatório específico é determinado através da polarimetria, que é uma técnica baseada na medição da rotação óptica produzida sobre um feixe de luz polarizada ao passar por uma substância opticamente ativa (FERREIRA, 2007).

O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método analítico utilizado na análise de solução parenteral de manitol 20% e manitol matéria-prima com o intuito de assegurar que o método é capaz de gerar resultados confiáveis, bem como estabelecer parâmetros para o desenvolvimento do método polarimétrico e contribuir para elaboração de monografia de análise na Farmacopéia Brasileira.

MATERIAL E MÉTODO

Para o presente estudo, utilizaram-se vidrarias calibradas e reagentes preparados conforme métodos farmacopéicos, minimizando dessa forma, possíveis variáveis que pudessem interferir na eficácia do método empregado.

Equipamentos e Reagentes

Balança analítica (Shimadzu AY220, Makati City, Filipinas), agitador magnético (IKA RCT basic, Wilmington, EUA) e polarímetro (Bellingham + Stanley Ltd, ADP 220, Royal Tunbridge Wells, Inglaterra).

Molibdato de Amônio (Quimis[®] e LabSysth[®]), Ácido Sulfúrico 1N (MTedia[®]) e água para injetáveis.

Nesse trabalho, foi utilizada amostra de Manitol da empresa INDUKERN com teor de 99,28% além da solução parenteral de manitol 20%.

Procedimento

Inicialmente, foram preparadas seis amostras, contendo 50%, 75%, 100%, 125% e 150% da concentração do analito cuja concentração em g mL^{-1} equivale a 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 e 0,30 respectivamente e um lote sem o analito (placebo).

De cada amostra, foi transferido 5,0mL da solução para análise da forma farmacêutica e 1,0g de manitol para análise de matéria-prima para balão volumétrico de 100mL, adicionando em seguida, 40mL de solução de molibdato de amônia (1:10) e 20mL de ácido sulfúrico 1N, completando o volume com água para injetáveis e homogeneizando a solução.

Cada amostra foi analisada em polarímetro utilizando tubo de 200mm e a partir das leituras registradas pelo equipamento foi calculado o resultado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{g}/100\text{mL} = a \times 0,3546 \times 20$$

$$\% \text{VR} = \frac{\text{g}/100\text{mL} \times 100}{20}$$

Onde:

a = leitura efetuada no polarímetro

% VR = porcentagem do valor rotulado

g/100mL = massa do manitol em 100mL de solução

0,3546 = fator de correção

Ensaio de Validação

De acordo com a Resolução da ANVISA nº 899, esse estudo está classificado na categoria I e, portanto, deverão ser avaliados os parâmetros de linearidade, exatidão, robustez, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), intervalo e especificidade.

Para avaliação da robustez, foram analisadas amostras na concentração de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ obtidas a partir de soluções reagentes preparadas de formas diferentes.

Nesse estudo, a precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade e precisão intermediária. Na determinação desse parâmetro, dois analistas realizaram separadamente, seis determinações da amostra na concentração de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$ em dias consecutivos. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação percentual (%CV), obtidos pela relação: $\%CV = DP \times 100 / \text{CMD}$, em que DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada (ANVISA, 2003).

Na avaliação da linearidade foi necessária a confecção de uma curva de calibração, sendo o eixo x o da concentração e o eixo y da resposta. Este estudo foi efetuado empregando-se soluções padrões em cinco níveis de concentração diferentes, a partir de 50% a 150% da concentração alvo do analisado.

A exatidão foi avaliada a partir da análise de amostras em três níveis de concentrações, $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (baixa), $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (média) e $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ (alta), com três réplicas para cada concentração (n=3). Esse parâmetro foi expresso pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

Para comprovação da seletividade do método foram comparados os resultados obtidos a partir das soluções semelhantes isentas do fármaco.

RESULTADOS

Parâmetros avaliados

Linearidade

Os resultados da linearidade do método estão expostos na Tabela 1, bem como a curva de calibração (Figura 1).

Tabela 1 – Resultados da Linearidade

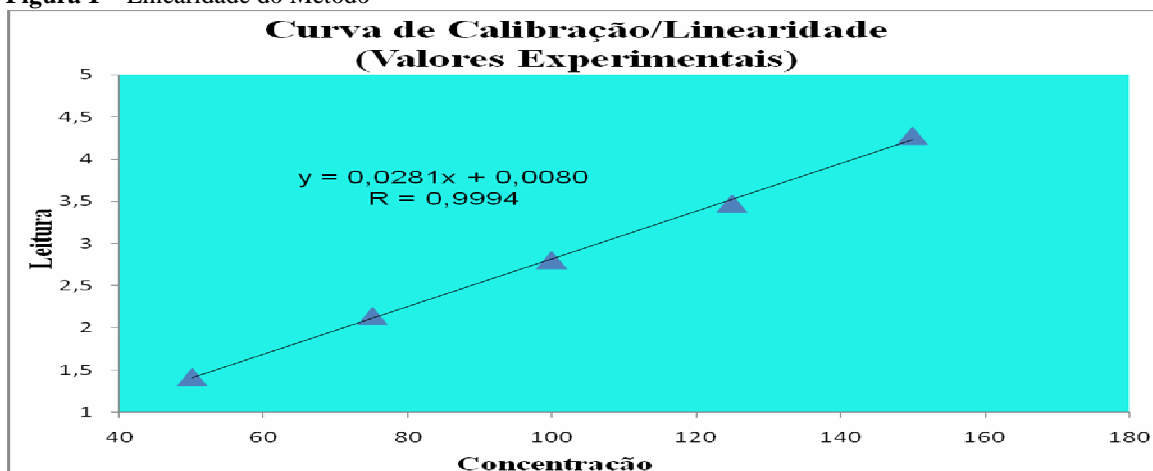
	Amostras - Concentração (g mL^{-1})					Média	CV (%) *	(R) **
	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30			
Leitura	1,42	2,14	2,80	3,47	4,27	2,82	1,18	0,9994
Fator (Leitura/Conc)	14,20	14,26	14,00	13,88	14,23	14,1		

Fonte: Dados da Pesquisa

* CV (%) = Coeficiente de Variação

** (R) = Coeficiente de Correlação

Figura 1 – Linearidade do Método



Fonte: Dados da Pesquisa

Precisão

A repetibilidade e precisão intermediária do método foram realizadas em sextuplicata a partir de amostras homogêneas, recém preparadas, realizadas em dias consecutivos por analistas diferentes. Os resultados obtidos encontram-se expressos na Tabelas 2.

Tabela 02. Resultado analítico da repetibilidade e precisão intermediária

Analista	Dia	Concentração Normal (mg mL ⁻¹)	Concentração Encontrada Média ± DP* (n = 6)	CV (%)
Analista A	Dia 1	0,2	2,792±0,004	0,146
	Dia 2	0,2	2,785±0,005	0,179
Analista B	Dia 1	0,2	2,788±0,007	0,270
	Dia 2	0,2	2,782±0,008	0,287

Fonte: Dados da Pesquisa

*DP = Desvio Padrão

**CV% = Coeficiente de Variação

Exatidão

Os resultados, em percentagem de recuperação, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado analítico e tratamento estatístico da exatidão.

Ensaio	Concentração Normal (g mL ⁻¹)	Concentração Recuperada Media ± DP (n=3)	Exatidão (%)
Exatidão	0,10	0,099 ± 0,0008	99%
	0,20	0,198 ± 0,004	99%
	0,30	0,303 ± 0,004	101%

Fonte: Dados da Pesquisa

Robustez

Os dados referentes a análise da robustez do método estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação da robustez do método analítico.

Soluções	Analista Responsável	Reagente Utilizado	Preparo Reagente	Preparação Dia/Hora	Leitura Dia/Hora	Teor encontrado
Molibdato de Amônio SR	Rafael	H ₂ SO ₄ (MTedia) Molibdato de Amônio (Quimis)	03/09/11	05/10/11 13:00	05/10/11 15:00	98,93
Molibdato de Amônio SR	Leonardo	H ₂ SO ₄ (MTedia) Molibdato de Amônio (LabSysth)	05/10/11	05/10/11 14:00	05/10/11 15:30	99,29

Fonte: Dados da Pesquisa

DISCUSSÃO

O uso de matérias-primas oriundas de fontes renováveis continua sendo uma excelente opção para o desenvolvimento de novas substâncias de maior valor agregado. O manitol é um carboidrato que está dentro deste contexto, independentemente de qualquer outro uso para ele, haja vista que ele já é um fármaco utilizado na clínica médica. Estudos recentes mostram a grande variabilidade no uso do manitol em diversas áreas, quer seja na medicina, como diurético osmótico, na indústria farmacêutica como excipiente em comprimidos e cápsulas, na indústria alimentícia para a obtenção de produtos dietéticos além da sua utilização e versatilidade como material de partida na síntese de ligantes e de diversas sínteses totais de produtos naturais complexos (OLIVEIRA; FERREIRA; SOUZA, 2009).

Alguns compostos como o manitol, por possuírem centros quirais, têm a capacidade de desviar o plano da luz polarizada, sendo designados de substâncias opticamente ativas. Esses compostos podem rotacionar o plano da luz polarizada tanto no sentido horário (dextrorrotatório), quanto no sentido anti-horário (levorrotatório) (PRADO, 2003).

Segundo Oliveira *et al* (2009), a atividade óptica está relacionada à constituição química e à concentração da substância.

A intensidade (ângulo) com que um composto opticamente ativo rotaciona o plano da luz polarizada pode ser detectado e mensurado com um instrumento chamado polarímetro. Esse instrumento é formado por uma fonte luminosa monocromática, de duas lentes de Polaróide (ou de dois prismas de Nicol) e de um tubo, onde se coloca a substância cuja atividade óptica se pretende medir (PRADO, 2003).

Na avaliação da linearidade do método obteve-se a seguinte equação: $y = 0,0281x + 0,0080$. Como observado na Tabela 1, o fator de correlação (R) foi de 0,9994, bem próximo da unidade, o que atesta a linearidade do método. Os resultados demonstram haver uma regressão linear significativa bem como a ausência de desvio da linearidade.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 2, pode-se concluir que o método apresenta uma boa repetibilidade e precisão intermediária, visto que o coeficiente de variação nas duas corridas se mostra inferior ao critério de aceitação de menos 5,0%, assegurando que não há diferença estatisticamente significativa entre dias e analistas.

A exatidão do método realizada em triplicata pode ser constatada na Tabela 3, na qual se verifica que não há erro sistemático, comprovando o nível de segurança do mesmo.

Na avaliação da robustez do método, as análises das amostras na concentração de $0,2\text{g mL}^{-1}$ obtidas a partir de soluções reagentes preparadas de formas diferentes, comprovam que o método é robusto, tendo em vista que não foram observadas diferenças significativas no teor encontrado, como mostra a Tabela 4.

A seletividade do método pôde ser comprovada através da leitura de uma preparação placebo, comprovando que não há interferência com o princípio ativo, confirmando, portanto, que este método é específico para o doseamento.

CONCLUSÃO

De forma geral, o método analítico proposto foi desenvolvido a fim de disponibilizar um procedimento para quantificação de solução parenteral de manitol 20% e manitol matéria-prima pelo uso da polarimetria.

Todos os parâmetros avaliados encontram-se dentro das exigências estabelecidas pela resolução 899 de 29 de Maio de 2003, confirmando a adequabilidade, eficácia e a capacidade de reprodução de resultados confiáveis durante as análises do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 899 de 29/05/2003**. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília - DF, 02 de junho de 2003.

BREIER, Ana Rita. **Fexofenadina: Validação de Métodos Analíticos e Estudo de Fotoestabilidade**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2007.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: The Stationary Office, 2009. p.1343.

EMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FERREIRA, Anderson de Oliveira. Artigos técnicos. **Polarimetria**. Ortofarma Laboratório de Controle da Qualidade, Matias Barbosa- MG, 2007.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

OLIVEIRA, Pedro S.M. de; FERREIRA, Vitor F. e SOUZA, Marcus Vinicius N. de. Utilização do D-manitol Em síntese Orgânica. **Química Nova**, 2009, vol.32, n.2, p. 441-452.

PRADO, J. N. do, *et al.* Validação de Metodologia Analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para Doseamento de Cápsulas de Fluoxetina. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 436-40, 2006.

PRADO, M. A. F. **Propriedades físico-químicas dos fármacos**. In: ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. Da química medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático. Barueri: Editora Manole, 2003. cap. 2, p. 40-42.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Setembro/Outubro 2004.

RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais**. 86 f. 2004. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro, 2004.

SANTANA, A.K.M; NUNES, L.C.C.; MEDEIROS, F.P.M.; SILVA, M.J.; LAVRA, Z.M.M.; ROLIM-NETO, P.J.. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** Araraquara – SP, v. 28, n.2, p.177-183, 2007.

USP 34. The United States Pharmacopoeia. ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2011. p. 3379.