

Marcelo Henrique da Cunha Chaves

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação
de resíduo de Efavirenz por método de *swab***

Rio de Janeiro

2013

Marcelo Henrique da Cunha Chaves

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduo de
Efavirenz por método de *swab***

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cláudia Fernandes Amaral

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Barbosa Candido Alves Slana

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

C512d

Chaves, Marcelo Henrique da Cunha

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduo de Efavirenz por método de *swab*. / Marcelo Henrique da Cunha Chaves. – Rio de Janeiro, 2013.

xv, 144 f. : il; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Cláudia Fernandes Amaral

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 101-105

1. Efavirenz. 2. Validação de Limpeza. 3. Resíduo. 4. *Swab*. 5. Taxa de Recuperação. I. Título.

CDD 615.1

Marcelo Henrique da Cunha Chaves

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduo de
Efavirenz por método de *swab***

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Brandão Gomes
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. Jean Pierre Barros Thibaut
Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI

Prof. Dr. Edison Luis Santana Carvalho
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Manuela e Vicente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu amor.

À minha esposa Laura, por seus fervorosos incentivos, inúmeros esforços e carinho sempre presente.

Aos meus pais, por tantos ensinamentos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia Fernandes Amaral, pelo exemplo de competência e seriedade.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Glaucia Barbosa Candido Alves Slana, pela amizade de longa data e capacidade técnica.

À amiga Marise Rosa, por sua inestimável ajuda.

Aos colegas do curso de Mestrado, pelas palavras de conforto, companheirismo e cumplicidade.

À amiga Maria Lúcia Morley, pelos inúmeros conselhos.

À amiga Shirley Trajano, pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores do curso de Mestrado, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao corpo técnico do curso de Mestrado, pelos esforços dispendidos.

À minha família, pouso certo e seguro.

A todos os amigos que de modo direto ou indireto fizeram parte dessa jornada.

Passavam as manhãs ensaiando exercícios debaixo das árvores do pomar, ela com paciência e amor, ele com uma persistência de canteiro, até que o madrigal esquivo se lhes entregou sem dor.

Gabriel García Márquez

RESUMO

Chaves, Marcelo H C. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de resíduos de Efavirenz por método de swab*. 2013. 142f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver e validar uma nova metodologia analítica para determinação de resíduos de Efavirenz por método de *swab*. Essa metodologia foi desenvolvida com base na técnica utilizada atualmente em Farmanguinhos (FIOCRUZ-RJ), que contempla os resultados solicitados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mas, não possui um desempenho considerado ideal.

Os estudos foram baseados principalmente na comparação do poder extrativo de dois modelos de *swab* selecionados, o Coventry™ modelo 36060, e o Texwipe®, Alpha® *Swab*, modelo TX761. Cada um desses modelos foi testado com os seguintes solventes ou soluções extratoras: Acetonitrila, Acetonitrila / Água purificada (1:1), Metanol / Água purificada (1:1), Etanol, Etanol / Água purificada (1:1) e Isopropanol. Também foi objeto de estudo, o tempo de ultrassom utilizado para extrair o resíduo de Efavirenz dos *swabs*.

Os resultados apontaram para o uso do modelo de *swab* Texwipe®, Alpha® *Swab*, modelo TX761, como sendo o de melhor desempenho para o presente resíduo. Quanto ao solvente extrator, o indicado foi o etanol, devido ao seu bom desempenho com relação à solubilização do Efavirenz e seu baixo caráter tóxico. O tempo de ultrassom selecionado foi de 15 minutos.

Todo o desenvolvimento elaborado no presente estudo também possibilitou uma abordagem que poderá ser utilizada em futuros desenvolvimentos de metodologias analíticas para determinação de resíduos de substâncias com conhecida dificuldade de solubilização.

Palavras-chave: Efavirenz. Validação de limpeza. Resíduo. *Swab*. Taxa de recuperação.

ABSTRACT

Chaves, Marcelo H C. *Development and validation of analytical method for Efavirenz residues determination by swab method*. 2013. 142f. Professional Master's Thesis in Management, Research and Development in the Pharmaceutical Industry - Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, 2013.

This study aimed to develop and validate a new analytical methodology for the determination of residues of Efavirenz by swab method. This methodology was developed based on the technique currently used in Farmanguinhos (FIOCRUZ-RJ), which includes the results requested by the National Health Surveillance Agency (ANVISA) but does not have a performance considered ideal.

The studies were based mainly on the comparison of the two models extractive swab selected, the Coventry™ Model 36060, and Texwipe® Alpha® Swab, Model TX761. Each of these was tested with the following solvents or extraction solutions: acetonitrile, acetonitrile / purified water (1:1), methanol / purified water (1:1), ethanol, ethanol / purified water (1:1) and isopropanol. It was also the object of study, the duration of ultrasound used to extract the residue of Efavirenz swabs.

The results point to the use of the model swab Texwipe® Alpha® Swab, Model TX761, as the best performance for this residue. As to the solvent extractor, the ethanol was indicated due to its good performance with respect to its solubilization of Efavirenz and low toxic character. The time ultrasound selected was 15 minutes.

All development elaborated in this study also enabled an approach that could be used in future developments of analytical methods for determination of residues of substances with known difficulty of solubilization.

Keywords: Efavirenz. Cleaning validation. Residue. Swab. Recovery rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fórmula estrutural da molécula de Efavirenz.....	24
Figura 2 –	Estabilidade do Efavirenz em diferentes valores de pH.....	27
Figura 3 –	Proposta de hidrólise de Efavirenz em solução alcalina.....	28
Figura 4 –	Etapas da validação de limpeza.....	37
Figura 5 –	Placas de aço inox 316L, com 25 cm ² de área.....	54
Figura 6 –	Micropipeta e ponteira.....	54
Figura 7 –	Realização dos <i>spots</i> com uso de micropipeta.....	55
Figura 8 –	Placa após total evaporação.....	55
Figura 9 –	Retirada do excesso de solvente.....	56
Figura 10 –	Início do esfregaço no sentido vertical.....	57
Figura 11 –	Finalização do esfregaço no sentido horizontal.....	57
Figura 12 –	Corte da haste do <i>swab</i>	58
Figura 13 –	<i>Vial</i> preparado para ir ao ultrassom.....	58
Figura 14 –	Amostras em processo de sonicação.....	59
Figura 15 –	Formato de cabeça do <i>swab</i> Coventry™ modelo 36060.....	76
Figura 16 –	Formato de cabeça do <i>swab</i> Texwipe® modelo TX761.....	76
Figura 17 –	Placa após realização de <i>swab</i> umedecido em acetonitrila.....	80
Figura 18 –	Placa após realização de <i>swab</i> umedecido com metanol : água (1:1).....	81
Figura 19 –	Cromatograma da solução padrão.....	87
Figura 20 –	Cromatograma da solução diluente.....	88
Figura 21 –	Cromatograma da solução branco / <i>Swab</i> Texwipe® TX761.....	88
Figura 22 –	Cromatograma da solução amostra / <i>Swab</i> Texwipe® TX761.....	88
Figura 23 –	Cromatograma da solução amostra / <i>Swab</i> Texwipe® TX761 com etanol e água (1:1).....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito da alteração do tempo de ultrassom no swab Coventry™ modelo 36060.....	82
Gráfico 2 – Efeito da alteração do tempo de ultrassom no <i>swab</i> Texwipe® modelo TX761.....	83
Gráfico 3 – Comparação entre modelos de swab com 15 minutos de sonicação.....	84
Gráfico 4 – Comparação entre modelos de swab com 30 minutos de sonicação.....	85
Gráfico 5 – Primeira curva de calibração para determinação do LD e do LQ.....	91
Gráfico 6 – Segunda curva de calibração para determinação do LD e do LQ.....	91
Gráfico 7 – Terceira curva de calibração para determinação do LD e do LQ.....	92
Gráfico 8 – Primeira curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo	94
Gráfico 9 – Segunda curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo	94
Gráfico 10 – Terceira curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Gradiente de eluição.....	30
Tabela 2 –	<i>Swabs</i> e Solventes utilizados no teste de recuperação, utilizando 15 e 30 minutos de tempo de ultrassom.....	60
Tabela 3 –	Marcha de diluição para construção das curvas de calibração na determinação do LD e do LQ.....	62
Tabela 4 –	Estudo para escolha do pior caso.....	65
Tabela 5 –	Estudo para escolha do produto subsequente.....	68
Tabela 6 –	Equipamentos compartilhados entre Efavirenz 600 mg e Metildopa 500 mg.....	69
Tabela 7 –	Resultados de recuperação obtidos com o <i>Swab</i> Coventry™ modelo 36060 e 15 minutos de ultrassom.....	78
Tabela 8 –	Resultados de recuperação obtidos com o <i>Swab</i> Coventry™ modelo 36060 e 30 minutos de ultrassom.....	78
Tabela 9 –	Resultados de recuperação obtidos com o <i>Swab</i> Texwipe® modelo TX761 e 15 minutos de ultrassom.....	79
Tabela 10 –	Resultados de recuperação obtidos com o <i>Swab</i> Texwipe® modelo TX761 e 30 minutos de ultrassom.....	79
Tabela 11 –	Valores para verificação da linearidade.....	92
Tabela 12 –	Resultados dos limites (LD e LQ).....	93
Tabela 13 –	Precisão intermediária.....	96
Tabela 14 –	Interferência do etanol na metodologia em estudo.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTG –	<i>AIDS Clinical Trials Group</i>
ANVISA –	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APIC –	<i>Active Pharmaceutical Ingredients Committee</i>
ARV –	Antirretroviral
BPF –	Boas Práticas de Fabricação (de medicamentos)
CLAE –	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQ –	Controle da Qualidade
CV% –	Coefficiente de variação percentual
DP –	Desvio Padrão
DPR –	Desvio Padrão Relativo
FDA –	<i>Food and Drug Administration</i>
FISPQ –	Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos
HIV –	Vírus da imunodeficiência humana
ICH –	<i>International Conference On Harmonization</i>
LAFEPE –	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LD –	Limite de detecção
LQ –	Limite de quantificação
LPI –	Lei de Patentes Brasileira
NNRTI –	Inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa
NVQ –	Núcleo de Validação e Qualificação de Farmanguinhos
PA –	Padrão de Análise
PPM –	Partes por milhão
R –	Reagente
SIDA –	Síndrome da imunodeficiência adquirida

TRIPS – Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio

UV-Vis – Ultravioleta visível

VRL – Limite residual visível

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
	Desenvolvimento e produção de um medicamento	20
	<u>Etapas de desenvolvimento</u>	20
	<u>Validação de limpeza</u>	21
	Metodologia Analítica	23
1	REVISÃO DA LITERATURA	24
1.1	Efavirenz	24
1.1.1	<u>Características Físico-Químicas do Efavirenz</u>	26
1.1.2	<u>Estabilidade do Efavirenz</u>	26
1.2	Metodologias analíticas	28
1.2.1	<u>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u>	28
1.2.2	<u>Espectrofotometria no UV-Visível</u>	31
1.3	Validação	32
1.3.1	<u>Parâmetros</u>	32
1.3.2	<u>Validação de limpeza</u>	35
1.3.2.1	Avaliação dos equipamentos e dos pontos de pesquisa.....	38
1.3.2.2	Avaliação dos procedimentos de limpeza.....	38
1.3.2.3	Determinação da forma de amostragem.....	39
1.3.2.4	Desenvolvimento e validação da metodologia analítica.....	42
1.3.2.5	Limites de aceitação.....	44
1.3.2.6	Desenvolvimento do protocolo de validação de limpeza.....	47
2	OBJETIVO	49
2.1	Objetivos Específicos	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1	Materiais	50
3.1.1	<u>Padrões</u>	50
3.1.2	<u>Solventes</u>	50
3.1.3	<u>Materiais</u>	50
3.1.4	<u>Equipamentos</u>	51
3.2	Métodos	52
3.2.1	<u>Metodologia Analítica</u>	52
3.2.1.1	Parâmetros Cromatográficos.....	52

3.2.1.2	Preparo do Diluente.....	52
3.2.1.3	Preparo da Fase Móvel.....	52
3.2.1.4	Preparo do Padrão de Efavirenz.....	53
3.2.1.5	Teste de recuperação.....	53
3.2.1.6	Teste em Branco.....	60
3.2.1.7	Adequação do sistema.....	61
3.2.1.8	Critério de aceitação.....	61
3.2.2	<u>Determinação dos limites (LD e LQ)</u>	61
3.2.2.1	Critério de aceitação.....	63
3.2.3	<u>Linearidade no intervalo</u>	63
3.2.3.1	Critério de aceitação.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	Determinação do limite de adequação para resíduo de Efavirenz	64
4.2	Desenvolvimento da metodologia analítica	74
4.2.1	<u>Amostragem</u>	74
4.2.2	<u>Taxa de recuperação</u>	77
4.2.3	<u>Variação do tempo de extração</u>	82
4.2.4	<u>Comparação de desempenho entre os modelos de <i>swab</i></u>	84
4.2.5	<u>Solventes extratores</u>	85
4.2.6	<u>Contaminante</u>	86
4.3	Validação	90
4.3.1	<u>LD e LQ</u>	90
4.3.2	<u>Linearidade no intervalo de interesse</u>	93
4.3.3	<u>Exatidão e Precisão</u>	95
4.4	Considerações finais	99
5	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – Resultados de recuperação.....	106
	APÊNDICE B – Estatística de regressão das curvas de calibração para determinação de LD e LQ.....	120
	APÊNDICE C – Estatístico de regressão para confirmação de Linearidade..	123
	ANEXO A – Pontos para pesquisa de resíduo de Efavirenz.....	128
	ANEXO B – Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos.....	135

INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, o acesso ao adequado tratamento antirretroviral (ARV) transformou significativamente os métodos de controle da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), aumentando a qualidade e expectativa de vida dos pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), reduzindo a transmissibilidade do vírus e causando uma importante queda nos índices de mortalidade (RODRIGUES; SOLER, 2009).

Ao visualizar o panorama mundial, o Brasil é um dos poucos países que mantém uma política de acesso universal e gratuito para o tratamento da SIDA, conquistando grandes avanços neste campo mas, em contrapartida, grandes gastos com a aquisição dos medicamentos.

A Constituição Brasileira de 1988, através do reconhecimento de que “saúde é direito de todo cidadão e dever do Estado” (artigo 196), forneceu as bases fundamentais para a construção de um sistema público de saúde. Assim foi criado o Sistema Único de Saúde (SUS), regulamentado por meio das Leis 8.080/90 e 8.142/90. Ressalta-se que entre os campos de atuação do SUS está a assistência farmacêutica integral, o que implica a obrigação do Estado em fornecer medicamentos para todos aqueles que deles necessitem.

No início da década de 1990, a produção dos ARVs por laboratórios nacionais públicos e privados, a preços inferiores aos ofertados pelas empresas multinacionais, começou a ser realizada devido à lei de propriedade industrial vigente na época (Lei 5.772/71). O presente fato foi um passo importante para a implementação da política universal de medicamentos ao não incluir o reconhecimento de patentes para produtos e processos farmacêuticos.

Neste cenário, o primeiro medicamento para o tratamento da SIDA, a zidovudina (AZT), teve sua disponibilização pelo Ministério da Saúde brasileiro efetivada em 1991. Paralelamente ao início da utilização em larga escala do AZT no Brasil, as grandes empresas farmacêuticas lançaram novos medicamentos para o controle da SIDA e em curto espaço de tempo a monoterapia com AZT passou a ser considerada ineficiente, marcando o início da terapia combinada (coquetel).

Porém, em 1996 foi aprovada no Brasil a nova Lei de Propriedade Industrial (Lei 9.279/96), que modificou drasticamente o cenário que se tinha construído até então (viabilização do acesso a medicamentos por meio da produção local a preços acessíveis). A

obrigatoriedade de se conceder patentes para o setor farmacêutico (imposta por acordos internacionais) mudaria completamente este cenário, dificultando muito a política de acesso universal vigente no Brasil.

A nova lei brasileira de propriedade industrial buscava adequar-se às diretrizes da Organização Mundial do Comércio - OMC. Os Estados Membros assinaram uma série de acordos multilaterais, dentre os quais o Acordo sobre os Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (Acordo TRIPS ou Acordo ADPIC), o qual estabeleceu a obrigatoriedade de reconhecimento da propriedade intelectual para todos os campos tecnológicos, incluindo o setor farmacêutico. Dessa forma, os medicamentos passaram a ser tratados pelo TRIPS como qualquer outra mercadoria, trazendo prejuízos e barreiras importantes para a implementação de políticas de saúde.

O sistema de proteção patentária instituído pelo Acordo TRIPS possui como objetivo a promoção da inovação tecnológica e a transferência e difusão de tecnologia, de forma conducente ao bem-estar social e econômico. Pensando desta forma, o acordo concedeu prazo para que os países em desenvolvimento e países de menor desenvolvimento relativo que não reconheçam patentes para alguns campos tecnológicos - como produtos e processos farmacêuticos - passassem a fazê-lo. Os países em desenvolvimento teriam até 2005 para incorporar o padrão mínimo de proteção em suas legislações internas e os países menos desenvolvidos teriam até 2016, conforme previsto na Declaração de Doha sobre o Acordo TRIPS e Saúde Pública, assinada em 2001 (CHAVES; VIEIRA, 2008).

O Acordo TRIPS permitiu também que os países membros incluíssem em suas legislações algumas flexibilidades ou salvaguardas de modo a garantir proteção para a saúde pública e mitigar os efeitos protecionistas dos direitos conferidos ao detentor da patente. A lei de patentes brasileira (LPI) incluiu algumas das flexibilidades do Acordo, no entanto, o Brasil não aproveitou o período de transição de 10 anos (CHAVES; VIEIRA, 2008).

Dentre as flexibilidades adotadas, pode ser destacada a licença compulsória, que ocorre quando o Estado licencia empresas, que não a titular da patente, a fabricar, usar, vender ou importar um produto sob proteção patentária sem uma autorização prévia. É concedida em situações de abuso de poder econômico, em caso de não exploração do objeto da patente, quando a comercialização do produto patenteado não satisfizer às necessidades do mercado e em situações de emergência nacional ou interesse público (CHAVES; VIEIRA, 2008).

No Brasil, a ameaça de emissão de licença compulsória foi o principal instrumento de pressão utilizado durante os processos de negociação de preços dos medicamentos ARVs. Entretanto, pelo fato do governo brasileiro nunca ter emitido efetivamente tal dispositivo, a

estratégia de negociação de preços tornou-se ineficiente e os preços posteriormente alcançados foram insatisfatórios (CHAVES; VIEIRA, 2008).

Neste cenário, e a partir da publicação preliminar dos resultados do *AIDS Clinical Trials Group* (ACTG) 5142 em 2006, o Efavirenz, um inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa (NNRTI), passa a ser usado como tratamento de primeira linha, em detrimento dos inibidores de protease, no tratamento do HIV tipo 1. Os testes realizados no ACTG 5095 mostraram que a potência do Efavirenz é mantida em todas as contagens de CD4 e carga viral HIV. Sua aprovação pelo FDA já havia ocorrido em 21 de setembro de 1998 (ano de seu patenteamento) quando se tornou o 14^o antirretroviral a ser incluído no coquetel de terapia contra a SIDA (ELIAS, 2009).

Tendo em vista sua inegável utilidade clínica, o Brasil passou a comprar o medicamento Stocrin[®] produzido pela multinacional Merck Sharp & Dohme (detentora da patente) a um custo de US\$ 1,57 por comprimido, gerando uma despesa de US\$ 580,00 por paciente/ano, o que representou um gasto anual de US\$ 42,9 milhões. O Efavirenz passou a ser utilizado por 75 mil pacientes de SIDA, onde 38% desse total eram atendidos diretamente pela rede pública (ELIAS, 2009).

Baseado nesta realidade, o governo brasileiro solicitou um estudo de redução de preço à Merck devido aos elevados gastos governamentais mas, apenas conseguiu uma contraproposta de desconto de 30% do valor do Efavirenz, de US\$ 1,57 para US\$ 1,10, ainda longe da almejada redução de 60%, de US\$ 1,59 para US\$ 0,65 (valor cobrado na Tailândia pelo mesmo laboratório). Ademais, o desconto seria válido até 2010, não 2012, data em que a patente expiraria (ELIAS, 2009).

Em maio de 2007, em consequência ao caráter irredutível da empresa Merck, o Efavirenz foi declarado de interesse público para fins de concessão de licença compulsória para uso público não comercial, de modo a garantir a viabilidade do Programa Nacional de DST/SIDA. A Portaria 583, de 8 de agosto de 2007, instituiu o Comitê Técnico Regulatório no âmbito da ANVISA, para acompanhamento do processo de desenvolvimento, produção e registro deste medicamento no Brasil.

Após a concessão da licença compulsória, o governo brasileiro passou a comprar a versão genérica do medicamento comercializado por duas empresas indianas selecionadas: a Aurobindo e a Rambaxy. Em contrapartida, a tecnologia de fabricação do medicamento deveria ser transferida pelos fabricantes indianos, dando o início imediato aos estudos que levariam à fabricação nacional do medicamento através do laboratório oficial Farmanguinhos (Fundação Oswaldo Cruz - RJ) em 2009 (RODRIGUES; SOLER, 2009).

O processo de desenvolvimento desse novo produto farmacêutico apresentou-se como um desafio frente ao curto espaço de tempo e ao momento político da época, obrigando a realização de um plano estratégico que deslocasse capacidades técnicas envolvidas, já em uma demanda nacional, a produzir de modo imediato um medicamento que atendesse a todos os requisitos de qualidade. Qualidade esta que participa integralmente de todos os setores e processos sejam eles produtivos ou não, garantindo “um grau previsível de uniformidade e confiabilidade a baixo custo, estando adequada ao mercado” (DEMING, 1990; JURAN, 1992).

Farmanguinhos, dentro das características de uma indústria farmacêutica e mantendo o aspecto universal, adota em suas ações o conceito de qualidade apresentado na Norma ISO 9000:2005, onde é descrita como um conjunto de propriedades e características de um produto, processo ou serviço, que lhe fornecem a capacidade de satisfazer as necessidades explícitas ou implícitas. Tendo em vista esses princípios, o desenvolvimento do medicamento Efavirenz em Farmanguinhos foi elaborado de forma a garantir que o produto apresentasse especificações claras e bem definidas, as quais devem estar essencialmente ligadas às necessidades dos clientes, sejam estes externos ou internos, sendo de caráter fundamental que as devidas especificações possam ser comprovadas por meio de um processo de certificação (garantia) (CONTE; DURSKI, 2002).

Desta forma, a Garantia da Qualidade (o braço da Qualidade no universo de um laboratório farmacêutico) foi o responsável pela totalidade das providências adotadas com o objetivo de garantir que o medicamento produzido estivesse dentro dos padrões exigidos, para que pudesse ser utilizado para os fins propostos.

De acordo com o citado anteriormente, a atuação da Garantia da Qualidade ultrapassa os limites de um único setor e, apesar de possuir um conceito inter-relacionado com o Controle da Qualidade e com as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF), possui um espectro mais amplo e deve cobrir todos os aspectos que influenciam individual ou coletivamente a qualidade de um produto.

Desenvolvimento e produção de um medicamento

Atualmente, pode-se inferir que o universo industrial farmacêutico é o mais controlado dentre os mais diferentes segmentos industriais brasileiros, principalmente pelas características de seu produto, e por sua área de atuação, a saúde.

Dessa forma, todas as etapas que envolvem a fabricação de um medicamento são reguladas diretamente por Normas, Portarias e Resoluções publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o órgão governamental brasileiro responsável, dentre inúmeras atividades, por garantir que os medicamentos produzidos em solo nacional apresentem um padrão de qualidade adequado à segurança do consumidor.

Etapas de desenvolvimento

A primeira etapa do desenvolvimento de um medicamento consiste na elaboração, pelos laboratórios responsáveis, da fórmula do medicamento e das metodologias analíticas que serão utilizadas nas análises dos produtos intermediários e finais. Nesse momento, os primeiros lotes pilotos são fabricados para simular, em menor escala, o processo produtivo do início ao fim.

Após as etapas de desenvolvimento, inicia-se a produção em larga escala, onde todos os processos deverão estar em consonância às BPF vigentes, que atualmente estão reguladas pela Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010.

As BPF regem a necessidade de que todas as etapas de produção sejam validadas, ou seja, atendam de forma documentada suas respectivas exigências técnicas, de forma a garantir que não existam desvios da qualidade durante a produção dos lotes ao longo do tempo.

A validação preconiza que exista pessoal e equipamentos qualificados e técnicas e procedimentos padronizados, bem como robustos, sendo atribuição da Garantia da Qualidade implantar e fiscalizar essas ações em uma indústria farmacêutica. No momento produtivo, esta necessidade de padronização e a capacidade de avaliação dos desvios de conformidade permeiam todos os setores envolvidos.

O início da fabricação propriamente dita dá-se no recebimento e estocagem de matérias-primas por um almoxarifado adequado às necessidades físicas de cada um dos

produtos envolvidos. Essas matérias-primas são remetidas ao laboratório de Controle da Qualidade (CQ), responsável por avaliar, através de metodologias validadas, as matérias-primas e os insumos a fim de garantir que suas especificações atendam a qualidade do produto final. O Controle da Qualidade também atua ao realizar a análise dos produtos intermediários que são gerados durante a fabricação (de modo a encontrar um possível erro em uma etapa inicial do processo) e no produto final (comprimidos, cápsulas, cremes, etc.).

Uma vez liberadas pelo CQ, as matérias-primas são então encaminhadas ao Setor de Produção, onde sofrerão vários processos de manufatura antes de tornarem-se produtos finais. Após o término de todo o processamento da forma farmacêutica e subsequente aprovação pelo Controle da Qualidade, as unidades são embaladas e enviadas até o almoxarifado para serem armazenadas e posteriormente remetidas até o consumidor final.

A produção de medicamentos é caracterizada pela utilização de inúmeros processos produtivos, possuidores de elevado grau de complexidade, e que fazem uso de uma gama enorme de equipamentos. Normalmente existem plantas e equipamentos individuais para a produção de um determinado produto, porém determinadas plataformas podem produzir vários medicamentos em um mesmo local e, inclusive, fazer uso da mesma maquinaria.

Validação de limpeza

Neste sentido, fica claro que deverá existir um procedimento de limpeza eficaz e adequado, que assegure que contaminantes provenientes do produto anterior não estejam presentes, ou não ultrapassem uma determinada concentração de segurança no produto subsequente (contaminação cruzada).

Não só o insumo farmacêutico ativo é passível de contaminar o próximo lote de medicamento. Desta forma, existe a necessidade de um procedimento de limpeza adequado, visto que procedimentos de limpeza inadequados podem gerar uma série de contaminantes que irão impregnar áreas e equipamentos no Setor e Produção. Os contaminantes geralmente presentes dentro de uma área produtiva são:

1. Precursores para o insumo farmacêutico ativo;
2. Subprodutos e/ou produtos de degradação do insumo farmacêutico ativo;
3. O produto anterior;
4. Solventes e outros materiais utilizados durante o processo de fabricação;

5. Microorganismos; e

6. Agentes de limpeza e/ou lubrificantes.

Da mesma forma que as etapas de produção, é de extrema importância que os procedimentos de limpeza de áreas comuns possuam garantias documentadas (validação) da existência de controles efetivos quanto à contaminação por resíduos. Sendo assim, a validação de limpeza pode ser dividida nas seguintes etapas:

- Determinação do procedimento de limpeza mais adequado para o equipamento;
- Escolha da forma de amostragem e desenvolvimento do método analítico para o composto a ser pesquisado;
- Determinação dos limites de limpeza e dos critérios de aceitação para a validação;
- Avaliação dos equipamentos e dos pontos para pesquisa do contaminante;
- Desenvolvimento do protocolo de validação de limpeza; e
- Emissão do relatório final.

Como pode ser evidenciado nas etapas acima, é de caráter fundamental que antes de se iniciar a validação de qualquer processo, seja procedido um estudo para a avaliação do próprio procedimento de limpeza. Todas as etapas deverão ser documentadas de forma detalhada e clara, e todos os colaboradores que forem indicados para sua execução deverão ter sido treinados previamente. Os treinamentos deverão ser periodicamente reaplicados de forma a garantir a eficiência do processo. Um bom procedimento deverá preocupar-se com o desenho dos equipamentos de produção, com o intuito de assinalar quais são as áreas com maior potencial de retenção residual.

O material utilizado na limpeza deverá ser padronizado e, caso se faça uso de detergentes, estes não poderão sofrer mudança após a validação do procedimento, devendo ser compatíveis com a superfície que terão contato e possuir características de remoção lipofílica adequadas.

É importante que se defina por quanto tempo os equipamentos poderão permanecer sujos, antes que o procedimento de limpeza seja executado. A efetividade desse processo depende do nível de dificuldade encontrado à medida que aumenta o período entre o final do fabrico e a limpeza subsequente.

Após a implementação e verificação do procedimento de limpeza adequado, segue-se com a criação de uma metodologia analítica para detectar e quantificar os resíduos que porventura tenham permanecido na superfície dos equipamentos. Normalmente utiliza-se a técnica de coleta por *swab* ou por água de rinsagem.

Metodologia Analítica

O desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de resíduos é parte integrante e limitante da qualidade dentro de uma empresa farmacêutica. Dessa forma, é de grande importância que a metodologia utilizada estabeleça evidências documentadas que forneçam um alto grau de garantia de que produzirão, de forma consistente, resultados finais de acordo com a qualidade exigida. Essas evidências são denominadas validação.

Atualmente a metodologia utilizada por Farmanguinhos para pesquisa de resíduos de Efavirenz atende tecnicamente aos parâmetros determinados pela ANVISA, porém apresenta algumas limitações. Para que se possa atingir o limite de 75% de recuperação de resíduos preconizado, foi desenvolvida uma metodologia, cuja pesquisa é realizada com dois *swabs* por área amostrada, o que ocasiona maior gasto com material, maior demora no processo de coleta, e torna mais susceptível a ocorrência de erros por parte dos amostradores. Além do fator descrito anteriormente, o meio extrator utilizado é a Acetonitrila Padrão de Análise (PA), único solvente que conseguiu remover totalmente o Efavirenz das superfícies de interesse mas, que em contrapartida possui elevada toxicidade e pode ocasionar injúrias em determinadas peças de alguns equipamentos do setor de produção de Farmanguinhos.

Neste contexto, é de grande interesse o desenvolvimento de uma nova proposta para a recuperação de resíduos de Efavirenz, que atenda os parâmetros de qualidade vigentes, seja passível de validação e forneça segurança aos colaboradores envolvidos no processo de limpeza.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Efavirenz

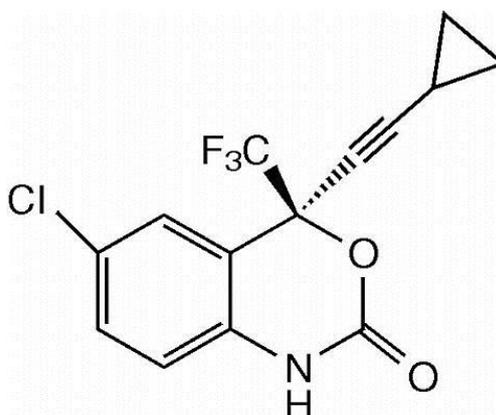


Figura 1 – Fórmula estrutural da molécula de Efavirenz

O Efavirenz, cuja fórmula estrutural está presente na figura 1, é um inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa do HIV-1, tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, de acordo com os outros compostos que compõe esta classe farmacêutica, não apresenta atividade quanto à inibição significativa do HIV-2 ou de outros retrovírus. Seu mecanismo de ação inicia-se pela difusão celular, onde se liga em um sítio ativo adjacente ao de atividade da transcriptase reversa. Por meio desta ligação, ocorre uma alteração estrutural da enzima gerando a inativação da mesma (YOUNG *et al*, 1995).

O grande problema do Efavirenz, bem como o da maioria dos medicamentos desta classe, é quanto à formação de resistência quando, após o contato do HIV-1 com o Efavirenz, é observada a geração de cepas com uma redução de 300 vezes de sua susceptibilidade ao fármaco. O fato causador dessa resistência foi determinado como sendo gerado por mutações nos códons 100, 179, 181 e 188 da transcriptase reversa, sendo a que ocorre no códon 103 como a principal responsável pela causa de resistência em pacientes tratados com o medicamento (WINSLOW *et al.*, 1996).

Com relação a sua farmacocinética, o Efavirenz é bem absorvido no trato gastrointestinal, atingindo concentrações plasmáticas máximas em 3 a 4 horas, mas apresentando uma diminuição dessa proporção à medida que aumentam as doses. É

interessante ressaltar que o Efavirenz sofre de um aumento em sua biodisponibilidade quando acompanhado de refeições ricas em gordura; e, graças à sua meia-vida longa, permite que seja administrada apenas 1 dose por dia. A molécula de Efavirenz também se caracteriza por uma extensa ligação às proteínas plasmáticas (TASHIMA et al. 1999; VILLANI et al. 1999).

Sua eliminação dá-se através das isoformas do citocromo P450, em particular a CYP3A4 e a CYP2B6, gerando o metabólito 8-hidroxi-efavirenz (excretado na urina) e o conjugado glicuronídeo de 8-hidroxi-efavirenz (encontrado no plasma e na urina). Pautado nos dados anteriores, calcula-se que 60% de sua excreção ocorrem na urina, sob a forma do conjugado glicuronídeo (VILLANI et al., 1999).

Assim como todo fármaco, o Efavirenz possui relatos de efeitos adversos, sendo cefaléia, tontura, comprometimento da capacidade de concentração e exantema, relatados na literatura. Em geral, os sintomas relacionados ao sistema nervoso central aparecem logo na primeira dose, podendo durar várias horas mas, regredindo no decorrer de semanas. Outro aspecto importante do Efavirenz diz respeito às suas interações, podendo diminuir os níveis plasmáticos do Fenobarbital, Fenitoína, Carbamazepina, Metadona e Rifabutina por meio da indução das isoformas do citocromo P450. Dentro do universo dos fármacos antirretrovirais, o mesmo efeito ocorre com o Indinavir, o Saquinavir e o Amprenavir, mas em contra partida pode-se evidenciar o aumento dos níveis de Ritonavir e Nelfinavir quando administrados com o Efavirenz. Pode-se esperar que os fármacos indutores da CYP3A4 (Fenobarbital, Fenitoína, Carbamazepina...) aumentem a depuração do Efavirenz ou reduzam seus níveis plasmáticos, possibilitando tal efeito ser observado quando da administração da Rifampicina (ADKINS; NOBLE, 1998).

Tendo em vista o aspecto terapêutico, o fármaco Efavirenz foi aprovada mundialmente para o tratamento da infecção causada pelo HIV-1 em combinação com outros antirretrovirais, sendo ele o primeiro NNRTI a ser administrado apenas 1 vez ao dia (aprovação dada pelo FDA). Como monoterapia de curta duração, efeitos antivirais significativos foram descritos mas, quando administrado em concomitância com Zidovudina e Lamivudina, pôde-se observar a supressão dos níveis de RNA do HIV-1 para valores indetectáveis em 70% dos pacientes, ocorrendo o mesmo efeito ao incluir o Indinavir nessa mesma terapia multidroga (48% dos casos). O Efavirenz, quando administrado em outros esquemas de combinações de múltiplos fármacos, também propiciou atividade, inclusive em pacientes que não responderam a esquemas anteriores. Por último, quando administrado, em combinação com Nelfinavir e um análogo nucleosídico, em crianças que não responderam a terapias anteriores, foram observados benefícios no tratamento antiviral em 60% dos casos, fato que, somado às demais

evidências, comprova a enorme perspectiva criada pela introdução desta substância na terapia anti-SIDA (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2005).

1.1.1 Características Físico-Químicas do Efavirenz

O Efavirenz, (4S)-6-(Cloro-4-ciclopropiletinil)-1,4-diidro-4-(trifluormetil)-2H-3,1-benzoxazin-2-ona é um cristal branco a levemente róseo em formato de agulha, inodoro, praticamente insolúvel em água em pH 8,7 (9,2 µg/mL) a 25 °C e apresenta faixa de fusão entre 136 °C e 141 °C com poder rotatório específico: -86° a -98° (em relação à substância dessecada). A solubilidade aquosa aumenta à medida que o pH fica acima de 9,0. Porém, a solubilidade da molécula em álcoois apresenta um grande aumento, com valores de 725 mg/mL, 663 mg/mL, e 598 mg/mL para metanol, etanol e isopropanol, respectivamente, sendo solúvel também em diclorometano. O pKa foi determinado entre 10,2 e 10,1. O valor do seu coeficiente de partição octanol:água é de 5,4. Em soluções contendo água, o máximo de estabilidade em valor de pH deve ser ajustado entre 4-5. A literatura descreve que o Efavirenz deve ser armazenado em recipientes bem fechados e protegidos da luz, devido a uma característica fotossensível da substância (MERCK RESEARCH LABORATORIES, 2001; ROWE et al., 1999; WHO, 2011; BRASIL, 2010).

A solubilidade do Efavirenz foi estudada por Alves et al. (2010) durante o desenvolvimento de um método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis, onde foram procedidos testes de solubilidade, envolvendo diferentes solventes orgânicos, de acordo com o Método Geral da Farmacopeia Brasileira. Para o solvente acetonitrila, o fármaco apresentou-se facilmente solúvel, enquanto que para os solventes metanol e álcool etílico absoluto o fármaco mostrou-se pouco solúvel (ALVES et al., 2010).

1.1.2 Estabilidade do Efavirenz

A estabilidade da molécula de Efavirenz, em diferentes condições de pH, foi demonstrada no trabalho de Maurin *et al.* (2002), os quais fizeram uso de soluções que

variaram seu pH em uma faixa de 0,6 a 12,8, a 60 °C e com força iônica de 0,3 M. O Efavirenz que remanesceu nas amostras, bem como os produtos de degradação, foram analisados por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos, acoplado a um espectrofotômetro de massa. O resultado final indicou que a degradação do Efavirenz seguiu uma cinética aparente de primeira ordem, onde percebeu-se que a molécula apresenta um máximo de estabilidade em pH ácido (aproximadamente 4), enquanto em pH acentuadamente elevado, ocorre o fenômeno de hidrólise básica claramente percebido na faixa de pH de 10 a 11.

Em sintonia ao trabalho acima, Gadkari et al. (2010), realizaram um estudo que também procurou verificar a estabilidade do Efavirenz frente a diferentes agentes de degradação forçada, sendo eles, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M, peróxido de hidrogênio a 33%, aquecimento a 70 °C e degradação fotolítica. Os resultados indicaram presença de degradação em condição de fotólise, confirmando sua já comentada fotossensibilidade, e principalmente sua degradação por hidrólise alcalina.

De modo a estudar melhor o efeito do pH frente ao Efavirenz, os autores promoveram ainda a realização de vários ensaios envolvendo soluções de Efavirenz frente a diferentes valores de pH. Os resultados estão presentes na figura 2 (GADKARI et al., 2010).

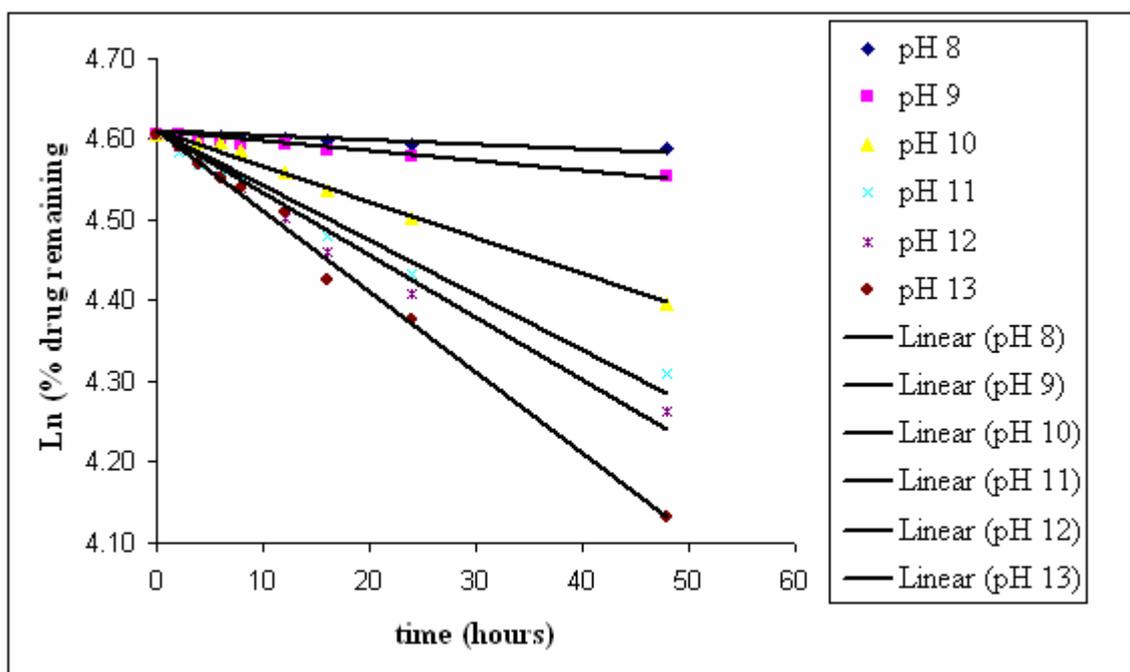


Figura 2 – Estabilidade do Efavirenz em diferentes valores de pH (Retirado de GADKARI et al., 2010)

Novamente pôde ser evidenciada a baixa estabilidade do Efavirenz frente ao pH mais básico (10 a 13). Os autores ainda descreveram uma proposta de produto formado pelo processo de hidrólise alcalina, que pode ser observado na figura 3.



Figura 3 – Proposta do produto formado pela hidrólise de Efavirenz em solução alcalina (Retirado de GADKARI et al., 2010)

1.2 Metodologias analíticas

Talvez por se tratar de uma substância ainda protegida pela legislação patentária, poucas citações foram encontradas na literatura acerca de métodos de análise para o Efavirenz. Somente após o ano de 2010 pode-se observar o início desse processo provavelmente impulsionado pelos estudos de Farmanguinhos e do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE).

1.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

De modo oficial, a Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, recentemente publicou uma monografia para doseamento de Efavirenz comprimidos, onde se utiliza uma coluna com empacotamento C8 com tamanho de partícula de 5 µm e com as seguintes dimensões: 250

mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno; mantida à temperatura ambiente e com fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min.; o comprimento de onda utilizado é de 252 nm em detector ultravioleta (BRASIL, 2010).

A fase móvel e o diluente da amostra são soluções 7:3:0,1 de acetonitrila, água purificada e ácido ortofosfórico. A solução padrão possui uma concentração de 20 µg/mL em diluente, a mesma da amostra, que é retirada de um *pool* de 20 comprimidos pulverizados em gral de porcelana. A amostra e o padrão são igualmente extraídos em 15 minutos de ultrassom (BRASIL, 2010).

Rao e Nikalje (2009), anteriormente, também publicaram uma metodologia de análise do Efavirenz por CLAE, na qual fizeram uso de um equipamento com detector de arranjo de diodos e uma coluna fenil Novapack[®] com dimensões de 150 x 3,9 mm e recheada com partículas de 4 µm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de tampão pH 6,0 e acetonitrila na proporção de 55:45 v/v e a injeção da amostra ocorreu a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do sistema foi mantida em 30 °C e o comprimento de ondas selecionado foi de 247 nm.

A metodologia se mostrou validável quanto à exatidão e precisão, e linear na faixa de concentração de 0,05 – 0,15 mg/mL, o que permitiu seu uso no controle de qualidade de produtos finais, intermediários e estudos de estabilidade.

Viana et al. (2011), nas instalações do LAFEPE, desenvolveram uma metodologia analítica através do uso de CLAE bem semelhante à que está descrita na nova Farmacopéia Brasileira (5ª edição). As condições cromatográficas estão detalhadamente descritas no trabalho, onde foi utilizado um sistema isocrático com fase móvel composta de acetonitrila, água e ácido fosfórico a 85% (70:30:0,1), fluxo de 1,0 mL/min.; temperatura do forno de 30 °C; volume de injeção de 20 µL; comprimento de onda de 252 nm; uso de coluna com empacotamento C18 e dimensões de 250 x 4 mm (partículas de 10 µm). Tal método mostrou-se robusto, linear, preciso, exato e seletivo, com picos bem definidos e boa resolução.

Por último, a já citada Farmacopeia Internacional, em seu último suplemento (publicado em 2011), detalha duas possibilidades de metodologias analíticas para doseamento de cápsulas de Efavirenz. Na primeira opção (por cromatografia líquida) faz-se uso de uma coluna de aço inox empacotada com cianopropildimetilsilano, com as seguintes dimensões: 150 mm x 4,6 mm, partículas de 3,5 µm. Dentre as particularidades desta metodologia, pode-se observar o uso de duas fases móveis por meio de um gradiente, e tal etapa pode ser resumida através do esquema a seguir:

- Fase móvel A: 90 volumes de uma solução a 0,05% de ácido trifluoroacético reagente (R) e 10 volumes de metanol R.
- Fase móvel B: 10 volumes de uma solução a 0,05% de ácido trifluoroacético R e 90 volumes de metanol R (WHO, 2011).

Tabela 1 – Gradiente de eluição

Tempo (min.)	Fase Móvel A (% v/v)	Fase Móvel B (% v/v)	Comentários
0 - 16	60 a 50	40 a 50	Gradiente linear
16 - 23	50 a 35	50 a 65	Gradiente linear
23 - 28	35 a 30	65 a 70	Gradiente linear
28 - 29	30 a 20	70 a 80	Gradiente linear
29 - 31	20	80	Isocrático
31 - 32	20 a 60	80 a 40	Retornar a composição inicial
32 - 40	60	40	Reequilíbrio

A amostra é retirada de um apanhado de 20 cápsulas, onde se deve pesar o referente a 25 mg de Efavirenz. Deve-se então realizar uma marcha de diluição com uma solução de acetonitrila R e água R na proporção de 1:1, de modo que se atinja a concentração final de 0,01 mg/mL (10 µg/mL). O padrão deverá possuir a mesma concentração, de modo a proporcionar um cálculo da amostra por comparação de áreas. O comprimento de onda utilizado é de cerca de 250 nm, com um volume de injeção de 35 µL, a uma temperatura (da coluna) de 40 °C e fluxo de 1,5 mL por minuto. No final, a Farmacopéia Internacional descreve uma segunda metodologia, porém esta faz uso de espectrofotometria no UV-Vis, com leituras realizadas em um máximo de cerca de 247 nm (WHO, 2011).

Historicamente, os primeiros trabalhos publicados abordavam a monitoração terapêutica do Efavirenz no plasma humano. Veldkamp et al. (1999) realizou ensaios onde fez uso de uma rápida e simples metodologia por CLAE de fase reversa, utilizando uma coluna C18 com dimensões 150 x 4,6 mm e partículas de 3,5 µm. As soluções padrões foram

preparadas diluindo Efavirenz em metanol, e a fase móvel foi uma solução de tampão fosfato e acetonitrila na proporção de 53:47, v/v (pH 7,5).

A grande diferença dessas metodologias para as que estão em vigor nos compêndios oficiais se baseia no caráter biológico das amostras, devido ao fato do plasma humana necessitar de um tratamento prévio antes de sua manipulação. No caso de Veldkamp et al. (1999), foi promovida uma precipitação proteica com uso de acetonitrila e subsequentemente uma evaporação do extrato para concentrar o analito.

Já Ramachandran et al. (2006) optaram por extrair o Efavirenz do plasma com o uso de acetato de etila. Foi então procedida à aplicação do solvente ao plasma e procedida à centrifugação do preparado para posterior evaporação e coleta do resíduo de Efavirenz. A técnica para quantificação do analito envolveu uma simples CLAE de fase reversa com detector de arranjo de fotodiodos e coluna octodecilsilano (C18), fase móvel composta de tampão fosfato (pH 2,4) e acetonitrila. A grande diferença ficou com a acentuada velocidade de fluxo, 2,4 mL/min., que gerou uma corrida cromatográfica de 10 minutos.

Apesar de todos os estudos e monografias anteriores indicarem o uso de detectores envolvendo espectrofotometria no ultravioleta, Matthews et al. (2001) realizaram seu trabalho baseado em um detector de fluorescência. O plasma foi tratado com hexano e cloreto de metileno (65:35, v/v), o qual, após a evaporação do extrato, teve o analito residual reconstituído com uso da fase móvel, uma mistura de tampão fosfato e acetonitrila (53:47, v/v). A coluna utilizada foi uma YMC octil S-5 120 A (23 x 4 mm) e foi feito uso de uma pré-coluna YMC C8 S-5 120 A (100 x 4,6 mm). O detector de fluorescência foi ajustado para o comprimento de onda de 310 nm.

A técnica se mostrou seletiva, precisa e acurada, a qual reduziu significativamente a possibilidade de interferência por parte de compostos endógenos e medicamentos que por ventura possam estar presentes nas amostras.

1.2.2 Espectrofotometria no UV-Visível

Fora do universo da cromatografia líquida, uma metodologia analítica para quantificação de Efavirenz através da espectrofotometria no UV-VIS também foi desenvolvida por Alves et al. (2010) e mostrou-se bastante confiável. Este trabalho fez uso de

um comprimento de onda de 247 nm e de um sistema de diluição da amostra envolvendo álcool etílico: água (60:40) v/v.

Durante o desenvolvimento promovido pelos autores, foi realizado um teste com acetonitrila/água, mas este sistema apresentou uma absorção duas vezes maior na concentração de 10 µg/mL. Portanto, devido à alta solubilização deste fármaco neste solvente e, conseqüentemente, da absorção elevada na faixa de concentração testada, esse sistema mostrou-se inadequado para o método. Somado a este fato, levou-se em consideração a toxicidade e o custo do solvente.

1.3 Validação

Segundo o 32^o relatório da Organização Mundial da Saúde, WHO TECHNICAL REPORT SERIES 823 (1992), validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados. Essa definição é utilizada atualmente pela resolução - RDC N° 17 de 2010 da ANVISA.

Ao tratar do tema validação, os principais norteadores são as BPF descritas na resolução RDC n° 17, de 16 de abril de 2010, o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos constante na Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003, e os Guias relacionados à Garantia de Qualidade publicados pela ANVISA em 31 de outubro de 2006.

A RE N° 899 (2003), por sua vez, não trata especificamente da validação de limpeza (foco da presente monografia), mas é um guia geral para validação de métodos analíticos, onde afirma que metodologias que estejam descritas em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, serão consideradas validadas. No caso de metodologias que não pertençam à condição acima, deverão sofrer um processo de validação.

1.3.1 Parâmetros

Os parâmetros a serem avaliados dentro de uma validação dependerão da natureza das análises bem como das amostras. De uma forma mais abrangente, é interessante citar e

conceituar todos os parâmetros possíveis de serem considerados. Os presentes parâmetros estão de acordo com a *INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION* (ICH).

A especificidade/seletividade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca e exata, as substâncias em análise na presença de componentes que podem vir a interferir com a sua determinação em uma amostra, tais como impurezas, produtos de degradação e os demais componentes da matriz. É interessante realizar comparações incluindo amostras armazenadas sob condições de estresse (luz, calor, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação) (ICH, 2005).

O parâmetro linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro de um determinado intervalo de aplicação. A relação matemática entre o sinal obtido (pela técnica em questão) e a concentração conhecida da substância de interesse, gera uma equação de reta chamada de curva analítica. Recomenda-se que essa relação seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 diferentes concentrações, e o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) deve ser maior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

A faixa de aplicação ou intervalo, de acordo com Ribani et al. (2004), corresponde ao intervalo entre o valor superior e o inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método, e depende do uso em questão. A ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas. Normalmente é derivado dos estudos de exatidão, linearidade e precisão (BRASIL, 2003).

Precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra. A precisão pode ser avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%). A precisão subdivide-se em intra-corrída: relação entre os resultados obtidos em curto período de tempo, com o mesmo analista e no mesmo equipamento; inter-corrídas: relação entre os resultados obtidos por meio de dias, analistas e/ou equipamentos diferentes; e inter-laboratorial: relação entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes mas utilizando a mesma metodologia analítica (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando uma determinada metodologia analítica. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído (3 vezes o ruído da linha de base) e o método baseado em

parâmetros da curva analítica. No caso dos métodos instrumentais (p. ex. CLAE), normalmente estima-se o LD com base nos parâmetros da curva analítica.

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

Onde:

DPa é desvio padrão do intercepto com o eixo do Y. Utiliza-se no mínimo 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao limite de quantificação (valor estimado);

IC é a inclinação da curva de calibração; e

O número 3 refere-se a três vezes o ruído da linha de base.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando uma determinada metodologia analítica. Os mesmos critérios utilizados no cálculo do LD podem ser adotados para o LQ, utilizando o método visual, a relação sinal-ruído (10 vezes o ruído da linha de base) ou com base nos parâmetros da curva analítica.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa é desvio padrão do intercepto com o eixo do Y. Utiliza-se no mínimo 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao limite de quantificação (valor estimado);

IC é a inclinação da curva de calibração; e

O numeral 10 se refere a dez vezes o ruído da linha de base.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método em questão e o valor dito verdadeiro (teórico). A exatidão do método deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três

réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação percentual entre a concentração média experimental e a concentração teórica (BRASIL, 2003).

E, por fim, a robustez de um método, que mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. No caso de ensaios realizados por CLAE, normalmente são procedidas variações com relação ao pH, composição e fluxo da fase móvel, uso de diferentes lotes ou fabricantes de colunas cromatográficas e variações de temperatura (BRASIL, 2003).

1.3.2 Validação de limpeza

Após revisar os parâmetros que normalmente são envolvidos em uma validação de metodologia analítica, pode-se exercer um foco maior na validação de limpeza propriamente dita. O tópico referente a este tipo de validação presente nos Guias relacionados à Garantia da Qualidade, BRASIL (2006), descreve com propriedade que:

não existe um único caminho para executar um processo de validação de limpeza e que o ponto comum a ser buscado é a existência de critérios, parâmetros e metodologias que sejam cientificamente justificáveis e que demonstrem claramente que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações pré-estabelecidas.

A avaliação de qualquer processo de validação que tenha sido elaborado baseia-se em dados científicos consistentes e os resultados encontrados devem atender às especificações pré-determinadas.

Vários guias nacionais e internacionais que abordam a validação de limpeza dentro do universo das indústrias farmacêuticas normalmente não procuram criar um procedimento pré-determinado, apenas tendem a nortear os estudos para que atendam as necessidades e exigências técnicas. De um modo geral, a validação de limpeza deve abordar alguns parâmetros universais.

Os objetivos de um processo de validação devem ser claros e irão determinar os critérios e especificações adotadas. O resíduo em potencial deverá ser bem definido, já que será o objeto principal do estudo, e no caso da presente dissertação será abordada a contaminação pelo produto anterior.

Em algumas situações, o número de combinações possíveis entre produtos contaminantes e subsequentes pode assumir proporções tão grandes que inviabilizariam a execução de um estudo abrangendo todas as possibilidades; portanto, a escolha do pior caso para um determinado procedimento é vital para que o processo de validação torne-se viável.

A ANVISA, corroborada pela *Health Sciences Authority*, define que o melhor candidato a contaminante é aquele que apresenta a melhor combinação das seguintes propriedades: menor solubilidade no solvente utilizado no procedimento de limpeza, mais difícil de ser removido (segundo a experiência dos operadores), maior toxicidade e menor dose terapêutica. Porém, a principal característica a ser observada no contaminante é quanto à sua solubilidade, onde se opta pela escolha do menos solúvel. Existe também a possibilidade de se desenvolver um sistema de pontuação por meio de planilhas comparativas, onde a solubilidade deverá possuir o maior peso dentre todos os demais critérios (BRASIL, 2006; HEALTH SCIENCES AUTHORITY, 2008).

Além da escolha do pior caso, é de extrema importância definir qual será o produto subsequente no estudo de limpeza, visto que ele deverá ser definido como o produto que ao ser contaminado levará ao paciente a maior dose do contaminante em questão. Fazendo uso de uma abordagem prática, o candidato a melhor produto subsequente é aquele que apresentar o menor valor para a razão:

Menor Tamanho de Lote

Maior Dose Terapêutica

Após realizar o levantamento de todos os dados anteriores, cabe à Garantia da Qualidade desenvolver um procedimento para organizar e traçar um plano que irá nortear a validação de limpeza propriamente dita. Baseando-se no guia gerado pelo *Active Pharmaceutical Ingredients Committee* (APIC) e nos Guias relacionados à Garantia da Qualidade, a validação de limpeza, de forma concisa e prática, pode seguir as seguintes etapas evidenciadas no fluxograma da figura 4 (APIC, 1999; BRASIL, 2006).

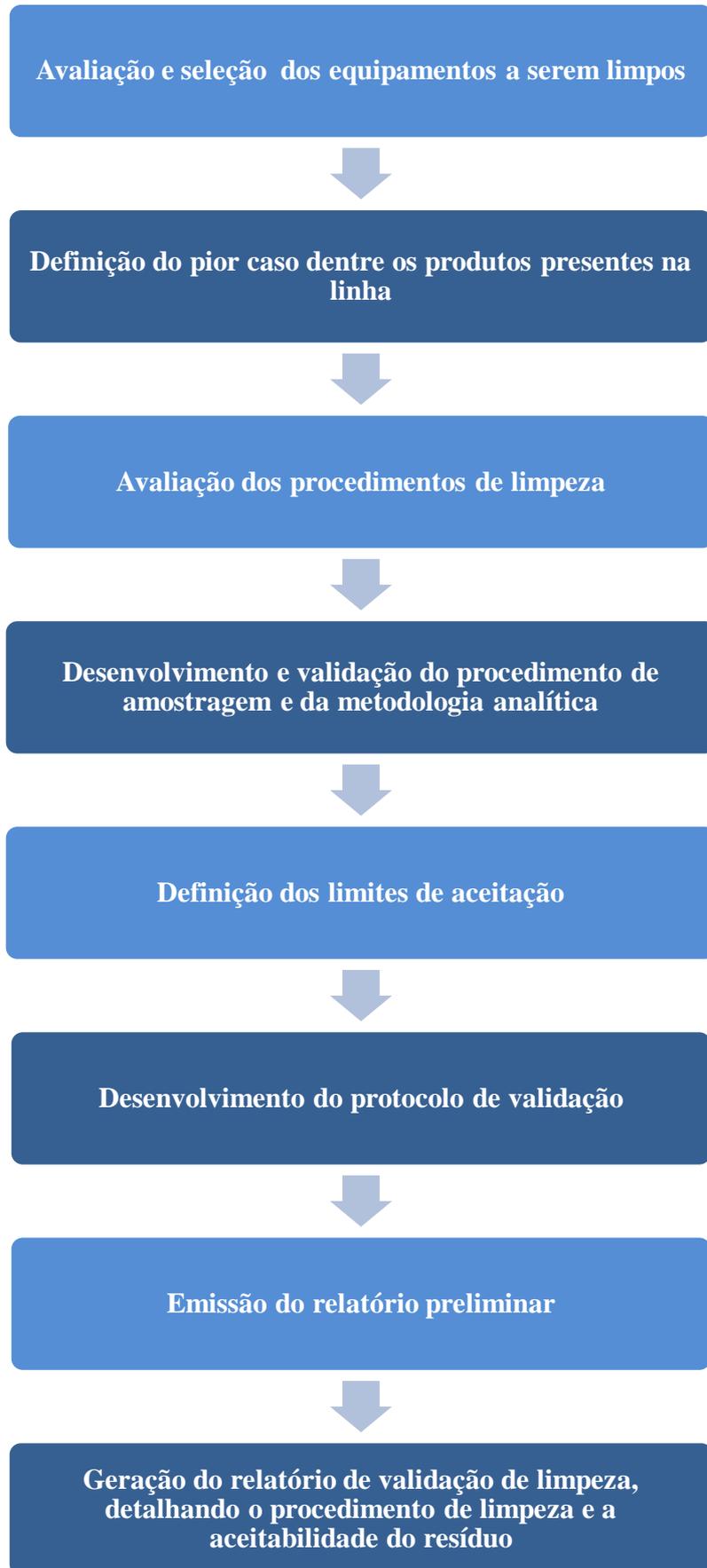


Figura 4 – Etapas da validação de limpeza

1.3.2.1 Avaliação dos equipamentos e dos pontos de pesquisa

Esse momento pode ser dividido, basicamente, em duas ações:

- Definir locais de amostragem;
- Definir a área superficial dos equipamentos.

O FDA recomenda examinar com atenção o desenho dos equipamentos envolvidos, especialmente nos sistemas de grande porte que fazem uso de sistemas semi ou totalmente automatizados. Nesses sistemas maiores, como os que utilizam linhas de transferência longa ou tubulação, deve-se verificar os fluxogramas e os diagramas das tubulações para a identificação de válvulas, pelo fato das mesmas serem pontos críticos quanto ao acúmulo de resíduos (FDA, 2011).

1.3.2.2 Avaliação dos procedimentos de limpeza

Apesar de já ter sido tocado anteriormente na introdução, cabe abrir uma abordagem mais prática baseando-se na APIC. Desta forma, é importante que se observe os seguintes aspectos no momento da definição de um procedimento de limpeza:

- Definir os critérios de aceitação para os contaminantes (abordado de modo mais profundo no tópico 1.3.2.4);
- O método de limpeza será determinado pelos equipamentos envolvidos, pelos agentes de limpeza presentes, pelas técnicas de limpeza disponíveis, e pelos contaminantes presentes;
- Todos os aspectos do procedimento de limpeza devem ser claramente definidos e documentados, envolvendo a padronização dos materiais, dos protocolos e da realização de treinamentos periódicos dos colaboradores envolvidos. (APIC, 1999)

1.3.2.3 Determinação da forma de amostragem

A literatura descreve vários métodos de amostragem que são considerados aceitáveis, e dentre estes, os mais empregados são: a amostragem direta de superfície (método de *swab*) e a amostragem indireta (uso de soluções de enxágue), sendo a combinação dos dois métodos geralmente a mais desejável, sobretudo em circunstâncias onde a acessibilidade a determinadas partes do aparelho possa prejudicar a amostragem da superfície pela forma direta. É também salientada a adequação dos materiais a serem utilizados para a amostragem, onde a própria capacidade de recuperação pode ser afetada pela escolha do material de amostragem. É também importante garantir que o meio de amostragem e solvente utilizado sejam de fácil utilização (HEALTH SCIENCES AUTHORITY, 2008).

O método de amostragem direta por meio de *swab* é o que possui mais aceitação dentro da indústria farmacêutica e, mesmo não cobrindo toda a área superficial dos equipamentos envolvidos, é de fácil realização e logística. Tal técnica baseia-se principalmente no emprego de forças químicas e físicas, e é particularmente esse caráter físico que adiciona à técnica uma maior propensão em extrair substâncias de caráter insolúvel pela simples ação mecânica mas, cabendo lembrar que se deve ter um cuidado todo especial com os percentuais de recuperação atingidos e com algum tipo de interferente proveniente do próprio material do *swab*.

A ANVISA enumera algumas características que depõem a favor desta técnica:

- Uma grande capacidade em retirar resíduos secos e insolúveis;
- Capacidade em estabelecer níveis de contaminação por regiões específicas, de cada equipamento, possibilitando descobrir quais são os pontos realmente críticos e que necessitam de um procedimento de limpeza melhorado;
- Permite a pesquisa e recuperação em áreas que a água de rinsagem não proporciona contato suficiente; e
- Possibilita amostrar regiões próximas de circuitos eletrônicos e de alta sensibilidade a líquidos. (BRASIL, 2006)

Da mesma forma, são descritas as desvantagens desse procedimento:

- A área a ser pesquisada deve ser de fácil acesso ao amostrador, o que só pode ser conseguido, em algumas situações, através do desmonte do equipamento, o que em alguns casos torna-se impossível;

- O solvente utilizado não deve se tornar uma fonte de contaminação adicional aos equipamentos nem ao amostrador;
- Obriga que seja realizado um estudo de recuperação que se assemelhe à prática; e
- Deve-se avaliar possíveis interferentes do *swab* durante o estudo de validação da metodologia analítica a ser utilizada (BRASIL, 2006).

Ainda com relação à técnica de amostragem direta, e pautado nos princípios descritos acima, Gomes e Souza (2010) desenvolveram uma validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústrias farmacêuticas de penicilínicos. Em seus estudos fizeram uso de um modelo específico de *swab*, o Texwipe® TX-761 *alpha swab*, com enorme sucesso, bem como o de gabaritos de aço inoxidável 304 com 25 cm². Cabe ressaltar que este modelo de *swab* apresentou excelente desempenho e, devido ao formato de sua cabeça, possui uma boa superfície de contato para com a superfície a ser pesquisada.

A ANVISA, em seus Guias relacionados à Garantia da Qualidade, aconselha o uso de placas de aço inox 316L com 25 cm² de área superficial para a realização dos testes de amostragem direta, podendo fazer uso de 5, 6 ou 10 placas conforme o protocolo de validação desenvolvido (BRASIL, 2006).

O segundo método mais empregado é o que se utiliza da técnica de amostragem indireta e baseia-se totalmente na capacidade química do solvente escolhido. A ANVISA, em uníssono com a APIC, também descreve quais são suas maiores vantagens com relação às demais técnicas:

- Essa técnica proporciona a completa cobertura da área a ser pesquisada, bem como às partes não alcançáveis pelos *swabs*;
- Para alguns, é de mais fácil amostragem;
- Um menor número de amostras é requerido em comparação à técnica por *swab*; e
- Permite a amostragem de grandes áreas.

As desvantagens dessa técnica também são de clara observação:

- Gera uma diluição do contaminante a um nível (muito diluído) que pode comprometer ou impossibilitar o desempenho da metodologia analítica escolhida;
- O contaminante deverá ser extremamente solúvel no solvente utilizado, o que muitas vezes é difícil;
- Como não faz uso da força mecânica na extração, em vários casos pode-se observar material aderido após a amostragem;

- Deve-se tomar muito cuidado com os componentes eletrônicos presentes (cada vez mais comuns nos maquinários), devido ao risco de avaria pelo simples contato com determinado solvente de extração (BRASIL, 2006; APIC, 1999).

A ANVISA também menciona uma técnica de amostragem por placebo ou produto, porém salienta que não existe nenhuma vantagem e torna-a não recomendada por diluir muito o contaminante e aumentar consideravelmente o número de possíveis interferentes, dificultando o trabalho da metodologia analítica. A presente técnica também não é considerada uniforme, apresentando regiões de maior e menor presença do contaminante (BRASIL, 2006).

A literatura ainda descreve esforços no tocante ao desenvolvimento de metodologias que empreguem apenas uma inspeção visual no momento da pesquisa de contaminantes, ficando claro que tais esforços baseiam-se na diminuição do custo total e na otimização do tempo despendido com as análises. Forsyth et al. (2006) abordaram este aspecto quando tentaram realizar a validação de limpeza e detecção de resíduos apenas fazendo uso do parâmetro visual.

Um teste inicial com Sinvastatina e Rofecoxibe foi realizado, onde quatro observadores chegaram a um limite residual visível (VRL) de 0,485 e 0,871 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. A inspeção visual foi realizada e em seguida *swabs* foram coletados e analisados por CLAE. Nenhuma inspeção visual alertou para valores acima dos limites de aceitação de 12,1 e 21,8 $\mu\text{g}/\text{swab}$ (para uma área de 25 cm^2), porém seus resultados não são conclusivos, por apresentar resultados com *swab* extremamente baixos, altas variâncias dos resultados, bem como valores não detectados visualmente (FORSYTH et al., 2006).

Outro teste foi realizado com um produto em desenvolvimento e Metformina 500 mg (nenhum dos dois revestidos), e os valores de VRL foram respectivamente, 0,51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (12,75 $\mu\text{g}/\text{swab}$) e 0,97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (24,25 $\mu\text{g}/\text{swab}$) para Metformina. O critério de aceitação era de 100 $\mu\text{g}/\text{swab}$.

Novamente a validação de limpeza por inspeção visual foi atingida, mas o problema foi a variância dos resultados de VRL em comparação aos obtidos pelos *swabs*. Alguns pontos da Metformina apresentaram valores acima de 25 $\mu\text{g}/\text{swab}$ (mas abaixo de 100) e não foram detectados visualmente.

Um dos limites desta técnica é o fato que o VRL deverá ser sempre menor do que o limite de resíduo aceitável. A grande questão é que esta própria afirmação torne desnecessária a validação de limpeza, ao concluir que essa substância não deva ser considerada como um

pior caso. Cabe ressaltar ainda que a detecção visual sempre fez parte da validação de limpeza inicial, mas apenas como um pré-teste de caráter qualitativo.

1.3.2.4 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica

Métodos analíticos que venham a ser utilizados para detectar e quantificar resíduos devem ser específicos para as substâncias a serem testadas e, da mesma forma, devem fornecer uma sensibilidade que reflita os níveis de limpeza definidos como aceitáveis pelas empresas. Desta forma, fica claro que estes procedimentos deverão ser validados antes que se proceda com os estudos de validação de limpeza propriamente ditos.

Os métodos analíticos devem ser desenvolvidos em combinação com os métodos de amostragem utilizados, para mostrar que os contaminantes são passíveis de serem recuperados a partir da superfície de equipamentos, e para mostrar o nível de recuperação, bem como a consistência desta recuperação. Isto é necessário antes que qualquer conclusão possa ser feita com base nos resultados da amostra. Um resultado negativo também pode ser o resultado de técnicas de amostragem pobres (HEALTH SCIENCES AUTHORITY, 2008).

É importante que o método escolhido inclua em seu protocolo, um cálculo para converter a quantidade de resíduos detectados em uma amostra a 100%, de modo a permitir o uso de técnicas de recuperação que não atinjam total eficiência em seus resultados. A ANVISA descreve em seu Guia da Qualidade, que fatores de recuperação acima de 75% são desejáveis (BRASIL, 2006).

O mesmo Guia da Qualidade é enfático quando diz que deve ser dada uma atenção toda especial à validação dos limites de detecção e quantificação. A validação de limpeza geralmente significa baixos limites de aceitação, fato que pode gerar dificuldade ao desempenho do método analítico escolhido. O limite de aceitação adotado para o contaminante deverá estar dentro do limite de quantificação da metodologia empregada e tal limite deverá ser testado quanto à sua precisão e exatidão (BRASIL, 2006).

Com relação à recuperação, Fekete et al. (2008) descrevem que a superfície dos equipamentos é feita na maior parte em aço inoxidável, mas existem alguns componentes feitos de borracha de silicone. Estas peças de silicone, dentro dos seus estudos, foram as mais críticas com relação à limpeza e amostragem. Eles ainda afirmam que, quando a recuperação

obtida for inferior a 50 %, os respectivos componentes críticos devem tornar-se dedicados à fabricação da determinada substância ativa.

Ainda neste aspecto, Ribani et al. (2004), baseando-se no Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos de 1999, que foi desenvolvido pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP), afirmam que os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ de DPR. Porém, dependendo da complexidade analítica e da própria amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ de DPR.

Dentro do desenvolvimento de uma metodologia de análise, a APIC ressalta que é interessante avaliar a estabilidade das amostras coletadas ao longo do tempo, ou seja, se o intervalo de tempo entre a remoção dos resíduos e a realização dos testes analíticos não altera a integridade das amostras coletadas. Apesar do parâmetro estabilidade não ser citado comumente na literatura como um aspecto a ser abordado durante a validação de uma metodologia analítica, foram encontrados autores que abordam este parâmetro de modo a dar um maior critério de segurança com relação à recuperação de resíduos em superfícies de equipamentos (APIC, 1999).

Mirza et al. (1998), através de seus estudos, enfatizou a necessidade de demonstrar experimentalmente a estabilidade do fármaco nas superfícies dos equipamentos, bem como sobre os *swabs* e em suas soluções teste. Na ausência de tal estabilidade é possível subestimar a quantidade de resíduos do fármaco remanescente nas superfícies dos equipamentos ou nos *swabs* antes da análise. Para demonstrar esse efeito, foram procedidas amostragens em placas de aço inox nos períodos de 1, 2 e 4 dias.

As primeiras amostras foram referentes ao produto seco nas placas e somente coletados nos períodos de interesse (transcorridas 24, 48 e 96 horas). As segundas amostradas foram relativas ao produto coletado nas placas no primeiro dia e postas em *vials* secos, que foram somente diluídas nos dias do estudo. A terceira amostragem fez-se com as placas sendo amostradas no primeiro dia e diluídas no mesmo momento, mas a análise foi realizada apenas nos dias de interesse. Ficou claro, de acordo com os resultados, que a maior estabilidade foi encontrada nos *swabs* secos que foram diluídos apenas na hora das análises. As demais amostras apresentaram o mesmo perfil de degradação.

Coutinho et al. (2009) também procuraram abordar a questão da estabilidade da substância a ser recuperada na superfície dos equipamentos e realizaram verificações em até 21 horas para as substâncias Sulfametoxazol e Trimetoprima. Foi então concluída a importância deste estudo na prevenção de que os resíduos sejam sobre-estimados, já que a

degradação dos analitos pode levar à detecção de quantidades menores do que as realmente existentes.

Outro caso importante a ser citado, agora voltando ao aspecto da validação da metodologia empregada, é o de Alencar et al. (2006), que fizeram uso de um método farmacopéico por espectrofotometria para determinação de resíduos de Mebendazol, cujo limite de quantificação foi de 1,156 mg/mL. De forma resumida, a validação de limpeza foi avaliada através da técnica de *swab* e as concentrações residuais de Mebendazol encontradas foram inferiores ao limite residual de 9,11 mg/mL, em cada amostra analisada, adotado como critérios de aceitação da validação de limpeza. De acordo, e apoiados pela Resolução 899, os autores não procederam com a etapa de validação da metodologia empregada, devido ao fato desta análise estar descrita em um compêndio oficial, no caso a Farmacopéia Brasileira. Porém, os autores procederam a uma verificação dos parâmetros linearidade e especificidade conforme a legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2003).

1.3.2.5 Limites de aceitação

O FDA, em seu guia para inspeção a procedimentos de limpeza, menciona não ter a intenção de definir limites de aceitação, bem como aos critérios das metodologias utilizadas para determinar se um procedimento de limpeza é validado. Essa tarefa é descrita como impossível devido à grande variação de equipamentos e produtos utilizados nos mais diversos parques industriais (FDA, 2011).

A ANVISA claramente está de acordo com a posição adotada pelo FDA, publicando em seu guia os mesmos princípios para definição dos limites, mas apresenta um perfil mais analítico, onde descreve três formas de se atingir um limite de aceitação. O primeiro preconiza o limite mínimo de não presença de mais que 0,1% (a milésima parte) da dose diária mínima do contaminante na dose diária máxima do produto subsequente, a segunda possibilidade baseia-se na presença de não mais que 10 ppm do contaminante no produto subsequente e, finalmente, propõe que nenhuma quantidade de resíduo deve ser visível após a execução do procedimento de limpeza. Fica claro que a adoção do limite de 10 ppm (segundo parâmetro) deve ser utilizada somente como um teto máximo, ou seja, no caso em que os outros limites baseados em toxicidade ou em dose terapêutica se apresentem mais altos que o mesmo (BRASIL, 2006).

De uma forma geral e sintética, a justificativa de uma empresa para os limites estabelecidos deverá ser lógica, sempre baseada no conhecimento fornecido pelo fabricante dos materiais envolvidos, prática e passível de verificação.

Ao debruçar sobre a prática adotada por diversos representantes da indústria farmacêutica, verificou-se o uso de limites baseados nos três perfis descritos pela ANVISA anteriormente: níveis de detecção analítica de 10 ppm, níveis de atividade biológica tal como 1/1000 da dose terapêutica normal, e os níveis organolépticos como, por exemplo, nenhum resíduo visível.

Abaixo estão descritas as fórmulas utilizadas no cálculo dos limites de contaminação apresentados pela ANVISA, incluindo a determinação por área compartilhada de equipamento e o limite de aceitação na amostra analisada (BRASIL, 2006).

O cálculo do limite de aceitação baseado no critério de não mais que 0,1% (milésima parte) da dose diária mínima do contaminante presente na dose diária máxima do produto subsequente, pode ser dividido em três equações que objetivam interligar esse limite de aceitação com os equipamentos utilizados, fornecendo limites de aceitação por área e por amostra analisada. Cabe frisar que estes limites são os que realmente serão utilizados no momento da pesquisa de contaminantes.

Primeira equação: Determinação do limite de aceitação no produto subsequente.

$$A = \frac{0,001 \times \text{MTDcont} \times \text{MBSsubs} \times 1000}{\text{MaxTDsubs}}$$

Pode-se notar que na presente equação:

A é limite máximo do contaminante no produto subsequente em µg;

0,001 é o fator de segurança (milésima parte) adotado;

MTDcont é a mínima dose diária do contaminante em mg;

MBSsubs descreve tamanho mínimo do lote do subsequente em g ou mL;

MaxTDsubs é a máxima dose diária do subsequente na mesma unidade do MBS.

Segunda equação: Determinação do limite de aceitação por área de equipamento.

$$B = \frac{A}{\text{SRSA}}$$

Onde:

B é o limite de aceitação do contaminante por cm² de área compartilhada em µg/cm²;

SRSA é a área compartilhada pelos produtos em cm².

Terceira equação: Determinação do limite de aceitação na amostra analisada.

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}}$$

Neste caso:

C é o limite de aceitação do contaminante por mL da solução a ser analisada (em µg/mL);

A ÁREA compreende toda a área compartilhada no caso de água de rinsagem ou a área amostrada no caso de *swab* em cm²;

VOLUME é o volume utilizado na rinsagem ou volume utilizado na recuperação do *swab* em mililitros.

Como foi dito anteriormente, existe um limite de aceitação considerado como teto máximo e, é utilizado no caso em que os limites baseados em toxicidade ou em dose terapêutica se apresentem-se mais altos que o mesmo. É o critério de 10 ppm.

Nesse caso aceita-se que o produto a ser removido esteja presente na forma farmacêutica do próximo produto em uma concentração de 10 ppm. Para fins de cálculo, somente o Passo A se altera (de acordo com as equações já elencadas acima):

$$A = 10 \times \text{MBSsubs}$$

Obs.: A segunda e a terceira etapa são calculadas da mesma maneira.

Durante os estudos de Mirza et al. (2008), um cálculo em concordância com os principais guias de validação foi utilizado para determinar o nível de limpeza farmacologicamente seguro de cloridrato de meclizina (MH). Este valor foi denominado como nível de limpeza residual específica (SRCL). A presente fórmula foi descrita como:

$$SRCL = \frac{RAL}{SA}$$

$$RAL = \frac{D}{SF} \times \text{tamanho do menor lote}$$

Onde:

SF é o fator de segurança (10000). Não mais que 1/10000 da quantidade do ativo presente na dose terapêutica do produto deve estar presente no subsequente;

D é menor dose do produto seguinte;

RAL é o nível de aceitação residual;

SA: Área superficial de todos os equipamentos utilizados na produção do medicamento

1.3.2.6 Desenvolvimento do protocolo de validação de limpeza

A APIC considera que um protocolo de validação completo deverá abordar os seguintes tópicos: introdução, objetivo, escopo, equipamentos abordados, procedimento de limpeza, procedimento de amostragem, metodologia analítica a ser utilizada, aceitação / limites de limpeza e critérios de aceitação para a validação (APIC, 1999).

A ANVISA, em suas Guias da Qualidade, de uma forma mais descritiva, menciona os seguintes tópicos a serem abordados: objetivo do processo de validação; definição das responsabilidades; descrição dos equipamentos a serem usados; procedimentos de limpeza escritos e aprovados (para todos os equipamentos ou partes destes); definição dos critérios utilizados para a escolha do agente de limpeza; relação de produtos que são utilizados em cada equipamento objeto do estudo; definição do intervalo entre o final da produção e o início dos procedimentos de limpeza; definição do intervalo entre a limpeza do equipamento e

utilização; procedimento detalhado da preparação da solução de detergente; número de ciclos de limpeza avaliados consecutivamente com os respectivos números de lotes dos produtos; realização de monitoramentos após a validação de limpeza; relatórios de qualificação dos instrumentos/equipamentos utilizados; procedimento de amostragem escolhido; incluindo a justificativa técnica de sua escolha e os procedimentos necessários à sua realização; identificação clara e inequívoca dos pontos de amostragem; identificação dos funcionários que serão responsáveis pela limpeza e pela amostragem; estudos de recuperação para a amostragem adotada; metodologia analítica validada para o propósito pretendido; o critério de aceitação e sua explicação científica abrangendo resíduos de produtos anteriores, detergente, contaminação microbiana e outros que sejam cabíveis; a extensão do estudo aplicado (outros produtos, processos e equipamentos para os quais o procedimento é extensível e pode ser considerado validado), e quando a revalidação deverá ser aplicada (BRASIL, 2006).

Todos os tópicos mencionados também são presentes no *CLEANING VALIDATION GUIDELINES* publicado pelo governo Canadense (HEALTH CANADA, 2008).

Com relação ao relatório final, o mesmo deverá avaliar todos os dados gerados com relação aos critérios de aceitação utilizados no estudo. O relatório também deve indicar a necessidade de revalidação, se houver, bem como a necessidade de monitoramentos periódicos.

2 OBJETIVO

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para pesquisa de resíduos de Efavirenz por método de *swab*.

2.1 Objetivos Específicos

1. Identificação e avaliação dos fatores críticos durante o procedimento de recuperação dos resíduos;
2. Identificação dos erros aleatórios na metodologia;
3. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise com um fator de recuperação de resíduo superior a 75%, uso de substâncias de baixa toxicidade, e o emprego de procedimentos ágeis e de baixo custo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões

- Padrão secundário de Efavirenz, teor de 99,9 %, registro: 57270, obtido por padronização externa utilizando padrão químico de referência adquirido da United States Pharmacopeia (Rockville, EUA).

3.1.2 Solventes

- Acetonitrila UV/HPLC, Marca: Tedia (EUA)
- Etanol PA, Marca: Merck (Alemanha)
- Metanol PA, Marca: Merck (Alemanha)
- Isopropanol PA, Marca: Vetec (Brasil)
- Água purificada obtida por sistema Zenopure Ultra 70

3.1.3 Materiais

- Colunas cromatográficas de empacotamento C8, aço inoxidável, de tamanho 250 x 4,6 mm, e partículas de 5 µm:
 - Symmetry® (Waters), Lote: 0174352311
 - Symmetry® (Waters), Lote: WAT054270
 - Symmetry® (Waters), Lote: 013530021136 43

- Membrana filtrante de acetato de celulose regenerada 0,45 μm , diâmetro 47 mm, Sartorius
- Unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 μm , diâmetro 25 mm, Macherey-Nagel
- Micropipeta com capacidade de 100 a 1000 μL , Labtex (certificada para uso)
- Balões volumétricos classe A calibrados e certificados, Marcas: Brand, Hermex e Vidro Química
- Pipetas volumétricas classe A calibradas e certificadas, Marcas: Brand, Hermex e Vidro Química
- Provetas calibradas e certificadas, Marcas: Brand, Hermex e Vidro Química
- *Vials* de 2,0 e 4,0 mL com tampa de rosca e septo de Teflon
- Placas de aço inoxidável 316L com 25cm²
- *Swab* Coventry™ modelo 36060, corpo de polipropileno e cabeça de poliéster, dimensões do corpo: 14,7 cm x 3,1 mm, dimensões da cabeça: 18,9 mm x 4,7 mm x 5,4 mm
- *Swab* Texwipe®, Alpha® *Swab*, modelo TX761, corpo de polipropileno e cabeça de poliéster, dimensões do corpo: 14,55 cm x 3,2 mm, dimensões da cabeça: 16,8 mm x 2,8 mm x 6,8 mm

3.1.4 Equipamentos

- Balança analítica Sartorius modelo ME235S (calibrada e certificada para uso)
- Banho de ultrassom Arruda modelo SX50, 40 kHz (calibrada e certificada para uso)
- Banho de ultrassom Unique modelo USC 2800 A, 40 kHz (calibrada e certificada para uso)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi Lachrom, sistema quaternário com mistura a baixa pressão, detector de arranjo de fotodiodos e programa LC Solution (qualificado e certificado para uso)

3.2 Métodos

3.2.1 Metodologia Analítica

3.2.1.1 Parâmetros Cromatográficos

Coluna empacotada C8, com dimensões de 250 x 46 mm e tamanho de partículas de 5 µm. Detecção por ultravioleta (UV) com leitura a 250 nm de comprimento de onda. A análise é procedida à temperatura de 25 °C e o volume injetado é de 20 µL a um fluxo de 1,0 mL. O tempo de retenção do Efavirenz é de cerca de 5 min.

3.2.1.2 Preparo do Diluente

Em uma proveta de 1000 mL, com tampa, acrescentar 500 mL de acetonitrila e 500 mL de água purificada. Proceder à homogeneização da solução por meio de agitação.

3.2.1.3 Preparo da Fase Móvel

Em uma proveta de 1000 mL, com tampa, acrescentar 700 mL de acetonitrila e 300 mL de água purificada. Proceder à homogeneização da solução por meio de agitação. Realizar a filtração da solução com uma membrana filtrante de acetato de celulose regenerada 0,45 µm, diâmetro 47 mm.

3.2.1.4 Preparo do Padrão de Efavirenz

Pesar 25 mg de padrão secundário de Efavirenz e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 80 mL de diluente e dissolver com o auxílio de um banho ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com diluente e homogeneizar a solução. Transferir uma alíquota de 10,0 mL para um balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume com diluente e proceder à homogeneização da solução por meio de agitação. Realizar a filtração da solução com uma membrana filtrante de acetato de celulose regenerada 0,45 μm , diâmetro 47 mm.

3.2.1.5 Teste de recuperação

Pesar 43,5 mg do padrão secundário de Efavirenz (proporcional a 100% de teor) e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Acrescentar cerca de 25 mL de acetonitrila. Após completa solubilização do padrão, avolumar com acetonitrila e proceder à homogeneização. Concentração de Efavirenz na solução contaminante: 870 $\mu\text{g/mL}$.

Selecionar cinco placas de aço inoxidável 316L de 5 cm x 5 cm limpas anteriormente conforme o procedimento de limpeza realizado nos equipamentos utilizados na fabricação do Efavirenz.



Figura 5 - Placas de aço inox 316L, com 25 cm² de área

Cada placa deverá ser contaminada com 200 µL da solução contaminante preparada anteriormente, de modo a permitir o depósito do limite de resíduo de Efavirenz (173,81 µg).

Aplicar a solução com o auxílio de uma micropipeta automática de modo a produzir pequenos *spots*, de caráter uniforme, sobre toda a superfície de cada uma das placas.

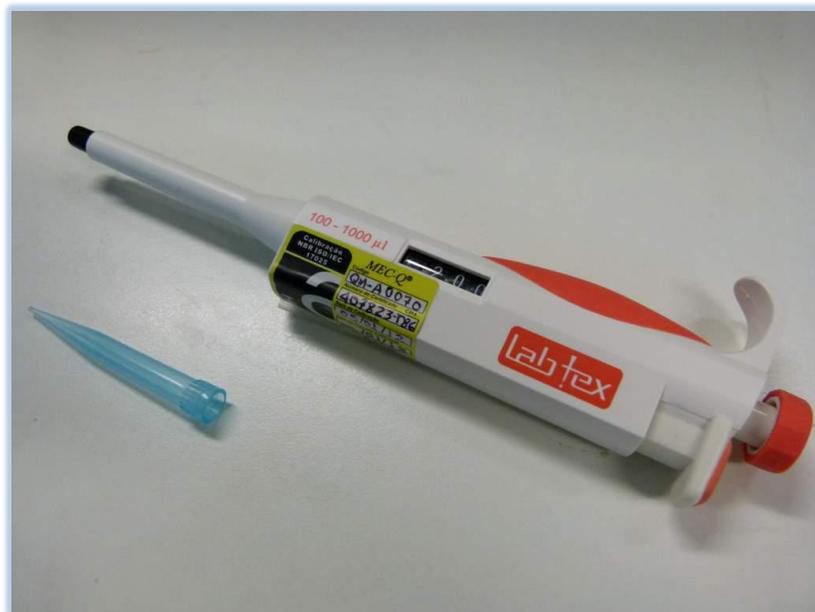


Figura 6 – Micropipeta e ponteira

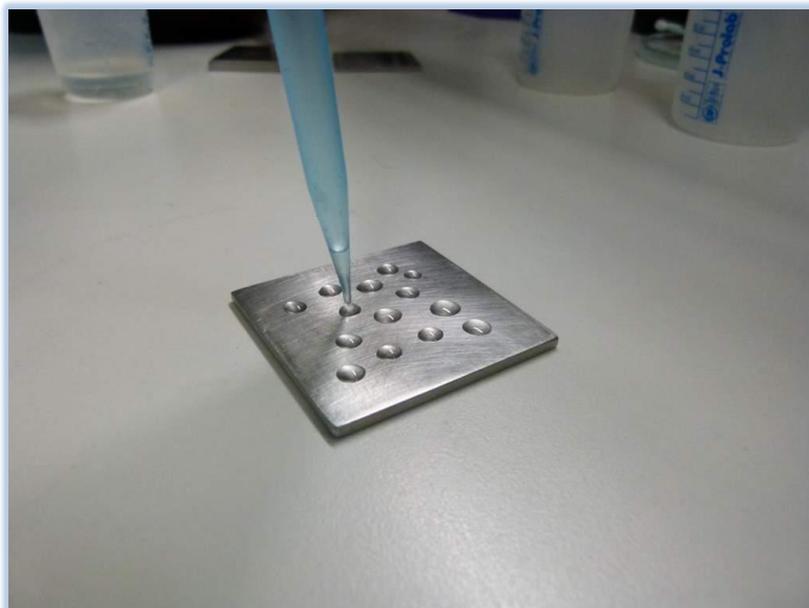


Figura 7 – Realização dos *spots* com uso de micropipeta

Após a total dispensação da solução contaminante de Efavirenz, as placas deverão ser reservadas a temperatura ambiente, de modo a permitir a total evaporação da solução.

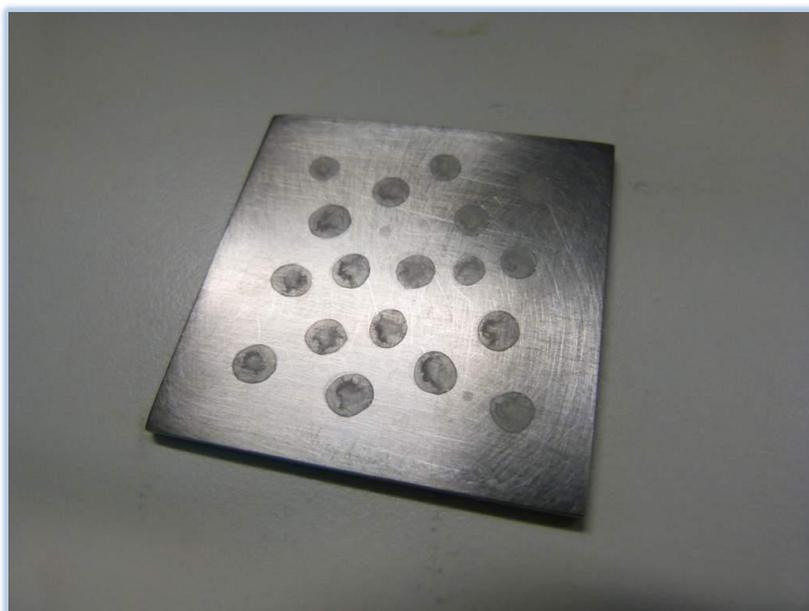


Figura 8 – Placa após total evaporação da solução contaminante

Deve-se então proceder a recuperação do material depositado com o auxílio de *swab* previamente umedecido no solvente extrator. Remover o excesso do solvente por meio de pressão do *swab* na parede do seu recipiente de guarda.



Figura 9 – Retirada do excesso de solvente

Realizar esfregaço do *swab* sobre toda a superfície da placa, primeiramente na vertical, em um ângulo de 180 graus em relação à mesma e alternando os lados do *swab*. O procedimento é então repetido na posição horizontal com a mesma angulação e alternância de lados.

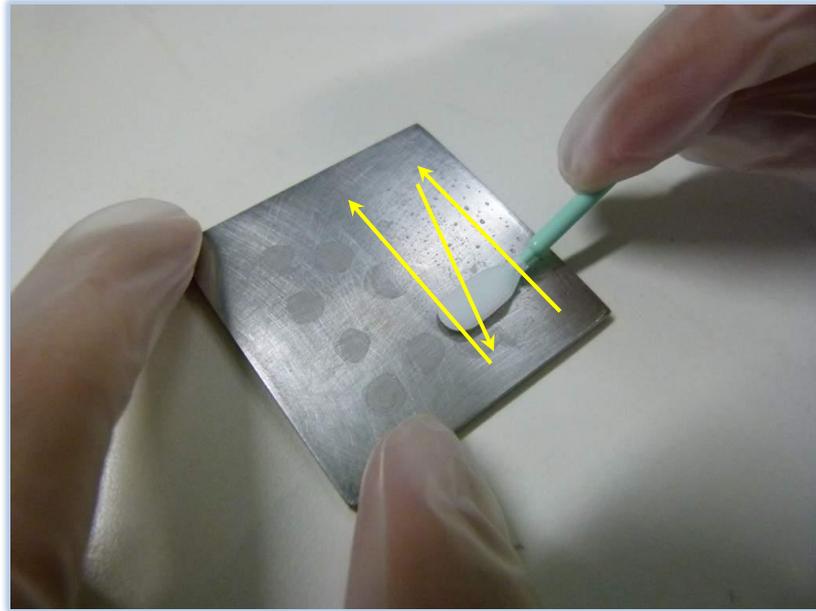


Figura 10 – Início do esfregaço no sentido vertical

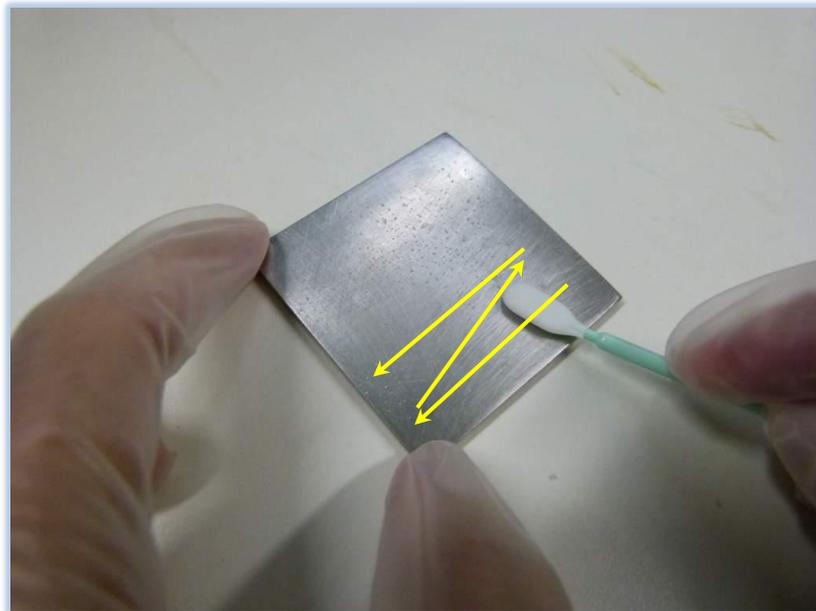


Figura 11 – Finalização do esfregaço no sentido horizontal

Após o esfregaço, o *swab* deverá ser disposto dentro de um *vial* de 4 mL contendo 4 mL do diluente (Acetonitrila e Água purificada 1:1). A haste é então cortada com o auxílio de uma tesoura e procede-se o fechamento do *vial*.

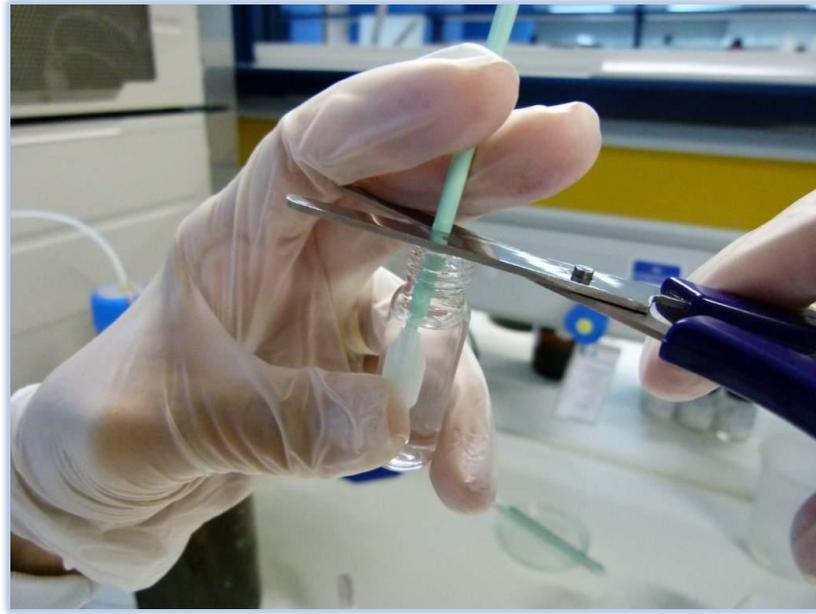


Figura 12 – Corte da haste do *swab* após esfregação



Figura 13 – *Vial* preparado para ir ao ultrassom

O material é extraído com auxílio do banho de ultrassom e após, filtrado com uma unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 μm .



Figura 14 – Amostras em processo de sonicação

A presente metodologia será realizada com diferentes modelos de *swab* de modo a avaliar a influência dos mesmos na recuperação do resíduo. O mesmo se aplica para o solvente extrator, onde se busca uma substância com bom potencial de solubilização do Efavirenz e baixa toxicidade. A descrição dos solventes a serem testados, bem como os modelos dos *swabs* selecionados, estão elencados na tabela 2.

Outro fator a ser testado será quanto ao tempo de ultrassom utilizado na amostra após o fechamento dos *vials*. Os mesmos procedimentos de recuperação envolvendo os modelos de *swab* e seus respectivos solventes extratores, indicados na tabela 2, serão realizados com 15 e 30 minutos de tempo de sonicação.

Tabela 2 – *Swabs* e Solventes utilizados no teste de recuperação, utilizando 15 e 30 minutos de tempo de ultrassom

Modelo de <i>Swab</i>	Solventes Extratores
Coventry™ modelo 36060	Acetonitrila
	Acetonitrila / Água purificada (1:1)
	Metanol / Água purificada (1:1)
	Etanol
	Etanol / Água purificada (1:1)
	Isopropanol
Texwipe® modelo TX761	Acetonitrila
	Acetonitrila / Água purificada (1:1)
	Metanol / Água purificada (1:1)
	Etanol
	Etanol / Água purificada (1:1)
	Isopropanol

3.2.1.6 Teste em Branco

Colocar um *swab* limpo e seco dentro de um *vial* de 4 mL contendo 4 mL de diluente, cortar sua haste e fechar o *vial*. Extrair com auxílio do banho de ultrassom por aproximadamente 15 minutos e filtrar com uma unidade filtrante de celulose regenerada 0,45 µm.

3.2.1.7 Adequação do sistema

No início de cada dia de trabalho, são analisadas três injeções consecutivas da solução padrão. O DPR deverá ser de no máximo 2,0 %. Caso necessário, corrigir os parâmetros cromatográficos para obter os picos com respostas satisfatórias.

3.2.1.8 Critério de aceitação

Todos os resultados de recuperação (5 placas) deverão apresentar valores superiores a 75%. Com relação à dispersão, serão aceitos valores inferiores a 20% de DPR.

3.2.2 Determinação dos limites (LD e LQ)

Os ensaios devem ser realizados em triplicata.

Pesar cerca de 15,0 mg de padrão de Efavirenz para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar cerca de 30 mL de diluente. Solubilizar com o auxílio de ultrassom por 15 minutos. Após resfriamento, a temperatura ambiente, completar o volume com diluente e homogeneizar a solução.

Transferir alíquota de 5 mL para balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume com diluente e homogeneizar.

A partir dessa solução (estoque), proceder diferentes diluições de modo a preparar uma curva de calibração cujas concentrações de Efavirenz serão de 0,3 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,9 µg/mL, 1,2 µg/mL e 1,5 µg/mL, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Marcha de diluição para construção das curvas de calibração na determinação do LD e do LQ

Alíquota da solução estoque (mL)	Volume final (mL)	Concentração (µg/mL)
2,0	100	0,3
2,0	50	0,6
3,0	50	0,9
2,0	25	1,2
5,0	50	1,5

Injetar todas as soluções em triplicata de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.1 (parâmetros cromatográficos).

Construir os gráficos das concentrações (x) *versus* áreas dos picos cromatográficos (y) determinando as equações das retas.

$$y = ax + b$$

Efetuar a análise de regressão de cada curva.

Calcular o limite de detecção pela fórmula:

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

Onde:

DPa é desvio padrão do intercepto com o eixo do Y;

IC é a inclinação da curva de calibração; e

O numeral 3 se refere a três vezes o ruído da linha de base.

Calcular o limite de quantificação pela fórmula:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa é desvio padrão do intercepto com o eixo do Y;

IC é a inclinação da curva de calibração; e

O numeral 10 se refere a dez vezes o ruído da linha de base.

3.2.2.1 Critério de aceitação

O coeficiente de correlação (R) deve ser no mínimo igual a 0,99 para cada uma das curvas.

O valor do LQ, em $\mu\text{g/mL}$, deverá ser inferior a 43,45 $\mu\text{g/mL}$ de Efavirenz (concentração da amostra no limite de aceitação).

3.2.3 Linearidade no intervalo

Preparar três curvas de calibração, em sete níveis de concentração igualmente distribuídos no intervalo escolhido, de modo que o nível mais baixo de concentração contemple o LQ e o superior contemple a concentração da amostra no limite de aceitação (43,45 $\mu\text{g/mL}$).

Injetar todas as soluções em triplicata de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.1 (parâmetros cromatográficos).

3.2.3.1 Critério de aceitação

O coeficiente de correlação (R) deve ser no mínimo igual a 0,99 para cada uma das curvas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo a enriquecer a presente dissertação, optou-se pela divisão do capítulo 4 em quatro subitens, no qual o primeiro discorrerá sobre a forma em que foi calculado o atual limite de adequabilidade de resíduos de Efavirenz no atual parque fabril de Farmanguinhos. Em seguida, o objetivo será apresentar e discutir os resultados de recuperação obtidos através do emprego da metodologia descrita anteriormente no capítulo 3. Em um terceiro momento, serão apresentados e analisados os parâmetros envolvidos na validação da metodologia final.

Por fim, será apresentado um resumo dos principais pontos discutidos.

4.1 Determinação do limite de adequação para resíduo de Efavirenz

Devido ao fato de Farmanguinhos ser um laboratório localizado em território brasileiro, fica evidente que os procedimentos relacionados à validação de limpeza e demais exigências sanitárias sempre irão se basear, primordialmente, nas normas, legislações e guias publicados pelos órgãos nacionais. Neste sentido, a determinação dos limites de aceitação para resíduos tiveram seus cálculos norteados pelas publicações da ANVISA (BRASIL, 2006).

O processo de seleção do Efavirenz como pior caso dentre todos os demais medicamentos produzidos em Farmanguinhos foi baseado nos dados farmacotécnicos, farmacológicos e físico-químicos apresentados na tabela 4. Dessa forma, todos os produtos que compartilham algum equipamento foram elencados nessa matriz de modo a promover uma comparação entre eles (BRASIL, 2006; HEALTH SCIENCES AUTHORITY, 2008).

É importante ressaltar que no momento da montagem da tabela foi necessário incluir outros medicamentos fora da classe dos ARVs, tendo em vista que o processo de fabricação dos medicamentos em questão faz uso da técnica de granulação úmida, processo esse também utilizado na produção do Efavirenz.

Tabela 4 – Estudo para escolha do pior caso

Produtos	Classe Terapêutica	Solubilidade em água	Mínima Dose Terapêutica Diária	Máxima Dose Terapêutica Diária	Máxima Dose Terapêutica em produto (mg)	Tamanho de Lotes (mg)	Toxicidade DL_{50} (mg/kg)
Cloroquina 150 mg	Antimalárico	Livemente solúvel	150 mg 1 x dia	600 mg / dia	4 comp. x 420 mg = 1680mg	210.000.000	330
Efavirenz 600 mg	Antirretroviral	Praticamente insolúvel	600 mg 1 x dia	600 mg / dia	1 comp. x 1200 mg = 1200 mg	188.496.000	>750
Etionamida 250 mg	Tuberculostático	Levemente solúvel	250 mg 3 x dia = 750 mg	750 mg / dia	3 comp. x 435 mg = 1305 mg	200.307.000	1320
Fenobarbital 100 mg	Anticonvulsivante	Pouco solúvel	100 mg 1 x dia	300 mg / dia	3 comp. x 144 mg = 432 mg	288.000.000	162
Metildopa 250 mg	Anti-hipertensivo	Levemente solúvel	250 mg 2 x dia = 500 mg	750 mg / dia	3 comp. x 362,37 mg = 1087,12 mg	181.190.000	1500000
Metildopa 500 mg	Anti-hipertensivo	Levemente solúvel	500 mg 1 x dia	2000 mg / dia	4 comp. x 722 mg = 2888 mg	180.505.000	1500000
Praziquantel 600 mg	Anti-helmintico	Praticamente insolúvel	600 mg 1 x dia	600 mg / dia	1 comp. x 720 mg = 720 mg	172.800.000	2454
Sulfato Ferroso 40 mg	Antianêmico	Livemente solúvel	40 mg 2 x dia = 80 mg	40 mg 5 x dia = 200 mg	5 comp. x 254 mg = 1270 mg	223.048.000	319

Produtos	Classe Terapêutica	Solubilidade em água	Mínima Dose Terapêutica Diária	Máxima Dose Terapêutica Diária	Máxima Dose Terapêutica em produto (mg)	Tamanho de Lotes (mg)	Toxicidade DL₅₀ (mg/kg)
Estavudina 30 mg	Antirretroviral	Solúvel	30 mg 2 x dia = 60 mg	60 mg / dia	2 cáps. x 280 mg = 560 mg	140.000.000	> 2000
Lamivudina + Zidovudina (150 + 300) mg	Antirretroviral	Solúvel	150 mg + 300 mg 2 x dia = 300mg + 600 mg	300 mg + 600 mg / dia	2 cáps. x 687 mg = 1374 mg	171.750.000	> 2000
Lamivudina 150 mg	Antiviral	Solúvel	150 mg 2 x dia = 300 mg	300 mg / dia	2 comp. x 258 mg = 516 mg	128.750.000	> 2000
Nevirapina 200 mg	Antirretroviral	Praticamente insolúvel	200 mg 1 x dia = 200 mg	400 mg / dia	2 comp x 664 mg = 1328 mg	132.800.000	400
Ribavirina 250 mg	Antiviral	Livremente solúvel	500 mg 2 x dia = 1000 mg	600 mg 2 x dia = 1200 mg	5 cáps. x 300 mg = 1500 mg	120.000.000	200
Zidovudina 100 mg	Antirretroviral	Levemente solúvel	200 mg 3 x dia = 600 mg	300 mg 2 x dia = 600 mg	6 cáps. x 170 mg = 1020 mg	170.000.000	3084

Na legislação Brasileira, bem como nos demais guias relativos à validação de limpeza, fica claro que a escolha do pior caso dentre possíveis contaminantes deverá levar em conta, como fator de maior criticidade, a sua solubilidade em água, por ser este o principal veículo utilizado no processo de limpeza sem causar prejuízo ao meio ambiente. Três produtos foram classificados como “praticamente insolúveis”: Efavirenz 600 mg, Praziquantel 600 mg e a Nevirapina 200 mg (HEALTH CANADA, 2011; BRASIL 2006).

Analisando a tabela 4, a Nevirapina é o produto que possui a maior toxicidade dentre os três pré-selecionados e também possui uma baixa dose terapêutica, o que acarretaria prejuízos à saúde pública em caso de contaminação. Porém, um requisito que foi elencado com um peso maior no momento da escolha, foi quanto a maior dificuldade de remoção no momento da limpeza pela experiência dos operadores, tendo em vista ser esta uma análise prática de quão difícil realmente é a retirada de uma dada substância, e nesse quesito nenhum produto se aproximou do Efavirenz (BRASIL, 2006; FDA 2011).

Cabe salientar que o Efavirenz também possui uma alta toxicidade, o que, juntamente com sua baixa solubilidade em água e sua perceptível dificuldade de remoção, o elegeram como pior caso, seguido da Nevirapina e do Praziquantel.

Fazendo uso dos dados apresentados na tabela 4, e após a escolha do pior caso, segue-se a próxima etapa que é a escolha do produto subsequente que será de mais fácil contaminação. Essa escolha, de acordo com os Guias da Qualidade da ANVISA, que corroboram com o FDA, se deu pelo estudo da razão entre o Menor Tamanho de Lote e a Maior Dose Terapêutica. Os valores encontrados foram compilados na tabela 5 (BRASIL, 2006; FDA 2011).

Tabela 5 – Estudo para escolha do produto subsequente

Produto	<i>Menor tamanho de lote Maior dose terapêutica</i>
Cloroquina 150 mg	$\frac{210.000.000 \text{ mg}}{1.689 \text{ mg}} = 124.334$
Efavirenz 600 mg	$\frac{188.496.000 \text{ mg}}{1.200 \text{ mg}} = 157.080$
Etionamida 250 mg	$\frac{200.307.000 \text{ mg}}{1.305 \text{ mg}} = 153.492$
Fenobarbital 100 mg	$\frac{288.000.000 \text{ mg}}{432 \text{ mg}} = 666.667$
Metildopa 250 mg	$\frac{181.190.000 \text{ mg}}{1.087,12 \text{ mg}} = 166.670$
Metildopa 500 mg	$\frac{180.505.000 \text{ mg}}{2.888 \text{ mg}} = 62.502$
Praziquantel 600 mg	$\frac{172.800.000 \text{ mg}}{720 \text{ mg}} = 240.000$
Sulfato Ferroso 40 mg	$\frac{223.048.000 \text{ mg}}{1.270 \text{ mg}} = 175.628$
Estavudina 30 mg	$\frac{140.000.000 \text{ mg}}{560 \text{ mg}} = 250.000$
Lamivudina + Zidovudina (150 + 300) mg	$\frac{171.750.000 \text{ mg}}{1.374 \text{ mg}} = 125.000$
Lamivudina 150 mg	$\frac{128.750.000 \text{ mg}}{516 \text{ mg}} = 157.080$
Nevirapina 200 mg	$\frac{132.800.000 \text{ mg}}{1.328 \text{ mg}} = 100.000$
Ribavirina 250 mg	$\frac{120.000.000 \text{ mg}}{1.500 \text{ mg}} = 80.000$
Zidovudina 100 mg	$\frac{170.000.000 \text{ mg}}{1.020 \text{ mg}} = 166.667$

O estudo dessa razão leva em consideração o fato de que um produto possuidor de uma alta dose terapêutica será responsável por uma maior quantidade de medicamento (cápsulas ou comprimidos) ingerido por um paciente, ou seja, se existir algum contaminante presente no produto, quanto maior a quantidade administrada, maior será a quantidade ingerida do contaminante pelo paciente. Em contrapartida, quanto menor for o tamanho do lote médio produzido desse medicamento, maior será a concentração do contaminante no produto final.

Ao observar os dados acima, fica evidenciado que o menor valor (62.502) dentre todas as razões é o do produto Metildopa 500 mg, devendo ser ele o escolhido para ser assinalado como produto subsequente de mais fácil contaminação.

A partir do momento que já se deu a definição do pior caso (Efavirenz 600 mg) bem como do produto subsequente de mais fácil contaminação (Metildopa 500 mg), avalia-se quais equipamentos são compartilhados pelos dois produtos.

A tabela 6 apresenta todos os equipamentos utilizados na fabricação do Efavirenz e correlaciona quais dentre eles são compartilhados com a fabricação da Metildopa 500 mg, obtendo-se no final qual é a área total, em cm^2 , compartilhada pelos mesmos. O somatório da área compartilhada pelos dois produtos será um dado fundamental para determinar o limite de aceitação em uma determinada área de equipamento.

Tabela 6 – Equipamentos compartilhados entre Efavirenz 600 mg e Metildopa 500 mg.

Fabricação do produto Efavirenz 600 mg		Área compartilhada pelo produto Metildopa 500 mg
Equipamentos envolvidos	Área (cm^2)	
Granulador Niro Atomizer 300 L / 280	27.759,65	27.759,65
Secador de Leito Fluidizado GLATT	74.086,61	74.086,61
Misturador em "V" LAWES 500L (n° 1)	50.868,67	50.868,67
Granulador Oscilante LAWES (n° 1)	11.015,92	11.015,92

Fabricação do produto Efavirenz 600 mg		Área compartilhada pelo produto Metildopa 500 mg
Equipamentos envolvidos	Área (cm²)	
Granulador Oscilante LAWES (n° 3)	11.015,92	11.015,92
Moinho EUROVENT (n° 1)	10.454,30	10.454,30
Moinho EUROVENT (n° 3)	10.454,30	10.454,30
Compressora FETTE 1200i (n° 18)	68.579,96	-----
Compressora FETTE 2090i (n° 21)	141.685,76	-----
Drageador GS 300	73.369,46	-----
Drageador Eurovent DC 200	85.439,76	85.439,76
Enchedora/Contadora de Frascos CREMER	16.648,64	-----
Enchedora de Frascos SWIFTPACK	6.385,54	-----
Área total (cm²) compartilhada		259.624,91

De maneira a esclarecer a soma de todas as áreas apresentadas na tabela 6 (área total compartilhada), durante a fabricação da Metildopa 500 mg se faz uso de apenas um Granulador Oscilante LAWES e um Moinho EUROVENT por vez, esse é o motivo pelo qual a área total compartilhada ser de apenas 259.624,91 cm².

Possuindo todos os dados necessários, seguiu-se aos cálculos do limite de aceitação de resíduo de Efavirenz. Cálculos esses que se espelharam nos preceitos descritos em FDA (2011) e BRASIL (2006) e apresentados no item 1.3.2.5 da presente dissertação.

Primeira equação: Determinação do limite de aceitação no produto subsequente.

$$A = \frac{0,001 \times \text{MTDcont} \times \text{MBSsubs} \times 1000}{\text{MaxTDsubs}}$$

$$A = \frac{0,001 \times 600 \times 180.505 \times 1000}{2,888}$$

$$A = 37.501.038,7812$$

Onde:

A: limite máximo do contaminante no produto subsequente em μg ;

0,001: fator de segurança (milésima parte) adotado;

MTDcont: mínima dose diária do contaminante em mg;

MBSsubs: tamanho mínimo do lote do subsequente em g;

MaxTDsubs: máxima dose diária do subsequente em g.

Segunda equação: Determinação do limite de aceitação por área de equipamento.

$$B = \frac{A}{\text{SRSA}}$$

$$B = \frac{37.501.038,7812}{259.624,91}$$

$$B = 144,4431$$

Onde:

B é o limite de aceitação do contaminante por cm^2 de área compartilhada em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;

SRSA é a área compartilhada pelos produtos em cm^2 .

Terceira equação: Determinação do limite de aceitação na amostra analisada.

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}}$$

$$C = \frac{144,4431 \times 25}{4}$$

$$C = 902,77$$

Onde:

C é o limite de Aceitação do Contaminante por mL da solução a ser analisada;

ÁREA: compreende toda a área compartilhada no caso de água de rinsagem ou a área amostrada no caso de *swab* em cm²;

Volume: volume utilizado na recuperação do *swab* em mL.

Como foi explicitado na revisão de literatura, existe um segundo critério, no qual se utiliza o valor de 10 ppm como teto máximo para o cálculo do limite máximo do contaminante no produto subsequente (A). O cálculo acima foi então repetido de modo a comparar o novo critério com o anterior, baseado em toxicidade ou em dose terapêutica (BRASIL, 2006).

Primeira equação: Determinação do limite de aceitação no produto subsequente.

$$A = 10 \times \text{MBSsubs}$$

$$A = 10 \times 180.505$$

$$A = 1.805.050$$

Onde:

A: limite máximo do contaminante no produto subsequente em µg;

180.505: tamanho mínimo do lote do subsequente em g;

Segunda equação: Determinação do limite de aceitação por área de equipamento.

$$B = \frac{A}{\text{SRSA}}$$

$$B = \frac{1.805.050}{259.624,91}$$

$$B = 6,9525$$

Onde:

B é o limite de aceitação do contaminante por cm² de área compartilhada em µg/cm²;
259.624,91 é a área compartilhada pelos produtos em cm².

Terceira equação: Determinação do limite de aceitação na amostra analisada.

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}}$$

$$C = \frac{6,9525 \times 25}{4}$$

$$C = 43,45$$

Onde:

C é o limite de Aceitação do Contaminante por mL da solução a ser analisada;
25: compreende toda a área compartilhada no caso de água de rinsagem ou a área amostrada no caso de *swab* em cm²;
4: volume utilizado na recuperação do *swab* em mL.

Ao realizar a comparação entre os dois critérios de aceitação calculados, ficou evidente que o valor de 43,45 µg/mL é mais crítico em comparação ao de 902,77 µg/mL, sendo então adotado como limite de aceitação de Efavirenz na amostra analisada. De modo convencional, Farmanguinhos prefere demonstrar seus limites de aceitação para resíduos na forma de µg/*swab* ou µg/25 cm², ficando o valor final estabelecido como 173,81 µg/*swab*.

Após a determinação do pior caso bem como do seu limite de aceitação, segue-se com os ensaios para determinar qual a mais eficiente forma de recuperação do resíduo.

4.2 Desenvolvimento da metodologia analítica

A metodologia para determinação de resíduos de um determinado ativo farmacêutico se baseia, na maioria das vezes, na metodologia para determinação do teor desse ativo em seu produto acabado. Dessa forma, o método proposto neste projeto utilizou os parâmetros cromatográficos (descritos no item 3) presentes na metodologia para determinação de Efavirenz no produto Efavirenz 600 mg, método esse previamente validado pelo setor de Controle da Qualidade de Farmanguinhos, e que por sua vez, se baseou nos preceitos da *International Pharmacopoeia*, mais tarde corroborado pela Farmacopeia Brasileira em sua 5ª edição (WHO, 2011); (BRASIL, 2010); (VIANA et al., 2011).

4.2.1 Amostragem

Diferentemente de uma simples determinação de teor em um produto acabado, na qual a amostra é obtida diretamente de um comprimido, o presente método irá se distinguir quando da necessidade em pesquisar e recuperar o resíduo de Efavirenz nos equipamentos utilizados em sua fabricação, sendo necessário que se faça uso de uma técnica de coleta que seja capaz de retirar, satisfatoriamente, o produto das superfícies em questão.

Neste sentido, foram propostos estudos envolvendo a técnica de amostragem por *swab*, onde foram testados diferentes tipos de solventes extratores frente a dois modelos de *swab* (tabela 2). A técnica de amostragem direta por meio de soluções de enxágue foi descartada devido a sua complexidade de realização, a qual poderia inclusive comprometer a integridade dos equipamentos no momento em que fosse posta em operação (APIC 1999).

O parâmetro visual nunca foi uma opção considerada válida, vide os estudos realizados por FORSYTH et al. (2006), onde não foram obtidos resultados conclusivos que pudessem colocar essa técnica no mesmo patamar das anteriores, sendo apenas utilizada como um importante pré-teste.

O primeiro passo foi quanto à escolha dos *swabs*. Os dois modelos propostos foram o Coventry™ modelo 36060, já utilizado historicamente por Farmanguinhos, e o modelo TX761 da empresa Texwipe®. Esse segundo modelo foi escolhido através dos bons

resultados apresentados no trabalho de GOMES e SOUZA (2010), e por ser largamente utilizado por outras empresas farmacêuticas.

Quanto aos solventes extratores, o estudo procurou abranger todas as substâncias descritas na literatura como bons solubilizantes do Efavirenz (MERCK RESEARCH LABORATORIES, 2001); (ROWE et al., 1999). No caso do metanol, devido ao seu caráter tóxico, foi proposto trabalhar apenas com uma solução 1:1 do solvente orgânico com água purificada, de modo a diminuir sua volatilidade e agressividade para com o analista.

Baseando-se nos Guias relacionados à Garantia da Qualidade, se optou pela utilização de cinco placas de aço inox 316L com 25 cm² de área superficial para a realização dos ensaios. A escolha desse número se deveu, principalmente, ao fato de ser esta a quantidade de placas utilizadas historicamente nos demais protocolos de validação realizados no Controle da Qualidade de Farmanguinhos, além de ser a capacidade máxima de ensaios realizados por um analista em um dia. A opção de 6 ou 10 placas se tornou inviável devido a necessidade de realização dos experimentos em dois dias, visto que seria necessário limpar as placas já contaminadas e esperar sua secagem para a realização do restante do experimento, o que agregaria um nova variável no método (BRASIL 2006).

Cabe uma especial atenção com relação às características de formato de cabeça dos dois *swabs* utilizados, já que com relação aos seus aspectos materiais estão em situação de igualdade, onde os corpos são feitos de polipropileno e o material utilizado nas cabeças é o poliéster.

Ao analisar as figuras 15 e 16, nota-se que a cabeça do *swab* modelo 36060 apresenta um formato circular próprio do seu cabo, visto que o mesmo preenche integralmente seu interior formando uma estrutura rígida e com baixa presença de poliéster, o que irá gerar uma pequena superfície de contato com a placa de aço inox utilizada no experimento. Já o modelo TX761 apresenta uma cabeça em formato de pá, onde existe uma maior quantidade de poliéster em sua constituição, devido ao afinamento do cabo na área da cabeça, gerando um aspecto de almofada, que proporcionará um maior espalhamento e contato com a superfície, além de carregar uma maior quantidade de solvente extrator.



Figura 15 – Formato de cabeça do *swab* Coventry™ modelo 36060

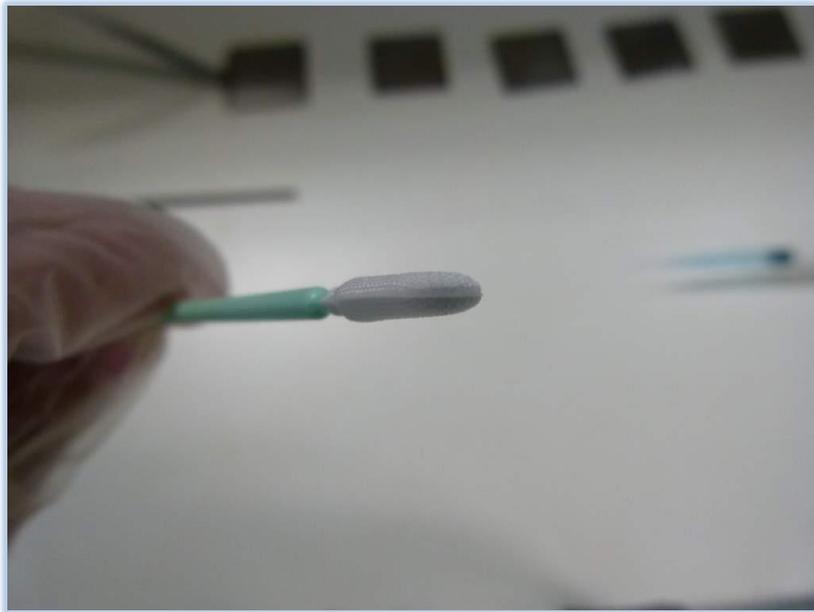


Figura 16 – Formato de cabeça do *swab* Texwipe® modelo TX761

4.2.2 Taxa de recuperação

Foram realizados os ensaios de acordo com o descrito na tabela 2 presente no item 3.2.1.5.

Todos os resultados de recuperação estão demonstrados, de forma resumida, nas tabelas 7, 8, 9 e 10. Os dados brutos, contendo a quantidade de Efavirenz contaminante para cada placa e os valores obtidos em cada injeção no sistema de CLAE em $\mu\text{g/mL}$ estão presentes no Apêndice.

As tabelas 7 e 8 apresentam os resultados encontrados com o *swab* modelo 36060 da fabricante Coventry™, e se distinguem pelos diferentes tempos de extração empregados (15 e 30 minutos). O mesmo ocorre com as tabelas 9 e 10 que se referem ao modelo TX761 da fabricante Texwipe® e também variam quanto aos tempos de ultrassom.

Em cada uma das tabelas percebem-se os seis tipos de solventes ou soluções extratoras utilizadas para promover as recuperações, seguidas por seus respectivos resultados.

Cada um dos resultados de taxa de recuperação está disposto individualmente por placa, seguido imediatamente pelo DPR das cinco placas e pela média das mesmas, sendo que o menor valor encontrado dentre cada uma das placas de um mesmo ensaio apresenta-se sublinhado.

Tabela 7 – Resultados de recuperação obtidos com o *Swab Coventry*TM modelo 36060 e 15 minutos de ultrassom

Solvente extrator	Recuperação com <i>Swab Coventry</i> TM modelo 36060 (%)						
	(15 minutos de ultrassom)						
	1	2	3	4	5	DPR	Média
Acetonitrila	<u>83</u>	96	93	89	95	5,84	91
Acetonitrila : Água (1:1)	51	54	51	63	<u>42</u>	14,48	52
Metanol : Água (1:1)	43	43	47	44	<u>42</u>	4,37	44
Etanol	64	<u>53</u>	58	55	60	7,42	58
Etanol : Água (1:1)	39	37	41	<u>33</u>	45	11,47	39
Isopropanol	<u>34</u>	44	49	42	42	12,87	42

Tabela 8 – Resultados de recuperação obtidos com o *Swab Coventry*TM modelo 36060 e 30 minutos de ultrassom

Solvente extrator	Recuperação com <i>Swab Coventry</i> TM modelo 36060 (%)						
	(30 minutos de ultrassom)						
	1	2	3	4	5	DPR	Média
Acetonitrila	91	95	87	<u>86</u>	92	4,11	90
Acetonitrila : Água (1:1)	<u>50</u>	51	55	54	67	12,37	55
Metanol : Água (1:1)	40	30	38	<u>25</u>	38	18,88	34
Etanol	<u>61</u>	66	78	78	77	11,07	72
Etanol : Água (1:1)	65	<u>62</u>	74	77	70	8,97	69
Isopropanol	48	<u>37</u>	43	63	52	20,03	49

Tabela 9 – Resultados de recuperação obtidos com o *Swab Texwipe®* modelo TX761 e 15 minutos de ultrassom

Solvente extrator	Recuperação com <i>Swab Texwipe®</i> modelo TX761 (%)						
	(15 minutos de ultrassom)						
	1	2	3	4	5	DPR	Média
Acetonitrila	<u>88</u>	96	96	98	96	4,10	95
Acetonitrila : Água (1:1)	68	<u>66</u>	79	84	79	10,39	75
Metanol : Água (1:1)	49	59	60	<u>45</u>	55	11,97	54
Etanol	<u>83</u>	89	90	90	84	3,93	87
Etanol : Água (1:1)	<u>72</u>	77	79	74	73	3,89	75
Isopropanol	84	88	92	86	<u>81</u>	4,82	86

Tabela 10 – Resultados de recuperação obtidos com o *Swab Texwipe®* modelo TX761 e 30 minutos de ultrassom

Solvente extrator	Recuperação com <i>Swab Texwipe®</i> modelo TX761 (%)						
	(30 minutos de ultrassom)						
	1	2	3	4	5	DPR	Média
Acetonitrila	95	<u>93</u>	<u>93</u>	94	96	1,39	94
Acetonitrila : Água (1:1)	75	71	77	77	<u>70</u>	4,48	74
Metanol : Água (1:1)	55	51	<u>49</u>	57	50	6,48	53
Etanol	<u>89</u>	99	96	99	91	4,85	95
Etanol : Água (1:1)	51	55	49	61	<u>46</u>	11,18	52
Isopropanol	<u>75</u>	78	85	79	83	5,00	80

De acordo com a atual norma brasileira, pede-se que fatores de recuperação acima de 75% sejam desejavelmente encontrados, e sugere-se levar em consideração o menor resultado encontrado e não a média dessas recuperações. Dessa forma, ao analisar as tabelas acima, pode-se dizer com clareza que no caso do uso do *swab* modelo 36060, apenas o solvente acetonitrila pura conseguiu obter resultados desejáveis, muito mais motivados pela excelente solubilidade do Efavirenz nesse solvente orgânico do que pelas características físicas de sua cabeça (BRASIL 2006).

Com relação ao modelo TX761, foi comprovado que devido ao seu formato em forma de pá, e maior presença de poliéster na cabeça, ocorreu uma acentuada melhora no poder extrativo em todos os solventes testados, dentre os quais a Acetonitrila pura, o Etanol e o Isopropanol obtiveram resultados satisfatórios, ou seja, o menor valor de recuperação foi superior a 75%. Cabe ressaltar ainda que, o menor valor obtido com Isopropanol na situação de 30 minutos de ultrassom, foi de apenas 75%, mas esse valor pode ser interpretado como válido ao vislumbrar o contexto dos resultados obtidos nas demais placas.

O pior resultado encontrado, em ambos os modelos de *swab*, foi com o uso da solução de metanol e água, onde foi demonstrada a baixa solubilidade do Efavirenz na presença de metanol e sua insolubilidade em água (ROWE et al., 1999). Esse efeito pode ser observado na comparação visual entre uma placa que sofreu extração com acetonitrila e outra com solução de metanol e água, figuras 17 e 18.

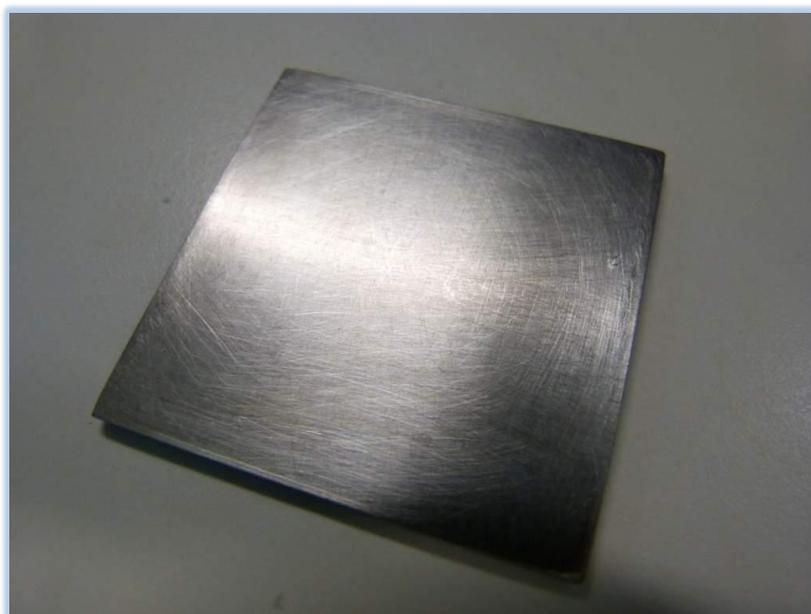


Figura 17 – Placa após realização de *swab* umedecido em acetonitrila

Pode-se notar a clara presença de depósito na figura 18.

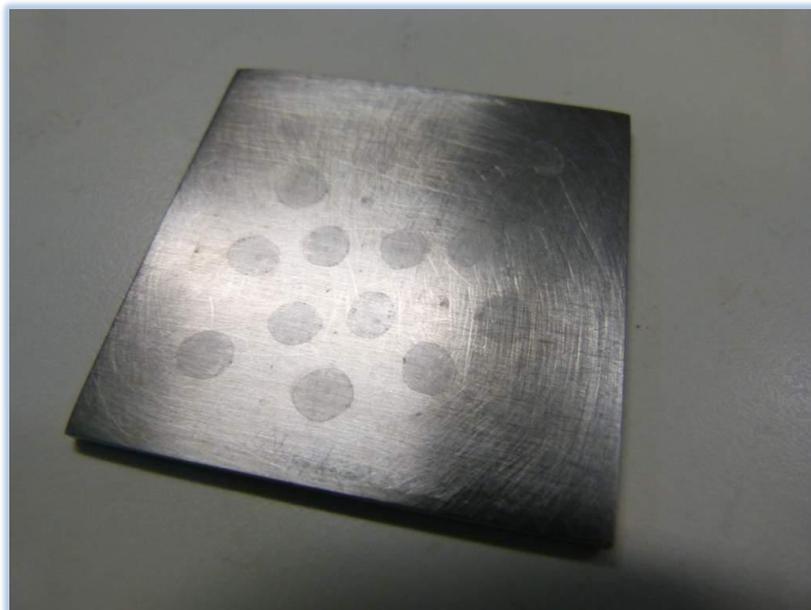


Figura 18 – Placa após realização de *swab* umedecido com metanol : água (1:1)

Quanto ao critério dispersão de resultados, o único ensaio que não obteve valor de DPR inferior a 20%, foi quando utilizado *swab* Coventry™ modelo 36060 com isopropanol em 30 minutos de ultrassom, provavelmente devido a um erro aleatório. Os demais se mostraram satisfatórios, mas nota-se uma clara tendência dispersiva quando do uso do *swab* modelo 36060 e/ou presença de água nas soluções, claramente justificado pela baixa capacidade extratora em ambas as situações.

4.2.3 Variação do tempo de extração

De modo a melhor compreender a correlação dos resultados levando-se em conta a mudança no tempo de ultrassom, são apresentados dois gráficos de coluna que facilitam a interpretação do real efeito que essa alteração gerou.

Os gráficos 1 e 2 colocam frente a frente as mudanças nas taxas de recuperação obtidas quando promovida a alteração nos tempos de ultrassom de 15 para 30 minutos para ambos os modelos de *swab* que fizeram parte dos ensaios. No eixo das ordenadas está representada a taxa de recuperação em porcentagem. No eixo das abscissas está elencado cada ensaio realizado de acordo com o solvente extrator utilizado. Os valores de recuperação estão representados na forma de suas médias.

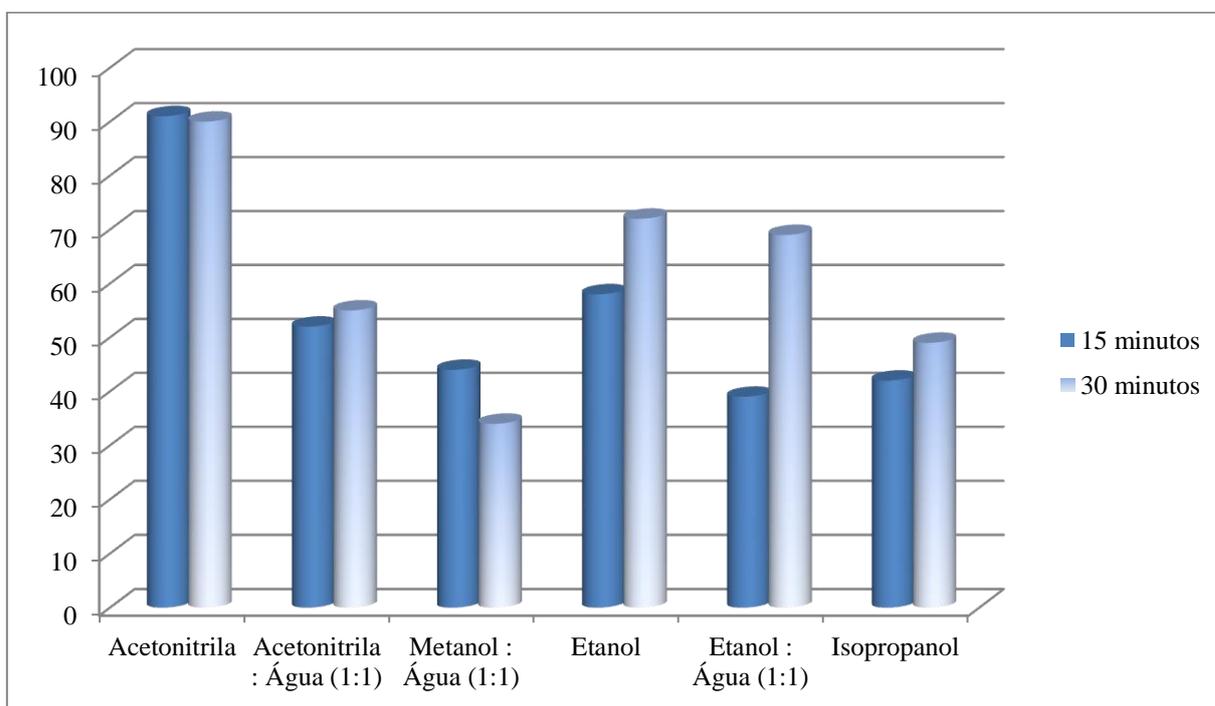


Gráfico 1 – Efeito da alteração do tempo de ultrassom no *swab* Coventry™ modelo 36060

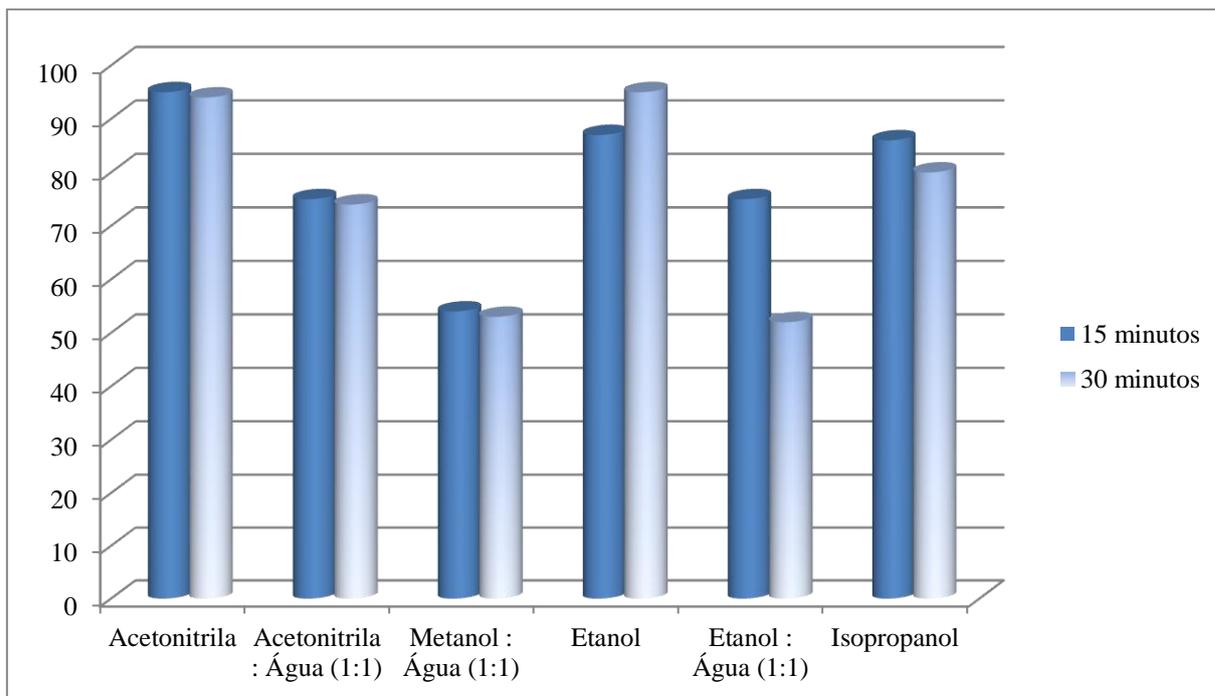


Gráfico 2 – Efeito da alteração do tempo de ultrassom no *swab* Texwipe® modelo TX761

Tendo em vista o modelo de *swab* 36060, até pode ser percebido algum efeito de melhora na taxa de recuperação quando do aumento no tempo de ultrassom nos ensaios envolvendo etanol e isopropanol, porém, não o suficiente para melhorar seu desempenho e conseguir valores de recuperação superiores a 75% (Gráfico 1). Nos demais casos, percebe-se uma estagnação dos resultados e até uma diminuição quando se utilizou a solução de metanol e água, provavelmente causados por um erro aleatório frente à baixa solubilidade do Efavirenz em uma solução de caráter tão polar.

No caso do modelo TX761, também não foi encontrado nenhum ganho quando do aumento no tempo de sonicação, ao contrário, o efeito de diminuição da taxa de recuperação, descrito anteriormente, ocorreu com maior frequência em quase todos os ensaios.

Esse efeito de diminuição da concentração de Efavirenz nas amostras após 30 minutos de ultrassom pode ter sido ocasionado por uma possível degradação gerada pela sonicação do aparelho de ultrassom, ou até mesmo pelos erros analíticos presentes em uma metodologia de análise que possui, em sua constituição, uma etapa em que a subjetividade do trabalho do analista se faz aparente, que é o momento em que se procede a passagem dos *swabs* nas placas.

4.2.4 Comparação de desempenho entre os modelos de *swab*

Foram construídos gráficos de modo a comparar diretamente, quanto ao desempenho, os dois tipos de *swab* utilizados nos ensaios de recuperação. No eixo das ordenadas está representada a taxa de recuperação em porcentagem. No eixo das abscissas está elencado cada ensaio realizado de acordo com o solvente extrator utilizado.

Em ambos os gráficos, 3 e 4, apresentam-se as médias de recuperação obtidas quando do uso de cada modelo de *swab* associados aos respectivos solventes extratores, apenas diferindo dentre eles o tempo de ultrassom.

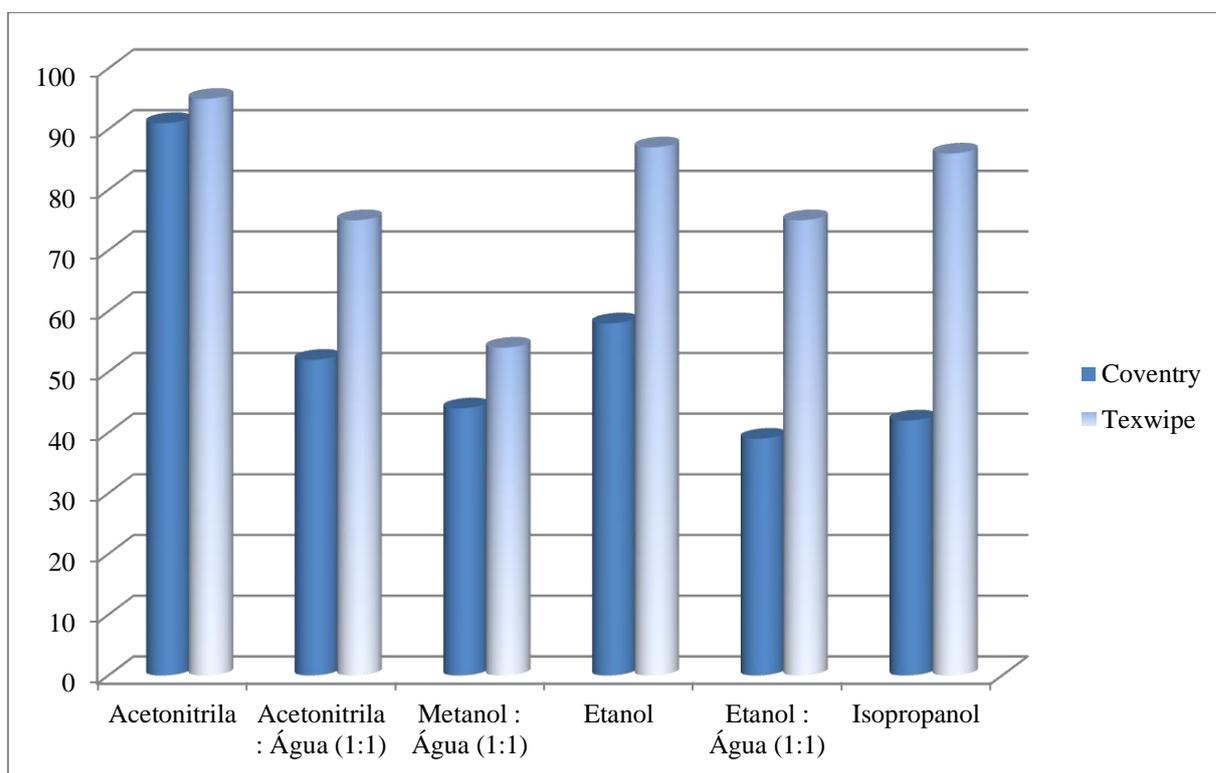


Gráfico 3 – Comparação entre modelos de *swab* com 15 minutos de sonicação

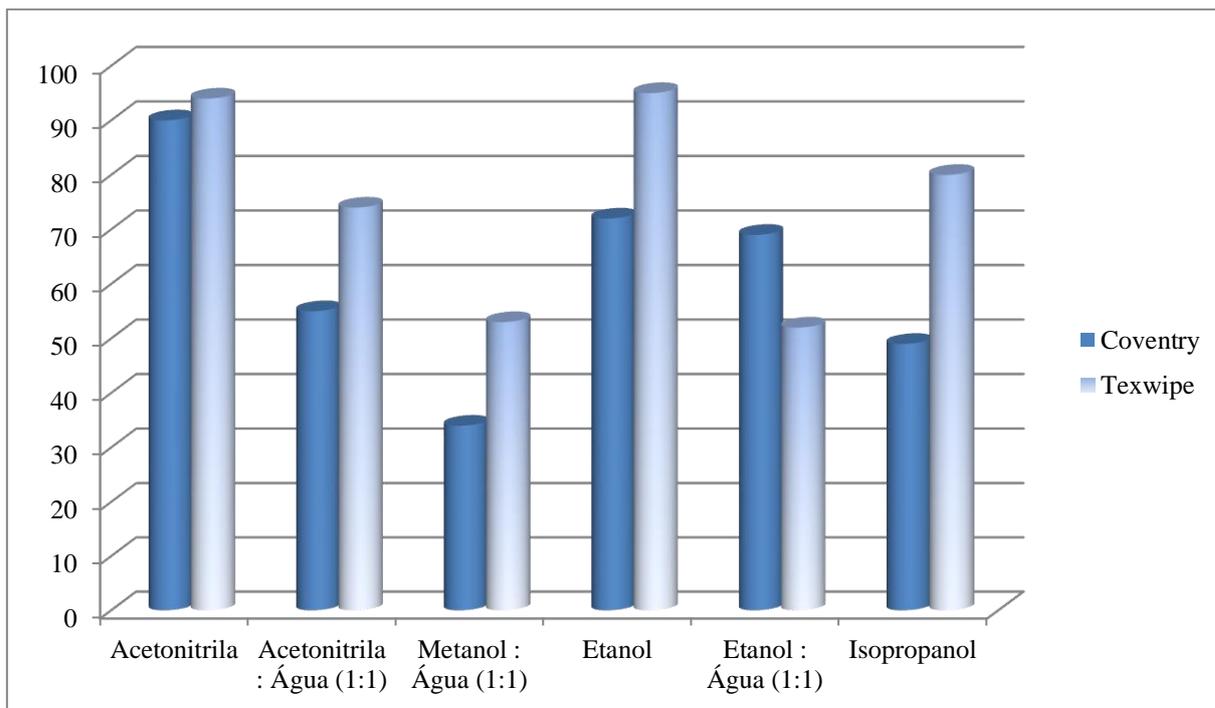


Gráfico 4 – Comparação entre modelos de *swab* com 30 minutos de sonicação

Corroborando os dados apresentados no item 4.2.1 e as características físicas/estruturais visualizadas nas figuras 15 e 16, percebe-se, claramente, a superioridade no desempenho do modelo da Texwipe® com qualquer solvente extrator utilizado, não importando o tempo de sonicação utilizado. Uma única exceção, de modo a comprovar a regra, ocorreu quando do uso da solução de etanol e água, e mesmo assim, apenas no caso de 30 minutos de ultrassom. Esse resultado fora do esperado deverá ser melhor encarado como um erro analítico, de acordo com a subjetividade do método já ressaltada no item anterior.

4.2.5 Solventes extratores

A análise da solubilidade do Efavirenz frente aos diferentes solventes e soluções extratoras utilizadas pode ser facilmente realizada em qualquer gráfico ou tabela apresentada no item 4 do presente trabalho, mas de uma forma mais didática, tais características são melhor visualizadas no gráfico 3.

No referido gráfico, nota-se claramente a diferença, já citada, proporcionada quando do uso de diferentes solventes no processo de recuperação do Efavirenz. Fica evidente perceber que quanto mais polar o meio, caso do metanol quando da presença de água, maior a dificuldade de solubilização do Efavirenz, dificultando o trabalho mecânico proporcionado por ambos os modelos de *swab*. No caso dos solventes livres de água e com menor característica polar (polaridades intermediárias), situação do isopropanol, acetonitrila e etanol, evidenciam-se os melhores resultados de recuperação proporcionados pela associação sinérgica força mecânica e solubilidade. (MERCK RESEARCH LABORATORIES, 2001; ROWE et al., 1999; WHO, 2011; BRASIL, 2010).

4.2.6 Contaminante

Ao analisar os cromatogramas obtidos em todos os experimentos realizados, pode-se observar a presença de um pico que elui no tempo de retenção de aproximadamente 6,3 minutos, mas que não compromete a análise por não coeluir com o analito Efavirenz (4,9 minutos de tempo de retenção).

Mirza et al. (1998); e Coutinho et al. (2009), descrevem que esse contaminante pode ser um produto de degradação do Efavirenz, o que levaria à detecção de quantidades menores do que as realmente existentes nas placas.

No entanto, no trabalho de Gadkari et al. (2010) pode-se perceber que a molécula de Efavirenz possui boa estabilidade frente a inúmeros agentes de degradação, apresentando acentuada deterioração apenas quando em soluções básicas em valores de pH acima de 11. A degradação do Efavirenz em pH alcalino, devido ao fenômeno da hidrólise básica, também foi motivo de estudo de Maurin et al. (2002), e sua estabilidade quando em pH neutro e ácido também foi evidente.

Levando-se em conta o fato de que a limpeza dos equipamentos contaminados com Efavirenz é realizada com água quente (60 °C) e uma solução composta por água e etanol, de comprovado pH levemente ácido, não foi encontrado motivo para crer que exista alguma degradação do analito durante essa etapa.

Porém, essa possibilidade foi descartada ao debruçar sobre os cromatogramas das injeções do padrão de Efavirenz, do diluente, do branco e de uma amostra (figuras 19, 20, 21 e 22). Pode-se, desta forma, concluir com clareza que este contaminante é derivado do *swab*,

visto que o pico do interferente também foi observado na solução branco, a qual não entra em contato com o analito em questão.

Esse efeito foi percebido quando do uso dos dois modelos de *swab*, e sempre foi presença constante em outras validações, para determinação de resíduos, realizadas em Farmanguinhos. Esse contaminante também já foi mencionado por outras empresas farmacêuticas, podendo estar relacionado aos corantes ou a algum outro adjuvante empregado na confecção dos cabos de polipropileno e/ou das cabeças de poliéster.

Abaixo, de modo a exemplificar o fato, estão dispostos os cromatogramas mencionados e relativos às amostras que foram extraídas com etanol e *swab* TX761. Foram escolhidas as amostras com 30 minutos de ultrassom para esta demonstração devido ao maior tempo de contato entre solvente e *swab*.

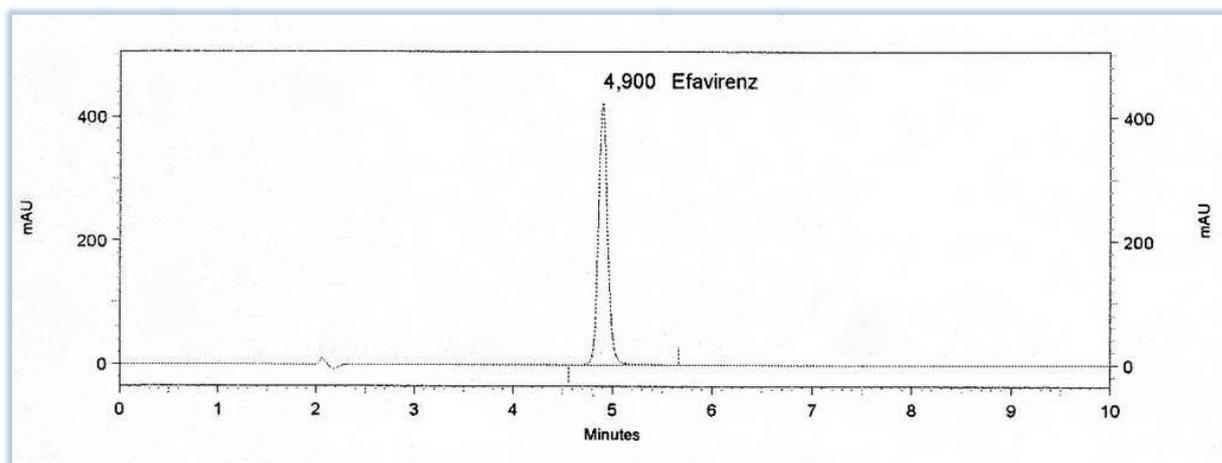


Figura 19 – Cromatograma da solução padrão

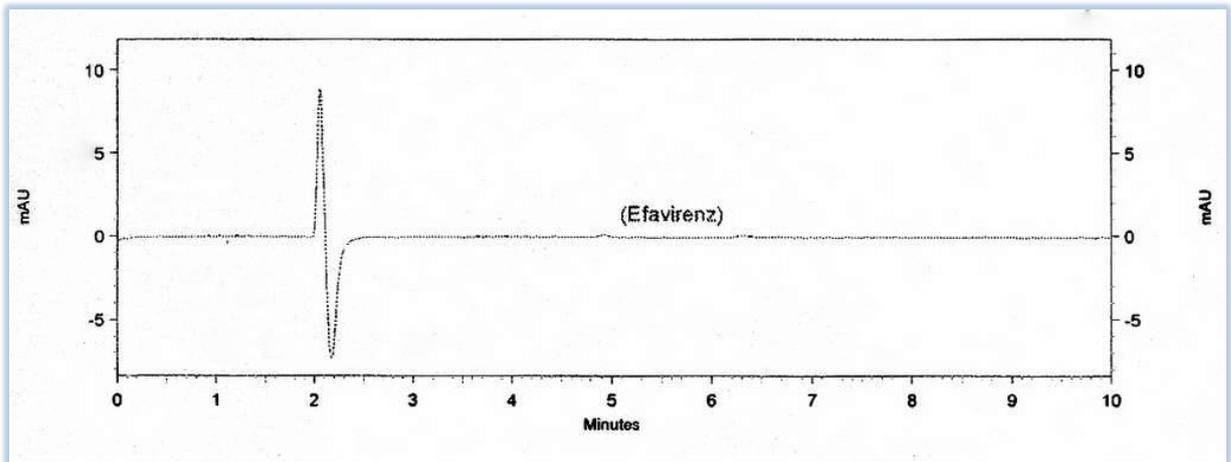


Figura 20 – Cromatograma da solução diluente

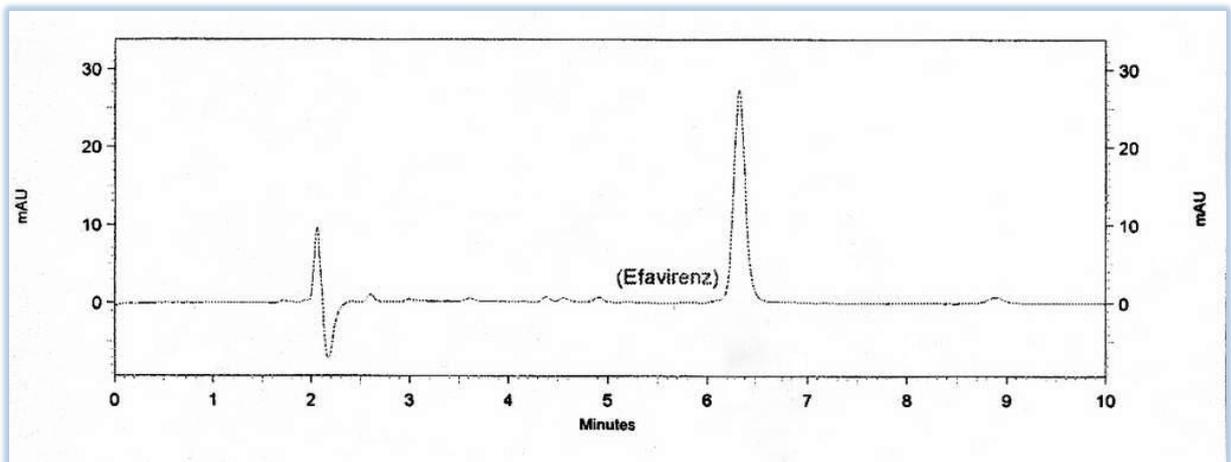


Figura 21 – Cromatograma da solução branco / Swab Texwipe® TX761

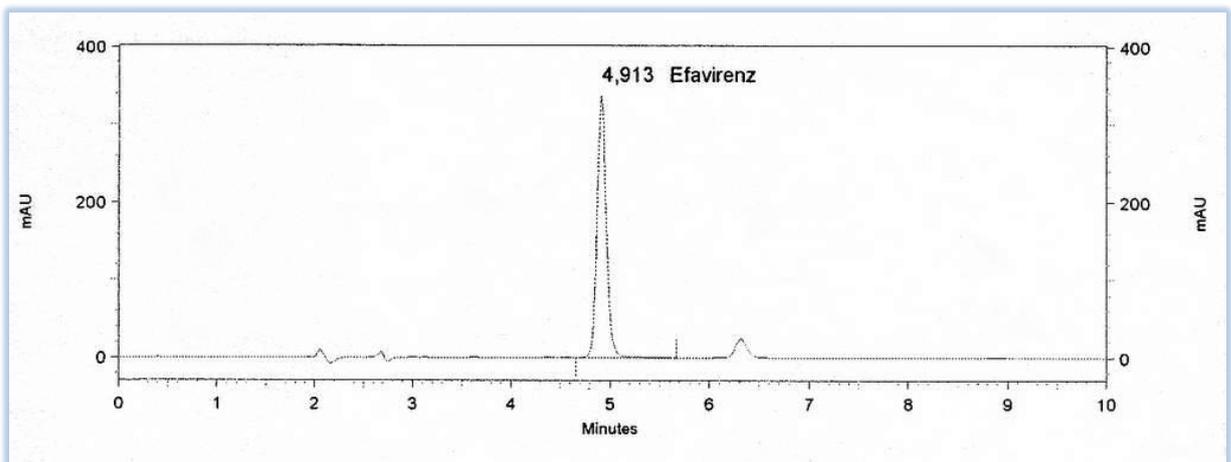


Figura 22 – Cromatograma da solução amostra / Swab Texwipe® TX761

Quando do início dos experimentos, esperava-se que este contaminante pudesse ser evitado no momento em que fosse utilizada a água nas soluções que iriam embeber os *swabs* (antes dos esfregaços), já que a mesma poderia diminuir o efeito extrativo por parte do solvente orgânico. Porém, o mesmo efeito foi encontrado quando utilizada a solução de etanol em água para remover o resíduo da placa (vide figura 23), provavelmente pelo fato da extração do contaminante acontecer, principalmente, no momento em que o *swab* é disposto no *vial* e é submetido ao ultrassom. Nesse momento o *swab* entra em contato íntimo e prolongado com a solução diluente, que é formada por acetonitrila e água.

Novos esforços não foram dispendidos para tentar eliminar a presença do contaminante, visto que o mesmo, como ressaltado anteriormente, não coeluiu com o Efavirenz.

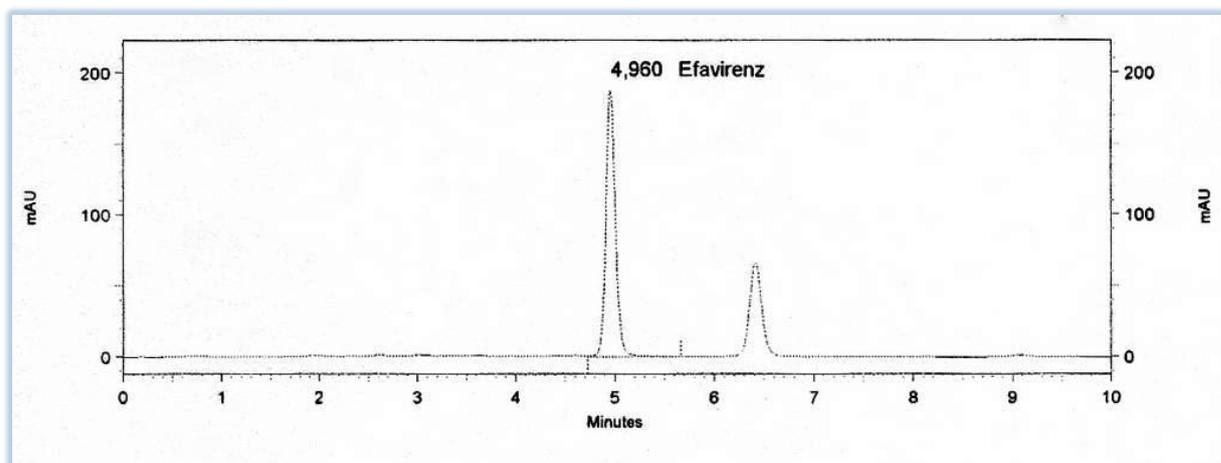


Figura 23 – Cromatograma da solução amostra / *Swab* Texwipe® TX761 com etanol e água (1:1)

4.3 Validação

Do ponto de vista didático, foram reservados neste subitem todos os parâmetros e aspectos envolvidos na validação da metodologia analítica desenvolvida anteriormente, mesmo sabendo-se que o próprio processo de desenvolvimento, por si só, já faz parte da validação como um todo.

4.3.1 LD e LQ

Em um primeiro momento, e antes do início da realização de qualquer um dos testes de recuperação apresentados na tabela 2 e discutidos no item 4.2, foi necessário demonstrar quais eram os limites de detecção e quantificação da metodologia em foco frente à sensibilidade do detector do equipamento de CLAE utilizado. Para isso foram elaboradas três curvas de calibração de baixa concentração, bem como a construção dos seus respectivos gráficos das concentrações (x) *versus* áreas dos picos cromatográficos (y).

Cada curva foi construída abrangendo um intervalo (0,3 a 1,5 µg/mL) que foi baseado em uma estimativa preliminar dos próprios valores de LD e LQ, levando-se em conta a relação sinal-ruído da linha de base (BRASIL, 2003).

A determinação das equações das retas e as regressões lineares foram procedidas de acordo com os preceitos descritos anteriormente pelo Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA no item 1.3.1 da presente dissertação (BRASIL, 2003).

Todos os resultados estão demonstrados nos gráficos 5, 6 e 7, e foram obtidos através do uso da ferramenta de análise de dados do aplicativo Microsoft Excel 2010.

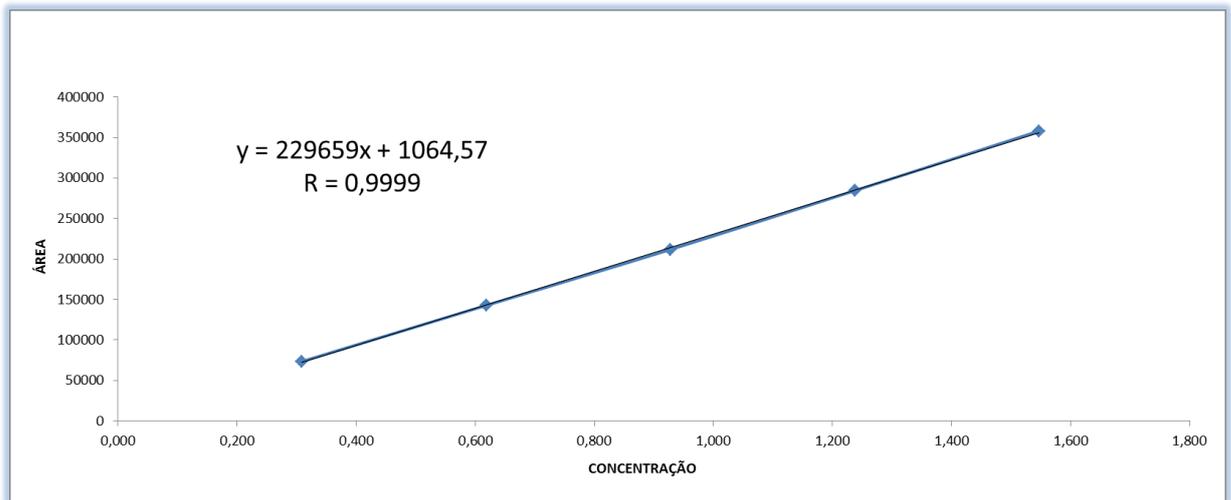


Gráfico 5 – Primeira curva de calibração para determinação do LD e do LQ

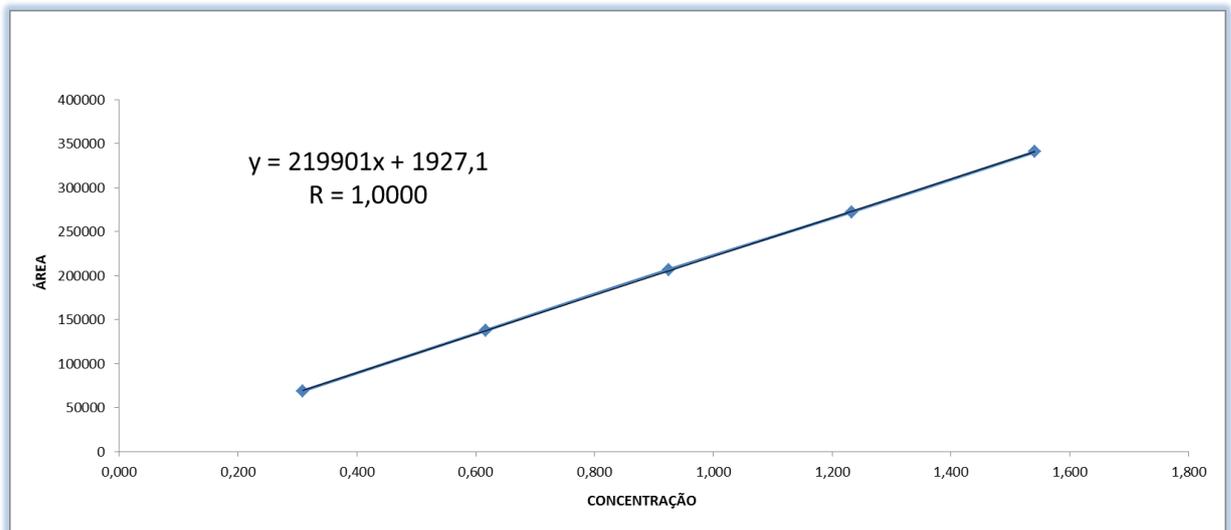


Gráfico 6 – Segunda curva de calibração para determinação do LD e do LQ

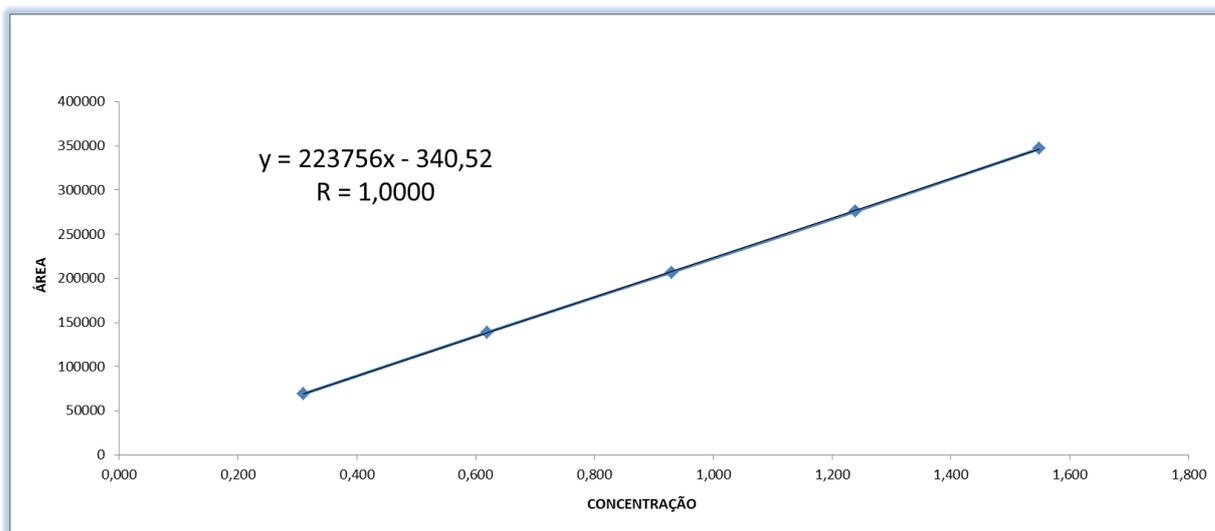


Gráfico 7 – Terceira curva de calibração para determinação do LD e do LQ

Os valores do intercepto, inclinação e coeficiente de correlação de cada uma das curvas estão dispostos na tabela 11, onde se confirma que cada uma delas apresentou linearidade satisfatória. Os resultados satisfatórios de linearidade irão permitir que seus respectivos valores de regressão sejam utilizados nos cálculos para determinação do LD e do LQ (BRASIL, 2003).

Todos os dados da estatística de regressão de cada uma das curvas estão presentes no apêndice.

Tabela 11 – Valores para verificação da linearidade

Curvas de calibração	Intercepto	Inclinação	Coefficiente de correlação (R)
Curva 1	1064,57	229659,16	0,9999
Curva 2	1927,12	219901,88	1,0000
Curva 3	-340,52	223756,53	1,0000

Frente aos resultados, procedeu-se então o efetivo cálculo dos valores de LD e LQ através do uso das fórmulas descritas no item 3.3.2.

Os resultados obtidos estão presentes na tabela 12, onde o Dpa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y, e o IC é a inclinação da curva de calibração.

Tabela 12 – Resultados dos limites (LD e LQ)

Curvas de calibração	DPa	IC	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Curva 1	2110,95	229659,16	0,03	0,09
Curva 2	1077,95	219901,88	0,01	0,05
Curva 3	835,88	223756,53	0,01	0,04
		Médias	0,02	0,06

O valor médio de LQ encontrado foi considerado satisfatório, visto que é inferior a concentração da amostra no limite de aceitação ($0,06 < 43,45 \mu\text{g/mL}$), determinando que a presente metodologia possui sensibilidade suficiente para realizar a análise de uma amostra cuja concentração esteja no limite de aceitação.

4.3.2 Linearidade no intervalo de interesse

Após o cálculo do LQ, foi procedida à verificação da linearidade no intervalo de interesse do método, onde foram desenvolvidas três novas curvas de calibração que contemplassem o limite de quantificação ($0,06 \mu\text{g/mL}$) e o limite de aceitação ($43,45 \mu\text{g/mL}$).

Cada curva foi construída por meio de diluições sucessivas, onde foram escolhidos os seguintes pontos equidistantes: 0,05; 5,00; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00 e 50,00 µg/mL.

Os gráficos das concentrações (x) *versus* áreas dos picos cromatográficos (y) de cada uma das curvas estão demonstrados abaixo, bem como seus respectivos coeficientes de correlação (R).

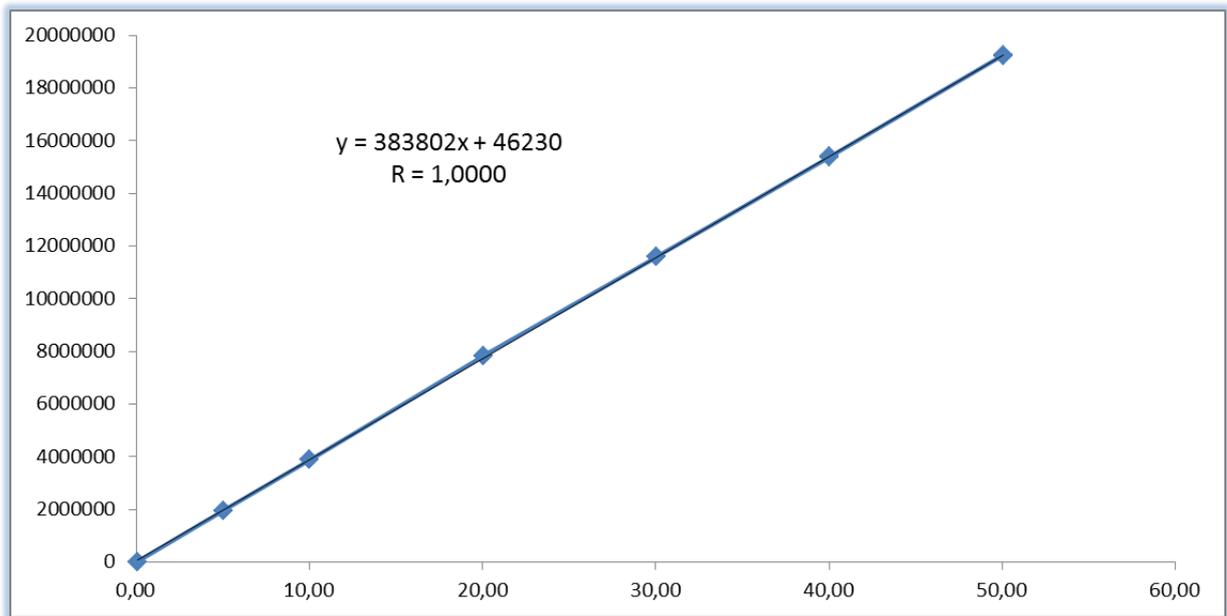


Gráfico 8 – Primeira curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo

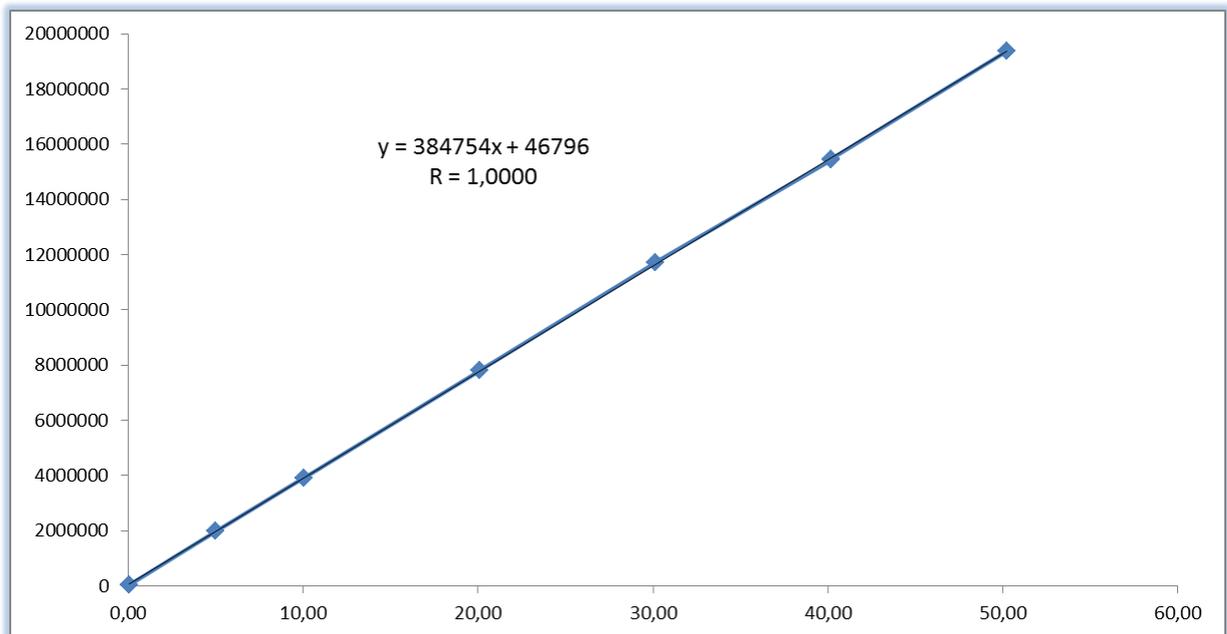


Gráfico 9 – Segunda curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo

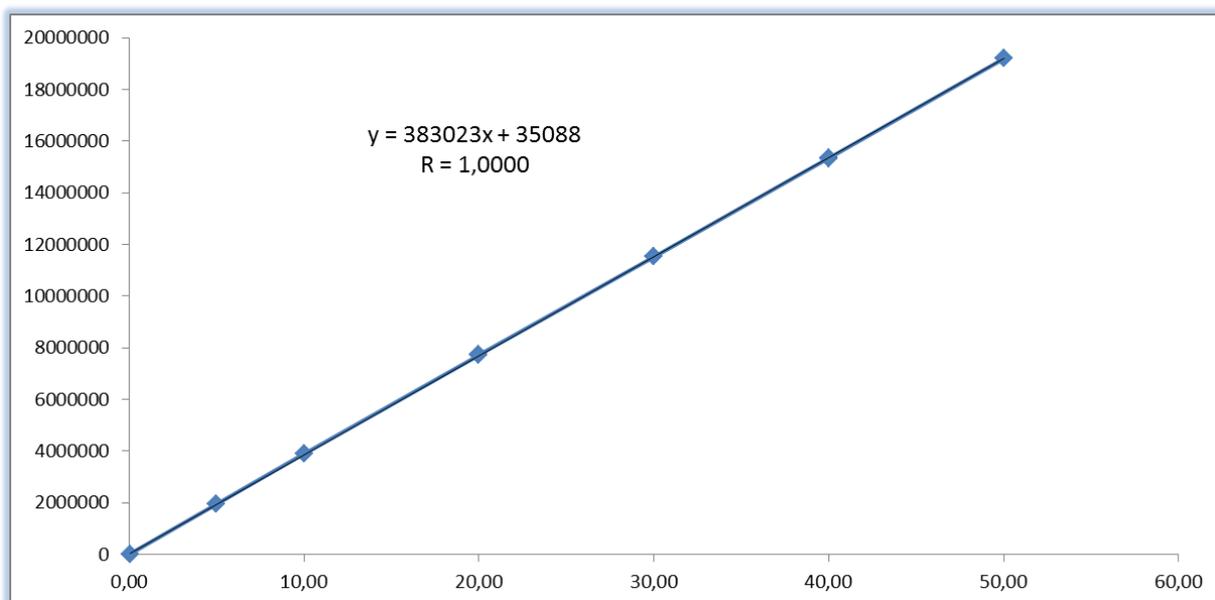


Gráfico 10 – Terceira curva de calibração para verificação da linearidade no intervalo

De acordo com os resultados dos coeficientes de correlação de cada uma das curvas, infere-se que o presente método apresenta linearidade satisfatória no intervalo de interesse.

Todos os dados estatísticos de regressão estão presentes no apêndice.

4.3.3 Exatidão e Precisão

Após a obtenção e aprovação dos limites de detecção e quantificação, a definição do etanol como solvente extrator, do tempo de ultrassom de 15 minutos, e do *swab* preferencial como sendo o modelo TX761, Alpha® *Swab* da empresa Texwipe®, foram abraçados outros aspectos referentes à validação desse procedimento analítico.

Durante a etapa de desenvolvimento da metodologia analítica, item 4.2, foram obtidos resultados que respondem pela capacidade de recuperação do método (exatidão), bem como indicam que o mesmo apresenta uma precisão aceitável no momento em que o DPR entre os resultados encontrados nas cinco placas utilizadas no experimento foi inferior ao limite de aceitação (20%). Os resultados referentes ao uso do *swab* modelo TX761 juntamente com o solvente extrator etanol e utilizando 15 minutos de ultrassom, estão dispostos na tabela 9.

De modo complementar, e com o propósito de imprimir uma maior segurança ao processo de validação, idealizou-se a necessidade de apresentar resultados que possam indicar que o parâmetro Precisão Intermediária (precisão inter-corridas) também está englobado no presente estudo, visto que diferentes analistas serão responsáveis por executar a presente metodologia no dia a dia. Essa abordagem ainda não foi demonstrada dentro da literatura científica a que se teve acesso no momento da confecção da presente dissertação.

Foi então realizado o mesmo teste de recuperação descrito anteriormente, com cinco placas, conforme apresentado no item 3.2.1.5, porém, o mesmo ensaio foi repetido por um analista diferente no dia subsequente. Os resultados dos dois ensaios envolvendo um analista A e um analista B estão presentes na tabela 13.

Tabela 13 – Precisão intermediária

Recuperação com <i>Swab Texwipe</i>® modelo TX761 (%) (etanol e 15 minutos de ultrassom)		
Amostras	Analista A	Analista B
Placa 1	93	<u>90</u>
Placa 2	93	91
Placa 3	92	<u>90</u>
Placa 4	<u>89</u>	97
Placa 5	93	93
Médias	92	92
DP	1,7	2,9
DPR	1,88	3,20
Média Total	92	
DP Total	2,3	
DPR Total	2,48	

De acordo com o excelente valor de DPR encontrado (2,48%) quando se utiliza todos os valores obtidos na recuperação das 10 placas (analistas A e B), considera-se que o método apresenta uma precisão satisfatória mesmo quando o ensaio é realizado por outro analista em um dia diferente. Cabe ressaltar que para obter resultados consistentes, ambos os analistas deverão ser treinados quanto ao procedimento operacional da metodologia escolhida.

Em um último momento, após serem obtidos valores de LQ, linearidade, exatidão e precisão satisfatória, foi posto à luz de uma análise mais criteriosa sob o fato de ter sido escolhido como solvente extrator uma substância (etanol) que não fazia parte da metodologia para determinação de Efavirenz no produto Efavirenz 600 mg. Na verdade, a metodologia original somente faz uso, como solventes, de acetonitrila e água.

Apesar do fato de que a quantidade de etanol utilizado ser quase desprezível, visto que o mesmo irá apenas embeber o *swab* para auxiliá-lo na remoção do Efavirenz, e mesmo assim, ainda sofrerá do efeito de sua própria volatilização, avaliou-se a possibilidade de alguma interferência significativa quando esse solvente entrar em contato com os 4 mL da solução diluente (acetonitrila e água), vide item 3.2.1.5.

De forma a promover um ensaio que conseguisse demonstrar a interferência do etanol frente às amostras coletadas, foram reservados três *vials* de 4 mL limpos e vazios. Em cada um deles foi acrescentado 4 mL de uma mesma solução padrão de Efavirenz. O primeiro *vial* foi mantido apenas com a solução padrão para referência; no segundo foi acrescentada a cabeça cortada de um *swab* modelo TX761, sem qualquer tipo de solvente ou amostra; no terceiro *vial* foi depositado o mesmo modelo de *swab*, porém, embebido em etanol de modo a simular um teste com o referido solvente.

Cada um dos três *vials* foi fechado e levado ao ultrassom durante 15 minutos. Procedeu-se então a análise dos mesmos de acordo com a presente metodologia descrita no item 3.2.1.5. As concentrações de Efavirenz bem como seu tempo de retenção estão descritos na tabela 14.

Tabela 14 – Interferência do etanol na metodologia em estudo

Vials	Amostras	Concentração de Efavirenz (µg/mL)	Tempo de retenção do Efavirenz (minutos)
1	Solução Padrão	49,95	6,65
2	Solução Padrão + swab seco	48,09	6,64
3	Solução Padrão + swab com etanol	47,68	6,63

De imediato percebe-se uma queda na concentração de Efavirenz (3,72%) quando da presença do *swab*, mesmo sem a presença de qualquer solvente. Esse efeito provavelmente ocorre pelo fato de uma parte do Efavirenz ficar aderido na trama de poliéster da cabeça.

Frente ao efeito descrito anteriormente, achou-se melhor proceder a comparação dos resultados obtidos nos *vials* 2 e 3, os quais realmente irão demonstrar qual será o efeito da introdução do solvente etanol no sistema. Nessa situação, a concentração de Efavirenz sofreu uma pequena variação (0,85%) entre a amostra 2 e a 3, variação essa que ainda pode ser atribuída aos erros experimentais presentes no método, como por exemplo o fato de cada unidade de *swab* possuir pequenas variações quanto a suas dimensões e peso.

Outro parâmetro de extrema importância diz respeito ao tempo de retenção encontrado, visto que poderia existir uma pequena alteração de polaridade na solução diluente proporcionada pelo etanol, porém, tal efeito não foi percebido, visto que praticamente não ocorreu alteração no aparecimento do pico de interesse.

Levando-se em conta o exposto acima, não foi encontrada qualquer alteração que condene o uso do etanol como solvente extrator.

4.4 Considerações finais

Baseado nos dados do presente trabalho optou-se pela escolha do *swab* modelo TX761 da Texwipe® devido ao seu bom desempenho nos ensaios realizados, o que não quer dizer que o outro modelo testado deva ser considerado inferior ao de escolha, apenas não se mostrou como a melhor opção dentro das condições analíticas presentes.

Como não foi observado melhora da taxa de recuperação com o aumento do tempo de ultrassom, e devido a agilidade na realização do ensaio, optou-se por manter os 15 minutos planejados inicialmente. Além de retirar qualquer possibilidade de degradação catalisada pelo efeito da sonicação.

Quanto ao solvente que irá umedecer os *swabs* no momento da coleta de amostras nos equipamentos de Farmanguinhos, deverá ser feita uma escolha entre a acetonitrila, claramente com maior poder de solubilização, o etanol e o isopropanol. Apesar de a acetonitrila ser o solvente com maior capacidade solubilizante, e ser a escolha natural, já que faz parte da composição da solução diluente e da fase móvel, optou-se pelo etanol. Essa escolha foi baseada nos bons resultados apresentados, e principalmente, por ser considerada uma substância de baixa toxicidade, diferentemente da acetonitrila que é classificada como nociva e irritante ao ser humano de acordo com sua Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) apresentada no Anexo B. Além do mais, o atual procedimento de limpeza dos equipamentos faz uso do mesmo solvente, o que gera uma maior compatibilidade analítica.

Em um último momento, o aspecto tóxico do solvente a ser utilizado foi de especial relevância dentro do presente trabalho, devido às características únicas desse tipo de metodologia analítica. Diferentemente das demais metodologias utilizadas por um Controle da Qualidade, onde elas se iniciam e terminam dentro de um ambiente laboratorial, com presença de inúmeros equipamentos e materiais de segurança, a metodologia para pesquisa de contaminantes possui uma etapa fora desse espaço, quando aumenta enormemente o risco de algum acidente laboral, mesmo com o uso de equipamentos de proteção individual por parte do operador.

5 CONCLUSÕES

A partir da proposição do trabalho, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é possível concluir que:

1 – A metodologia analítica para pesquisa de resíduos de Efavirenz na área produtiva de Farmanguinhos que apresentou um melhor desempenho, bem como fez uso de solventes orgânicos com baixa toxicidade, inclui o uso do *swab* Texwipe®, Alpha® *Swab*, modelo TX761, bem como a utilização do etanol como solvente extrator. O tempo de ultrassom utilizado ficou determinado como sendo de 15 minutos.

2 – Ambos os fatores, modelo de *swab* e tipo de solvente extrator, são parâmetros fundamentais que devem ser avaliados no momento em que se desenvolve uma metodologia para pesquisa de algum resíduo que seja de difícil remoção.

3 – Apesar do fato de que o aumento do tempo de ultrassom de 15 para 30 minutos não tenha obtido resultados favoráveis, é interessante que este fator faça parte de futuros ensaios envolvendo a recuperação de resíduos.

4 – No caso de se desenvolver futuramente outras metodologias analíticas que também façam uso de solventes externos às metodologias analíticas originais, recomenda-se que sejam incluídos em seus processos de validação, testes que comprovem que os mesmos não causam algum tipo de interferência nos resultados.

REFERÊNCIAS

ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS COMMITTEE (APIC) (Belgium). **Cleaning Validation in Active pharmaceutical Ingredient manufacturing plants.** Brussels, 1999. 25 p.

ADKINS, J.C., and NOBLE, S. Efavirenz. **Drugs**, 1998, 56:1055-1064.

ALENCAR, João Rui Barbosa de et al. Validação de limpeza de equipamentos de formas farmacêuticas sólidas: estudo de caso do mebendazol comprimidos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Recife, v. 2, n. 87, p.35-41, 2006.

ALVEZ, Lariza Darlene Santos; ROLIM, Larissa Araújo; FONTES, Danilo Augusto Ferreira; ROLIM-NETO, Pedro José. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis; **Química Nova**, Brasil, v. 33, n. 9, p.1967-1972, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guias Relacionados à Garantia de Qualidade.** Brasília, 2006. 61 p.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 4. ed. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010. 904p., 2v/il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE Nº899 de 29.05.2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº210, de 04.08.2003, Regulamento técnico de boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº17, de 16.04.2010, Regulamento técnico de boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 19 abr. 2010.

CHAVES, Gabriela Costa; VIEIRA, Marcela Fogaça; REIS, Renata. Acesso a medicamentos e propriedade intelectual no Brasil: reflexões e estratégias da sociedade civil. **Sur. Revista Internacional de Direitos Humanos**, São Paulo, v. 5, n. 8, jun. 2008. Semestral.

CONTE, Antônio Lázaro; DURSKI, Gislene Regina. Qualidade: Economia Empresarial. In: FAE BUSINESS SCHOOL (Brasil). **Coleção gestão empresarial: Economia empresarial**. Curitiba: Gazeta Do Povo, 2002. Cap. 5, p. 51-60.

COUTINHO, Roberto C. et al. Determinação simultânea de resíduos de sulfametoxazol e trimetoprima em superfícies de equipamentos de produção. **Química Nova**, Anápolis, v. 32, n. 8, p.2214-2217, 30 set. 2009.

DEMING, W. Edwards. **Qualidade: A revolução da administração**. Rio de Janeiro: Marques Saraiva, 1990. 367 p.

ELIAS, Fernando Lopes Ferraz. PATENTE DE MEDICAMENTO: A questão do licenciamento compulsório do Efavirenz. **Cedin: Revista Eletrônica de Direito Internacional**, SI, v. 4, p.336-361, 2009. Semestral.

FEKETE, Szabolcs; FEKETE, Jenó; GANZLER, Katalin. Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation area. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Budapeste, n. 49, p.833-838, 27 dez. 2008.

FORSYTH, Richard J. et al. Correlation of Visible-Residue Limits with Swab Results for Cleaning Validation. **Pharmaceutical Technology**, United States of America. 02 nov. 2006. Mensal. Disponível em: <<http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=384574>>. Acesso em: 15 jun. 2011.

GADKARI, Tushar et al. Validated stability indicating LC-PDA-MS method to investigate pH rate profile and degradation kinetics of efavirenz and identification of hydrolysis product by LCMS. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Maharashtra, v. 2, n. 1, p.169-176, 2010.

GOMES, Maria Luiza Pinheiro Costa; SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho de. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilínicos. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p.972-977, 24 mar. 2010.

HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E.; GILMAN, Alfred Goodman. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill, 2005. Cap. 51, p. 1011-1033.

HEALTH CANADA. **Cleaning Validation Guidelines: Guide-0028**, Canada, 2008, <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/compli-conform/gmp-bpf/validation/gui-0028_cleaning-nettoyage_ltr-doc-eng.php>. Acesso em: 03 mai. 2011.

HEALTH SCIENCES AUTHORITY. **Regulatory Guidance: Cleaning Validation**. Singapore, 2008. 11 p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH); Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), nov. 2005. Disponível em:<<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>>. Acesso em: 05 jan. 2011.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION (ISO); Quality systems - Fundamentals and vocabulary, ISO 9000:2005, 2005.

JURAN, J. M.. **A qualidade desde o projeto**. São Paulo: Thomson, 1992.

MATTHEWS, C.z. et al. Determination of efavirenz, a selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using HPLC with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Usa, n. 28, p.925-934, 12 nov. 2001.

MAURIN, Michael B. et al. Kinetics and mechanism of hydrolysis of efavirenz. **Pharmaceutical Research**, Wilmington, v. 19, n. 4, p.517-521, abr. 2002.

MERCK RESEARCH LABORATORIES (United States Of America) (Ed.). **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. 13. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2001. 1818 p.

MIRZA, Tahseen et al. Cleaning level acceptance criteria and a high pressure liquid chromatography procedure for the assay of Meclizine Hydrochloride residue in swabs collected from pharmaceutical manufacturing equipment surfaces. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, Rockville, n. 19, p.747-756, 30 out. 2008.

RAMACHANDRAN, Geetha et al. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma. **Journal Of Chromatography B**, India, n. 835, p.131-135, 29 mar. 2006.

RAO, B. Udaykumar; NIKALJE, Anna Pratima. Stability- indicating HPLC method for the determination of efavirenz in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **African Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, India, v. 3, n. 12, p.643-650, dez. 2009.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p.771-780, 17 jun. 2004.

RODRIGUES, William C. V.; SOLER, Orenzio. Licença compulsória do efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Rev Panam Salud Publica**, SI, v. 26, n. 6, p.553-559, 2009.

ROWE, S. M.; FONTALBER, L. G.; RABEL, S. R.; and MAURIN, M. B.. Physical Chemical Properties of Efavirenz. AAPS Annual Meeting and Exposition, **AAPS PharmSci Supplement**, 1999.

TASHIMA, KT., CALIENDO, A.M., AHMAD, M., GORMLEY, J.M., FISKE, W.D., BRENNAN, J.M., and FLANIGAN, T.P. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) suppression and efavirenz drug concentrations in HIV-1-infected patients receiving combination therapy. **J. Infect. Dis.**, 1999, 180:862-864.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); Guide to inspections of cleaning processes, USA, 1993, <www.fda.gov/ICECI/Inspections/InpectionGuides/ucm074922.htm>. Acesso em: 01 jun. 2011.

VELDKAMP, Agnes I. et al. Quantitative determination of efavirenz (DMP 266), a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal Of Chromatography B**, Amsterdam, n. 734, p.55-61, 1999.

VIANA, Osnir de Sá, et. al; Development and validation of a HPLC analytical assay method for efavirenz tablets: a medicine for HIV infections; **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 47, n. 1, jan./mar., 2011.

VILLANI, P., REGAZZI, M.B., CASTELLI, F., VIALE, P., TORTI, C., SEMINARI, E., and MASERATI, R. Pharmacokinetics of efavirenz (EFV) alone and in combination therapy with nelfinavir (NFV) in HIV-1 infected patients. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 1999, 48:712-715.

WINSLOW, D.L., GARBER, S., REID, C., SCARNATI, H., BAKER, D., RAYNER, M.M., and ANTON, E.D., Selection conditions affect the evolution of specific mutations in the reverse transcriptase gene associated with resistance to DMP 266. **AIDS**, 1996, 10:31205-1209.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The International Pharmacopoeia**: Fourth Edition. Disponível em:
<http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/mono_dev/en/index.html>.
Acesso em: 29 ago. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS; Thirty-second report, **WHO Technical Report Series**, No.823, Geneva, 1992.

YOUNG, S.D., BRITCHER, S.F., TRAN, L.O., PAYNE, L.S., LUMMA, W.C., LYLE, T.A., HUFF, J.R., ANDERSON, P.S., OLSEN, D.B., CARROLL, S.S., et al. L-743,726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 1995, 39:2602-2605.

APÊNDICE A – Resultados de recuperação

Os resultados de extração obtidos com os *swabs* modelos 36060 da fabricante Coventry™, e modelo TX761 da empresa Texwipe® estão dispostos abaixo. As tabelas foram montadas de modo a correlacionar o modelo de *swab* escolhido, com o solvente extrator e o tempo de ultrassom, utilizado para facilitar a transferência do Efavirenz presente no *swab* para o meio diluente constante nos *vials*.

Em cada uma das tabelas pode-se observar qual foi a quantidade, em microgramas (μg) por mililitro (mL), de Efavirenz encontrada em cada uma das injeções realizadas no equipamento de CLAE. Estão também explicitadas a média das duas injeções e qual foi a taxa de recuperação com relação à quantidade de Efavirenz que contaminou cada uma das placas.

Todos os resultados de recuperação encontrados apresentam sua respectiva média, bem como seus desvios padrões (DP) e desvios padrões relativos (DPR).

Tabela 1 – *Swab* Coventry™ modelo 36060 x Acetonitrila com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção ($\mu\text{g/mL}$)	2ª Injeção ($\mu\text{g/mL}$)	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de efavirenz por placa (μg)	Recuperação (%)
1	36,31	36,21	36,26	174,42	83
2	41,72	41,61	41,67	174,42	96
3	40,57	40,57	40,57	174,42	93
4	38,91	38,96	38,94	174,42	89
5	41,38	41,46	41,42	174,42	95
				Média	91
				DP	5,1
				DPR (%)	5,63

Tabela 2 – Swab Coventry™ modelo 36060 x Acetonitrila com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	39,85	39,88	39,87	174,50	91
2	41,56	41,60	41,58	174,50	95
3	38,05	38,13	38,09	174,50	87
4	37,44	37,41	37,43	174,50	86
5	40,39	40,28	40,34	174,50	92
				Média	90
				DP	3,9
				DPR (%)	4,31

Tabela 3 – Swab Coventry™ modelo 36060 x Acetonitrila / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	22,36	22,44	22,40	174,42	51
2	23,44	23,41	23,43	174,42	54
3	22,26	22,20	22,23	174,42	51
4	27,44	27,49	27,47	174,42	63
5	18,13	18,11	18,12	174,42	42
				Média	52
				DP	7,7
				DPR (%)	14,71

Tabela 4 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Acetonitrila / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	22,09	22,16	22,13	176,61	50
2	22,38	22,40	22,39	176,61	51
3	24,08	24,06	24,07	176,61	55
4	24,02	24,02	24,02	176,61	54
5	29,53	29,53	29,53	176,61	67
				Média	55
				DP	6,8
				DPR (%)	12,32

Tabela 5 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Metanol / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	18,71	18,77	18,74	174,42	43
2	18,81	18,91	18,86	174,42	43
3	20,45	20,47	20,46	174,42	47
4	19,37	19,36	19,37	174,42	44
5	18,53	18,49	18,51	174,42	42
				Média	44
				DP	1,8
				DPR (%)	4,05

Tabela 6 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Metanol / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	17,53	17,49	17,51	174,50	40
2	13,11	13,12	13,12	174,50	30
3	16,67	16,67	16,67	174,50	38
4	10,94	10,97	10,96	174,50	25
5	16,62	16,58	16,60	174,50	38
				Média	34
				DP	6,4
				DPR (%)	18,94

Tabela 7 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Etanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	27,94	27,96	27,95	174,42	64
2	22,98	23,00	22,99	174,42	53
3	25,50	25,50	25,50	174,42	58
4	23,80	23,78	23,79	174,42	55
5	26,01	26,12	26,07	174,42	60
				Média	58
				DP	4,5
				DPR (%)	7,72

Tabela 8 – Swab Coventry™ modelo 36060 x Etanol com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	27,10	27,13	27,12	176,61	61
2	28,99	28,99	28,99	176,61	66
3	34,53	34,54	34,54	176,61	78
4	34,63	34,68	34,66	176,61	78
5	34,08	34,10	34,09	176,61	77
				Média	72
				DP	8,1
				DPR (%)	11,20

Tabela 9 – Swab Coventry™ modelo 36060 x Etanol / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	16,94	16,91	16,93	174,03	39
2	16,04	16,05	16,05	174,03	37
3	18,00	17,93	17,97	174,03	41
4	14,47	14,49	14,48	174,03	33
5	19,51	19,52	19,52	174,03	45
				Média	39
				DP	4,4
				DPR (%)	11,23

Tabela 10 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Etanol / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	28,38	28,41	28,40	174,50	65
2	26,83	26,86	26,85	174,50	62
3	32,22	32,21	32,22	174,50	74
4	33,48	33,46	33,47	174,50	77
5	30,44	30,38	30,41	174,50	70
				Média	69
				DP	6,2
				DPR (%)	8,99

Tabela 11 – *Swab Coventry*TM modelo 36060 x Isopropanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	14,91	14,92	14,92	174,42	34
2	18,99	19,03	19,01	174,42	44
3	21,37	21,39	21,38	174,42	49
4	18,34	18,30	18,32	174,42	42
5	18,34	18,33	18,34	174,42	42
				Média	42
				DP	5,3
				DPR (%)	12,63

Tabela 12 – Swab Coventry™ modelo 36060 x Isopropanol com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	21,30	21,28	21,29	176,61	48
2	16,11	16,13	16,12	176,61	37
3	18,89	19,37	19,13	176,61	43
4	28,04	28,01	28,03	176,61	63
5	23,04	23,02	23,03	176,61	52
				Média	49
				DP	10,1
				DPR (%)	20,61

Tabela 13 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Acetonitrila com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	38,44	38,35	38,40	174,42	88
2	42,06	41,92	41,99	174,42	96
3	41,92	41,98	41,95	174,42	96
4	42,56	42,66	42,61	174,42	98
5	41,66	41,97	41,82	174,42	96
				Média	95
				DP	3,9
				DPR (%)	4,06

Tabela 14 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Acetonitrila com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	41,89	41,87	41,88	176,61	95
2	41,26	41,26	41,26	176,61	93
3	41,01	41,04	41,03	176,61	93
4	41,48	41,53	41,51	176,61	94
5	42,36	42,40	42,38	176,61	96
				Média	94
				DP	1,2
				DPR (%)	1,29

Tabela 15 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Acetonitrila / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	29,50	29,54	29,52	174,42	68
2	28,97	29,01	28,99	174,42	66
3	34,53	34,47	34,50	174,42	79
4	36,76	36,70	36,73	174,42	84
5	34,49	34,51	34,50	174,42	79
				Média	75
				DP	7,8
				DPR (%)	10,42

Tabela 16 – *Swab* Texwipe® modelo TX761 x Acetonitrila / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	33,14	33,20	33,17	176,61	75
2	31,52	31,59	31,56	176,61	71
3	33,98	34,01	34,00	176,61	77
4	33,79	33,78	33,79	176,61	77
5	31,06	31,03	31,05	176,61	70
				Média	74
				DP	3,0
				DPR (%)	4,08

Tabela 17 – *Swab* Texwipe® modelo TX761 x Metanol / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	21,18	21,13	21,16	174,42	49
2	25,71	25,73	25,72	174,42	59
3	26,35	26,34	26,35	174,42	60
4	19,70	19,66	19,68	174,42	45
5	24,14	24,10	24,12	174,42	55
				Média	54
				DP	6,6
				DPR (%)	12,28

Tabela 18 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Metanol / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	24,20	24,18	24,19	176,61	55
2	22,63	22,57	22,60	176,61	51
3	21,66	21,68	21,67	176,61	49
4	25,36	25,31	25,34	176,61	57
5	22,15	22,11	22,13	176,61	50
				Média	53
				DP	3,5
				DPR (%)	6,55

Tabela 19 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Etanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	36,28	36,29	36,29	174,42	83
2	38,75	38,87	38,81	174,42	89
3	39,44	39,46	39,45	174,42	90
4	39,28	39,21	39,25	174,42	90
5	36,54	36,57	36,56	174,42	84
				Média	87
				DP	3,5
				DPR (%)	4,02

Tabela 20 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Etanol com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	39,41	39,34	39,38	176,61	89
2	43,73	43,70	43,72	176,61	99
3	42,40	42,47	42,44	176,61	96
4	43,80	43,74	43,77	176,61	99
5	40,10	40,14	40,12	176,61	91
				Média	95
				DP	4,6
				DPR (%)	4,86

Tabela 21 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Etanol / Água purificada (1:1) com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	31,53	31,53	31,53	174,03	72
2	33,50	33,44	33,47	174,03	77
3	34,27	34,29	34,28	174,03	79
4	32,35	32,36	32,36	174,03	74
5	31,84	31,56	31,70	174,03	73
				Média	75
				DP	2,7
				DPR (%)	3,62

Tabela 22 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Etanol / Água purificada (1:1) com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	22,21	22,21	22,21	174,50	51
2	23,81	23,82	23,82	174,50	55
3	21,23	21,24	21,24	174,50	49
4	26,59	26,60	26,60	174,50	61
5	20,00	19,99	20,00	174,50	46
				Média	52
				DP	5,9
				DPR (%)	11,26

Tabela 23 – Swab Texwipe® modelo TX761 x Isopropanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	36,59	36,27	36,43	174,42	84
2	38,18	38,19	38,19	174,42	88
3	40,20	40,16	40,18	174,42	92
4	37,42	37,39	37,41	174,42	86
5	35,41	35,40	35,41	174,42	81
				Média	86
				DP	4,2
				DPR (%)	4,84

Tabela 24 – *Swab* Texwipe® modelo TX761 x Isopropanol com 30 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	32,92	32,90	32,91	176,61	75
2	34,38	34,39	34,39	176,61	78
3	37,34	37,42	37,38	176,61	85
4	34,74	34,81	34,78	176,61	79
5	36,50	36,45	36,48	176,61	83
				Média	80
				DP	4,0
				DPR (%)	5,00

Tabela 25 – Precisão intermediária Analista A. *Swab* Texwipe® modelo TX761 x Etanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	40,35	40,47	40,41	174,01	93
2	40,34	40,30	40,32	174,01	93
3	39,86	39,83	39,85	174,01	92
4	38,75	38,82	38,79	174,01	89
5	40,60	40,65	40,65	174,01	93
				Média	92
				DP	1,7
				DPR (%)	1,88

Tabela 26 – Precisão intermediária Analista B. *Swab* Texwipe® modelo TX761 x Etanol com 15 minutos de ultrassom.

Placas	1ª Injeção (µg/mL)	2ª Injeção (µg/mL)	Média (µg/mL)	Quantidade de efavirenz por placa (µg)	Recuperação (%)
1	39,33	39,33	39,33	174,01	90
2	39,48	39,46	39,46	174,01	91
3	39,06	39,08	39,08	174,01	90
4	42,34	42,31	42,31	174,01	97
5	40,54	40,50	40,50	174,01	93
				Média	92
				DP	2,9
				DPR (%)	3,20

APÊNDICE B – Estatística de regressão das curvas de calibração para determinação de LD e LQ

Curva 1

RESUMO DOS RESULTADOS		SQ		MQ		F		F de significação		95% inferiores		95% superiores		Inferior 95,0%		Superior 95,0%	
<i>Estatística de regressão</i>																	
R múltiplo	0,999879686																
R-Quadrado	0,999759387																
R-quadrado ajustado	0,999679183																
Erro padrão	2013,240588																
Observações	5																
ANOVA																	
	<i>gl</i>																
Regressão	1	50522982990	50522982990	12465,15346	1,58416E-06												
Resíduo	3	12159412,99	4053137,664														
Total	4	50535142403															
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>		<i>Stat t</i>		<i>valor-P</i>		<i>95% inferiores</i>		<i>95% superiores</i>		<i>Inferior 95,0%</i>		<i>Superior 95,0%</i>			
Intersecção	1064,568279	2110,946099	0,504308603	0,648752804	-5653,404333	7782,540891	-5653,404333	7782,540891	-5653,404333	7782,540891							
Variável X 1	229659,1594	2057,003146	111,6474517	1,58416E-06	223112,8573	236205,4614	223112,8573	236205,4614									

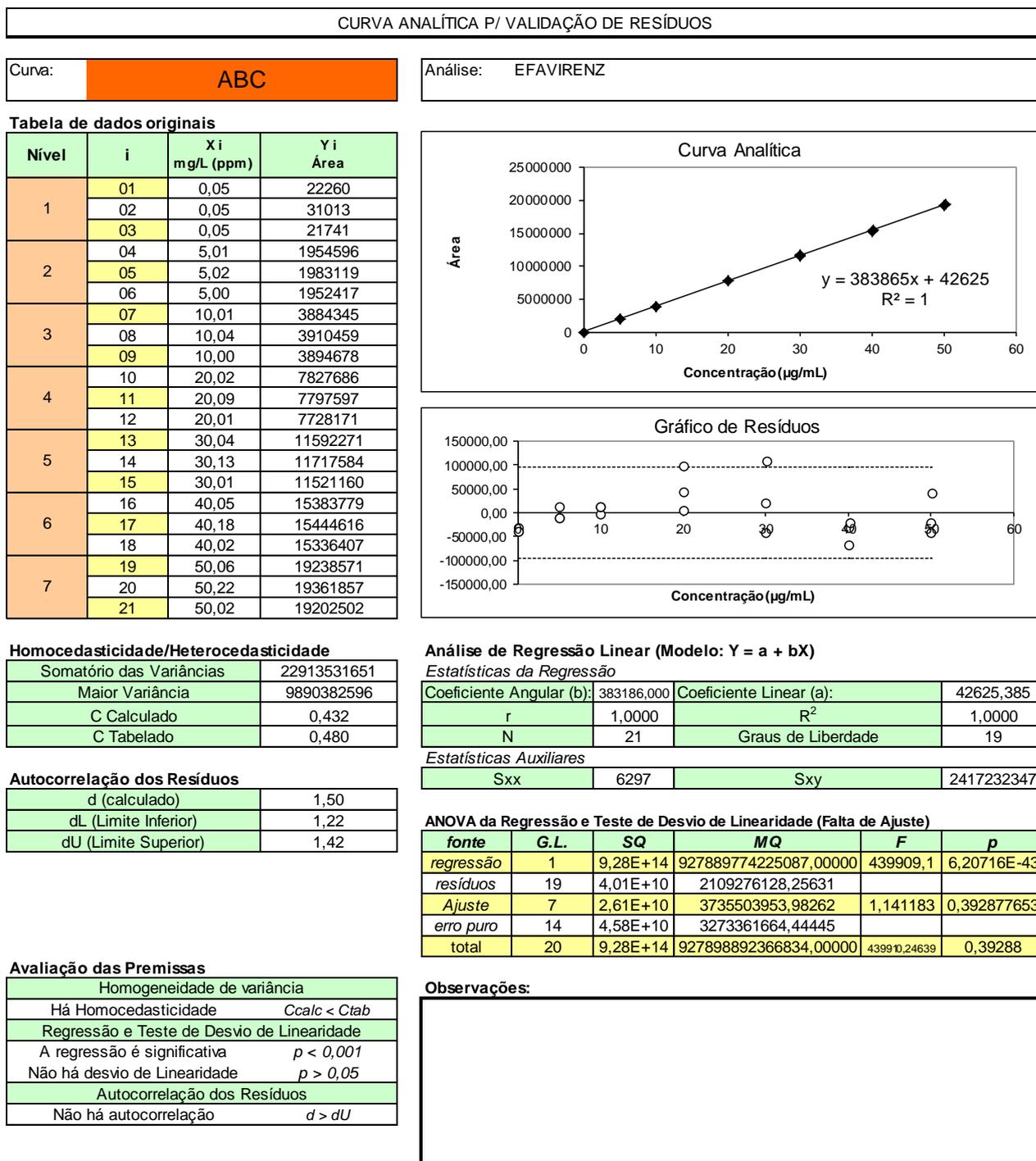
Curva 2

RESUMO DOS RESULTADOS											
<i>Estatística de regressão</i>											
R múltiplo	0,99996551										
R-Quadrado	0,999931021										
R-quadrado ajustado	0,999908028										
Erro padrão	1028,053256										
Observações	5										
ANOVA											
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>						
Regressão	1	45962651503	45962651503	43488,44198	2,4315E-07						
Resíduo	3	3170680,49	1056893,497								
Total	4	45965822183									
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>			
Interseção	1927,120973	1077,945074	1,7877772884	0,171772182	-1503,381344	5357,623291	-1503,381344	5357,623291			
Variável X 1	219901,8808	1054,488917	208,5388261	2,4315E-07	216546,0265	223257,7352	216546,0265	223257,7352			

Curva 3

RESUMO DOS RESULTADOS								
Estatística de regressão								
R múltiplo	0,99998017							
R-Quadrado	0,999960341							
R-quadrado ajustado	0,999947122							
Erro padrão	796,7720356							
Observações	5							
ANOVA								
	gl	SQ	MQ	F	F de significação	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Regressão	1	48021307672	48021307672	75642,48987	1,05999E-07			
Resíduo	3	1904537,03	634845,6767					
Total	4	48023212209						
	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-340,518699	835,8822299	-0,407376406	0,711057091	-3000,669013	2319,631615	-3000,669013	2319,631615
Variável X 1	223756,5297	813,5660363	275,0317979	1,05999E-07	221167,3995	226345,6599	221167,3995	226345,6599

APÊNDICE C – Estatística de regressão para confirmação de Linearidade

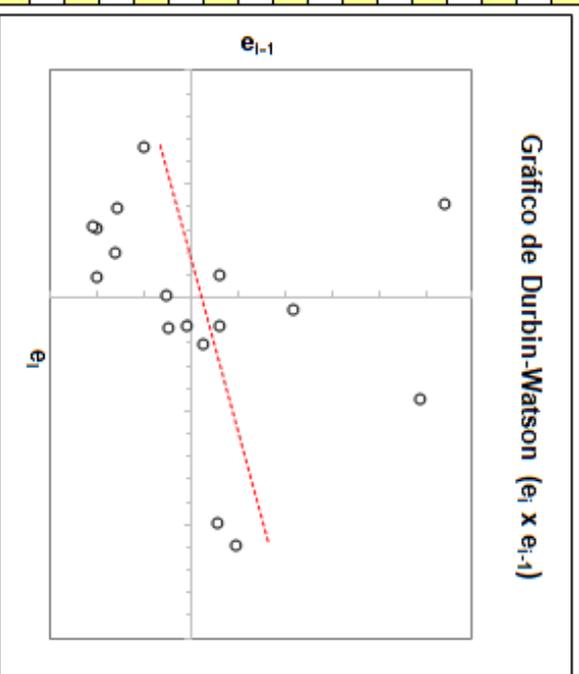


VALORES EXTREMOS								
Y_{est}	$Y_i - Y_{est}$ (e_i)	$(Y_i - Y_{est})^2$	$(X_i - X_{med})^2$	h_i	Se_i	r_i	Je_i	outliers
61841,6437	-39581,6437	1566706518,6572600	490,3674	0,1255	42948,5847	-0,9216	-0,9178	
61903,0620	-30889,7287	954175339,2127120	490,3603	0,1255	42948,6123	-0,7192	-0,7098	
61826,2891	-40084,9558	1606803680,9745000	490,3691	0,1255	42948,5777	-0,9333	-0,9300	
1964251,2538	-9655,2538	93223926,7861272	295,4377	0,0945	43702,1120	-0,2209	-0,2153	
1970393,0864	12726,2469	161957360,3761910	294,8879	0,0944	43704,2188	0,2912	0,2841	
1962715,7957	-10298,7957	106065192,8375290	295,5752	0,0946	43701,5849	-0,2357	-0,2297	
3885877,1227	-1531,7893	2346378,5634626	148,4084	0,0712	44261,9872	-0,0346	-0,0337	
3898160,7878	12297,8788	151237823,8932920	147,6298	0,0711	44264,9333	0,2778	0,2710	
3882806,2064	11871,7936	140939483,8349850	148,6034	0,0712	44261,2494	0,2682	0,2616	
7729128,8603	98557,1397	9713509783,0208400	4,7102	0,0484	44802,4182	2,1998	2,4802	outlier
7753696,1906	43901,1427	1927310329,8786200	4,4365	0,0483	44803,4414	0,9799	0,9788	
7722987,0277	5184,3056	26877024,5556745	4,7799	0,0484	44802,1576	0,1157	0,1127	
11572380,5980	19890,7354	395641353,6355010	61,4923	0,0574	44589,6508	0,4461	0,4365	
11609231,5934	108352,4066	11740244005,5562000	63,0071	0,0576	44583,9607	2,4303	2,8495	outlier
11563167,8491	-42007,5158	1764631380,0225000	61,1164	0,0573	44591,0624	-0,9421	-0,9391	
15415632,3356	-31853,3356	1014634989,3885100	318,7546	0,0982	43612,6627	-0,7304	-0,7211	
15464766,9963	-20150,9963	406062650,1744620	323,3415	0,0990	43595,0445	-0,4622	-0,4525	
15403348,6704	-66942,0038	4481231870,0236700	317,6130	0,0981	43617,0464	-1,5348	-1,5960	
19258884,0733	-20312,7399	412607403,1499400	776,4972	0,1709	41817,9249	-0,4857	-0,4758	
19320302,3991	41554,6009	1726784858,7021600	785,4399	0,1723	41782,0945	0,9946	0,9943	
19243529,4918	-41027,4918	1683255083,6255000	774,2696	0,1706	41826,8457	-0,9809	-0,9799	

Teste de Durbin-Watson para autocorrelação dos resíduos

i	e_i	e_{i-1}	$e_i - e_{i-1}$	$(e_i - e_{i-1})^2$	e_i^2
1,000	-39581,644	-	-	-	1566706518,65726
2,000	-30889,729	-39581,644	8691,915	75549386,49799	9541775339,21271
3,000	-40084,956	-30889,729	-9195,227	84552201,28698	1606803680,97450
4,000	-9655,254	-40084,956	30429,702	925966760,75996	93223926,78613
5,000	12726,247	-9655,254	22381,501	500931575,92052	161957360,37619
6,000	-10298,796	12726,247	-23025,043	530152587,05004	106065192,83753
7,000	-1531,789	-10298,796	8767,006	76860400,59524	2346378,56346
8,000	12297,879	-1531,789	13829,668	191259721,72155	151237823,89329
9,000	11871,794	12297,879	-426,085	181548,60944	140939483,83499
10,000	98557,140	11871,794	86685,346	7514349221,94746	9713509783,02084
11,000	43901,143	98557,140	-54655,997	2987278007,10414	1927310329,87862
12,000	5184,306	43901,143	-38716,837	1498993474,58725	26877024,55567
13,000	19890,735	5184,306	14706,430	216279076,63202	395641353,63550
14,000	108352,407	19890,735	88461,671	7825467267,92987	117740244005,55620
15,000	-42007,516	108352,407	-150359,922	22608106236,50750	1764631380,02250
16,000	-31853,336	-42007,516	10154,180	103107374,47535	1014634989,38851
17,000	-20150,996	-31853,336	11702,339	136944746,28353	406062650,17446
18,000	-66942,004	-20150,996	-46791,008	2189398384,91933	4481231870,02367
19,000	-20312,740	-66942,004	46629,264	2174288247,87313	412607403,14994
20,000	41554,601	-20312,740	61867,341	3827567864,50454	1726784858,70216
21,000	-41027,492	41554,601	-82582,093	6819802040,62011	1683255083,62550

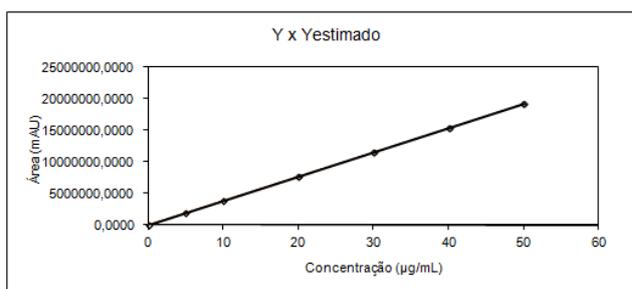
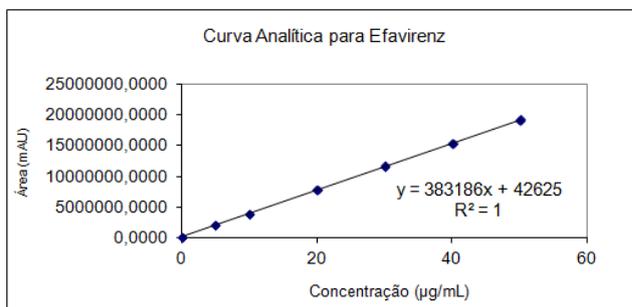
n	21
α	0,05
d	1,504308
dL	1,220167
dU	1,419731



Nível	X i	Y i	X ²	Y ²	XY	Yest	y-vest	x-xmed	y-med _i	(yest-y-med _i) ²
1	0.0501	22260,000000	0,0025	495507600,000000	1114,3356	61841,64371	-39581,644	-22,1442	25004,8889	1356946505,631520
	0.0502	31013,333333	0,0025	961826844,444444	1557,4896	61903,06203	-30889,729	-22,1441	25004,8889	1361475181,460940
	0.0500	21741,333333	0,0025	472685575,111111	1087,501493	61826,28913	-40084,956	-22,1443	25004,8889	1355815515,490020
2	5,0060	1954596,000000	25,0600	3820445523216,000000	9784707,576	1964251,254	-9655,254	-17,1883	1963377,4444	763542,866214
	5,0220	1983119,333333	25,2205	3932762290240,440000	9959225,292	1970393,086	-12726,247	-17,1723	1963377,4444	49219232,396956
	5,0020	1952417,000000	25,0200	3811932141889,000000	9765989,834	1962715,796	-10298,796	-17,1923	1963377,4444	437779,063132
3	10,0120	3884345,333333	100,2401	15088138668588,400000	38890065,48	3885877,123	-1531,789	-12,1823	3896494,0000	112718084,298933
	10,0440	3910458,666667	100,8819	15291686983708,400000	39276646,85	3898160,788	-12297,879	-12,1503	3896494,0000	2778181,668613
	10,0040	3894678,000000	100,0800	15168516723684,000000	38962358,71	3882806,206	-11871,794	-12,1903	3896494,0000	187355694,274939
4	20,0240	7827686,000000	400,9606	61272668114596,000000	156741584,5	7729128,86	-98557,140	-2,1703	7784484,8889	3064289899,547690
	20,0880	7797597,333333	403,5277	60802524172807,100000	156638135,2	7753696,191	-43901,143	-2,1063	7784484,8889	94794399,930149
	20,0080	7728171,333333	400,3201	59724632157355,100000	154625252	7722987,028	-5184,306	-2,1863	7784484,8889	3781986926,725860
5	30,0360	11592271,333333	902,1613	134380754665622,000000	348185461,8	11572380,59796	-19890,735	7,8417	11610338,5556	1440806544,718630
	30,1320	11717584,000000	907,9374	137301774797056,000000	353074241,1	11609231,59	-108352,407	7,9377	11610338,5556	1225365,107029
	30,0120	11521160,333333	900,7201	132737135426373,000000	345773063,9	11563167,85	-42007,516	7,8177	11610338,5556	2225075548,487170
6	40,0480	15383779,000000	1603,8423	236660656320841,000000	61608981,4	15415632,34	-31853,336	17,8537	15388267,2222	748849430,644210
	40,1760	15444616,000000	1614,1110	238536163387456,000000	620502892,4	15464767	-20150,996	17,9817	15388267,2222	5852215427,465520
	40,0160	15336406,666667	1601,2803	235205369445378,000000	613701649,2	15403348,67	-66942,004	17,8217	15388267,2222	227450080,533380
7	50,0600	19238571,3333	2506,0036	37012266947755,0000	963082880,9	19258884,07	-20312,740	27,8657	19267643,4444	76726583,624042
	50,2200	19361857,0000	2522,0484	374881506488449,0000	972352458,5	19320302,4	-41554,601	28,0257	19267643,4444	2772965501,937620
	50,0200	19202502,0000	2502,0004	368736083060004,0000	960509150	19243529,49	-41027,492	27,8257	19267643,4444	581482712,005765
Soma	466,0803	179806831	16641	2467477307335040	6407919104	179806831,333333			179806831,3333	26148527677,878300

Nível	y-med _i	y-y-med	(y-yest)	(x-xmed)(y-y-med)	(y-yest) ²	(x-xmed) ²	(y-Ymed) ²	(y-y-med i) ²	t _(1-a/2;n-2) *S	-t _(1-a/2;n-2) *S
1	-2744,88889	-8539970,06349	-39581,64371	189111146,7	1566706518,6573700	490,3674	72931088685340,600000	7534415,012346	96126,01474	-96126,01474
	6008,44444	-8531216,73016	-30889,72870	188915945,8	954175339,2127980	490,3603	72781658896940,200000	36101404,641975	96126,01474	-96126,01474
	-3263,55556	-8540488,73016	-40084,95579	189122973,8	1606803680,9746100	490,3691	72939947749968,300000	10650794,864198	96126,01474	-96126,01474
2	-8781,44444	-6607634,06349	-9655,25384	113573996,6	93223926,7861362	295,4377	43660827917020,600000	77113766,530861	96126,01474	-96126,01474
	19741,88889	-6579110,73016	12726,24691	112978463,2	161957360,3761790	294,8879	43284697999689,700000	389742176,901239	96126,01474	-96126,01474
	-10960,44444	-6609813,06349	-10298,79570	113637889,1	106065192,8375380	295,5752	43689628734310,300000	120131342,419749	96126,01474	-96126,01474
3	-12148,66667	-4677884,73016	-1531,78933	56987395,15	2346378,5634611	148,4084	21882605548652,200000	147590101,777774	96126,01474	-96126,01474
	13964,66667	-4651771,39683	12297,87884	56520418	151237823,8933030	147,6298	21638977128322,900000	195011915,111107	96126,01474	-96126,01474
	-1816,00000	-4667552,06349	11871,79362	56898859,92	140939483,8349960	148,6034	21786042265409,000000	3297856,000000	96126,01474	-96126,01474
4	43201,11111	-734544,06349	98557,13969	1584180,981	9713509783,0213900	4,7102	539554981211,432000	1866336001,234640	96126,01474	-96126,01474
	13112,44444	-764632,73016	43901,14269	1610545,92	1927310329,8788700	4,4365	584663212029,994000	171936199,308656	96126,01474	-96126,01474
	-56313,55556	-834058,73016	5184,30560	1823502,602	26877024,5557034	4,7799	695653965353,994000	3171216539,308580	96126,01474	-96126,01474
5	-18067,22222	3030041,26984	19890,73537	23760674,63	395641353,6356490	61,4923	9181150096941,300000	326424518,827220	96126,01474	-96126,01474
	107245,44444	3155335,93651	108352,40655	25046252,94	11740244005,5570000	63,0071	9956258464636,130000	11501585354,085900	96126,01474	-96126,01474
	-89178,22222	2958930,26984	-42007,51576	23132029,17	1764631380,0221900	61,1164	8755268341782,930000	7952755318,716340	96126,01474	-96126,01474
6	-4488,22222	6821548,93651	-31853,33561	121789888,2	1014634989,3881500	318,7546	46533529893172,600000	20144138,716048	96126,01474	-96126,01474
	56348,77778	6882385,93651	-20150,99626	123756999,2	406062650,1742370	323,3415	47367236179042,200000	3175184757,049410	96126,01474	-96126,01474
	-51860,55556	6774176,60317	-66942,00378	120727343,2	4481231870,0229200	317,6130	45889468650998,200000	2689517222,530910	96126,01474	-96126,01474
7	-29072,11111	10676341,26984	-20312,73992	297503722,9	412607403,1494860	776,4972	113984262910116,000000	845187644,456838	96126,01474	-96126,01474
	94213,55556	10799626,93651	41554,60093	302667104,6	1726784858,7030900	785,4399	116631941967748,000000	8876194050,419830	96126,01474	-96126,01474
	-65141,44444	10640271,93651	-41027,49180	296073014,8	1683255083,6248800	774,2696	113215386882838,000000	4243407784,308590	96126,01474	-96126,01474
Soma			2417232347	40076246437	6297	927929850471525,000000	45827063302,222200			

ANOVA	fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
	regressão	1	927889774225087,00000	9,2789E+14	439909,1052	6,20716E-43
	resíduos	19	40076246436,87000	2109276128		
	<i>desvio de linearidade</i>	<i>7</i>	<i>26148527677,87830</i>	<i>3735503954</i>	<i>1,141182777</i>	<i>0,392877653</i>
	erro puro	14	45827063302,22220	3273361664		
	total	20	927929850471525,00000			



HOMOCEASTICIDADE / HETEROCEASTICIDADE

Nível	X i	Y i	Yi Médio	Variância (Yi) S ²
1	0,0501	22260,0000	25004,888889	27143307,259259
	0,0502	31013,3333		
	0,0500	21741,3333		
2	5,0060	1954596,0000	1963377,444444	293493642,925924
	5,0220	1983119,3333		
	5,0020	1952417,0000		
3	10,0120	3884345,3333	3896494,000000	172949936,444440
	10,0440	3910458,6667		
	10,0040	3894678,0000		
4	20,0240	7827686,0000	7784484,888889	2604744369,925940
	20,0880	7797597,3333		
	20,0080	7728171,3333		
5	30,0360	11592271,3333	11610338,555556	9890382595,814750
	30,1320	11717584,0000		
	30,0120	11521160,3333		
6	40,0480	15383779,0000	15388267,222222	2942423059,148180
	40,1760	15444616,0000		
	40,0160	15336406,6667		
7	50,0600	19238571,3333	19267643,444444	6982394739,592630
	50,2200	19361857,0000		
	50,0200	19202502,0000		

Cálculo da homocedasticidade/heterocedasticidade

Somatório das Variâncias:	22913531651,11110
Maior Variância:	9890382595,81475
C Calculado:	0,43164
C Tabelado:	0,480

Curva Homocedástica

ANEXO A – Pontos para pesquisa de resíduo de Efavirenz



AVALIAÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 72210



ÁREA DE COLETA	PONTO	ATIVO
GRANULADOR NIRO ATOMIZER - Sala 72210 -	1 Tampa do granulador	Efavirenz
	2 Interior do granulador	
	3 Hélice do granulador	
	4 Eixo da hélice do granulador	
LEITO FLUIDIZADO e LEVANTADOR DE CAÇAMBA GLATT - - Sala 72210 -	5 Corpo do leito	Efavirenz
	6 Caçamba n°1 - corpo	
	7 Caçamba n°1 - tela	
	8 Caçamba n°2 - corpo	
	9 Caçamba n°2 - tela	
	10 Funil de descarga	
	11 Funil de alimentação	
	12 Rolo do granulador	
	13 Malha	
	14 Funil Pós-Granulação	
MISTURADOR V LAWES - Sala 72210 -	15 Fundo da tampa do misturador	Efavirenz
	16 Boca de entrada do misturador	
	17 Boca do funil do misturador	
MOINHO EUROVENT - Sala 72210 -	18 Funil de alimentação - parte superior	Efavirenz
	19 Funil de alimentação - parte inferior	
	20 Câmara de moagem	
PENEIRA MANUAL 16 mesh - Sala 72210 -	21 Malha 16	Efavirenz

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____


AVALIÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 72206


ÁREA DE COLETA	PONTO	ATIVO	
MÁQUINA DE COMPRESSÃO FETTE 20901 (Nº 18) - SALA 72206 -	22	Parede inferior do funil de alimentação	Eflavrenz
	23	Parede superior do funil de alimentação	
	24	Junta de silicone do funil de alimentação	
	25	Orifício de alimentação	
	26	Distribuidor	
	27	Mesa do distribuidor	
	28	Aranha - 01	
	29	Aranha - 02	
	30	Aranha - 03	
	31	Coroa - Mesa	
	32	Raspador	
	33	Saída compressora para desempoeirador	
	34	Interior da cabine de compressão	
	35	Entrada do desempoeirador	
DESEMPOEIRADOR DE COMPRIMIDOS E DETECTOR DE METAIS - SALA 72206 -	36	Parede interna do desempoeirador	Eflavrenz
	37	Espirai no interior do desempoeirador	
	38	Rampa de saída do desempoeirador	
	39	Entrada do Metatcheck	
	40	Saída do Metatcheck	
	41	Recipiente do Metatcheck	
	42	Calha de saída do produto para a barrica	

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____


AVALIAÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 70448


ÁREA DE COLETA	PONTO	ATIVO	
MÁQUINA DE COMPRESSÃO FETTE 20901 (Nº 21) - SALA 70488 -	43	Parede inferior do funil de alimentação	Efavrenz
	44	Parede superior do funil de alimentação	
	45	Junta de silicone do funil de alimentação	
	46	Orifício de alimentação	
	47	Distribuidor	
	48	Mesa do distribuidor	
	49	Aranha - 01	
	50	Aranha - 02	
	51	Aranha - 03	
	52	Coroa - Mesa	
	53	Raspador	
	54	Saída compressora para desempoeirador	
	55	Interior da cabine de compressão	
DESEMPOEIRADOR DE COMPRIMIDOS E DETECTOR DE METAIS - SALA 70488 -	56	Entrada do desempoeirador	Efavrenz
	57	Parede interna do desempoeirador	
	58	Espiral no interior do desempoeirador	
	59	Rampa de saída do desempoeirador	
	60	Entrada do Metaltcheck	
	61	Saída do Metaltcheck	
	62	Recipiente do Metaltcheck	
	63	Calha de saída do produto para a barreira	

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____



AVALIAÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 71222



ÁREA DE COLETA	PONTO		ATIVO
DRAGADOR GS 300 - Sala 71222 -	64	Cuba	Eivirenz
	65	Paleta	
	66	Braco da Pistola	
	67	Visor (interno)	
	68	Insuflador de ar quente	

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____



AVALIÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 71580



ÁREA DE COLETA	PONTO		ATIVO
DRAGEADOR EUROVENT DC 200 - Sala 71580 -	69	Interior da Cuba	Efwirienz
	70	Pás no interior da Cuba	
	71	Supporte para os Pistões	

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____



AValiação DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 70807



AREA DE COLETA	PONTO	ATIVO
ENVASADORA CREMER - Sala 70807 -	72	Parede do funil onde armazena para alimentar
	73	Fundo do funil onde armazena para alimentar
	74	Tampa do funil onde armazena para alimentar
	75	Placa vibratória
	76	Calha vibratória - 01
	77	Calha vibratória - 02
	78	Funil de alimentação para envase - 01
	79	Funil de alimentação para envase - 02
		Efavirenz

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____



AVALIAÇÃO DE LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS - SALA 70818



ÁREA DE COLETA	PONTO	ATIVO
CONTADORA SWIFTPACK - Sala 70818 -	80	Parede do Funil onde armazena para alimentar
	81	Fundo do Funil onde armazena para alimentar
	82	Placa vibratória
	83	Calha vibratória - 01
	84	Funil de alimentação para envase

Amostrador (Nome por extenso): _____

Número do último Lote manipulado: _____

Analista: _____

Peso do Padrão: _____

Registro: _____

Potência: _____

ANEXO B – Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos


Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ

De acordo com a NBR 14725-4:2009

Data da revisão 01.07.2011

Versão 2.1

SECÇÃO 1. Identificação do produto e da empresa**1.1 Identificador do produto**

No. de catálogo	100029
Nome do produto	Acetonitrilo hypergrade para LC- MS LiChrosolv®
Número de registro REACH	Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.

1.2 Usos identificados da substância ou mistura e usos não recomendados

Usos identificados	Reagente para análise Para informações adicionais sobre os usos, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merck-chemicals.com).
--------------------	---

1.3 Detalhes do fornecedor da folha de dados de segurança

Companhia	Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +5511 4616-5431 / +5511 4614-0109
-----------	---

1.4 Número do telefone de emergência

Cotia/SP * tel.: ++5511 46165431 * fax:++5511 46140109 Rio de Janeiro * tel.: ++552124442211 * fax: ++552124442001

SECÇÃO 2. Identificação de perigos**2.1 Classificação da substância ou mistura**

Classificação (REGULAMENTAÇÃO (EC) Nº 1272/2008)

Líquido inflamável, Categoria 2, H225

Toxicidade aguda, Categoria 4, Inalação, H332

Toxicidade aguda, Categoria 4, Dérmico, H312

Toxicidade aguda, Categoria 4, Oral, H302

Irritação nos olhos, Categoria 2, H319

Para obter o texto completo das Declarações H mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Classificação (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

F	Facilmente inflamável	R 11
Xn	Nocivo	R 20/21/22
Xi	Irritante	R 36

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 100029
Nome do produto Acetonitrilo hypergrade para LC- MS LiChrosolv®

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência

Perigo

Frases de perigo

H225 Líquido e vapores altamente inflamáveis.

H302 + H312 + H332 Nocivo se ingerido, em contato com a pele ou se inalado.

H319 Causa irritação ocular séria.

Declarações de precaução

P210 Manter distante do calor.

P305 + P351 + P338 SE NOS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos.

Remover as lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue enxaguando.

P403 + P235 Armazenar em local bem ventilado. Manter a calma.

N° CAS 75-05-8

Rotulagem (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

Símbolo(s): F Facilmente inflamável
 Xn Nocivo
R - Frase(s) 11- 20/21/22- 36 Facilmente inflamável. Nocivo por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Irritante para os olhos.
Frase(s) - S 16- 36/37 Manter afastado de chamas ou de fontes de ignição - não fumar. Usar roupas de proteção e luvas adequadas.

N° CE 200-835-2

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Símbolo(s): F Facilmente inflamável
 Xn Nocivo
R - Frase(s) 20/21/22 Nocivo por inalação, em contato com a pele e por ingestão.
Frase(s) - S 36/37 Usar roupas de proteção e luvas adequadas.

2.3 Outros perigos

A substância não atende os critérios para PBT ou vPvB conforme a regulamentação (CE) No. 1907/2006, Anexo XIII.

SECÇÃO 3. Composição e informações sobre os ingredientes

Fórmula	CH ₃ CN	C ₂ H ₃ N (Hill)
N° CAS	75-05-8	
N° CE	200-835-2	
Massa molar	41,05 g/mol	

SECÇÃO 4. Medidas de primeiros-socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merck-chemicals.com



**Ficha de Informações de Segurança de Produtos
Químicos - FISPQ**
De acordo com a NBR 14725-4:2009

Data da revisão 18.09.2012

Versão 2.2

SEÇÃO 1. Identificação do produto e da empresa**1.1 Identificador do produto**

No. de catálogo	111727
Nome do produto	Etanol grau de quociente para cromatografia de líquidos LiChrosolv®
Número de registro REACH	Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.

1.2 Usos identificados da substância ou mistura e usos não recomendados

Usos identificados	Reagente para análise, Produção química Para informações adicionais sobre os usos, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merck-chemicals.com).
--------------------	---

1.3 Detalhes do fornecedor da Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ

Empresa	Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +5511 4616-5431 / +5511 4614-0109
---------	---

1.4 Número do telefone de emergência

Cotia/SP * tel.: ++5511 46165431 * fax:++5511 46140109 Rio de Janeiro * tel.: ++552124442211 * fax: ++552124442001

SEÇÃO 2. Identificação de perigos**2.1 Classificação da substância ou mistura**

Classificação (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Líquido inflamável, Categoria 2, H225

Para obter o texto completo das frases de perigo mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Classificação (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

F Facilmente inflamável R11

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Pictogramas de risco*Palavra de advertência*

Perigo

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merck-chemicals.com

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 111727
Nome do produto Etanol grau de quociente para cromatografia de líquidos LiChrosolv®

Frases de perigo

H225 Líquido e vapores altamente inflamáveis.

Frases de precaução

P210 Manter distante do calor/ de faíscas/ de chamas diretas/ de superfícies quentes. - Não fumar.

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência
Perigo

Nº CAS 64-17-5

Rotulagem (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

Símbolo(s):  F Facilmente inflamável

R - Frase(s) 11 Facilmente inflamável.

Frase(s) - S 7-16 Manter o recipiente bem fechado. Manter afastado de chamas ou de fontes de ignição - não fumar.

Nº CE 200-578-6

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Símbolo(s):  F Facilmente inflamável

2.3 Outros perigos

Não conhecidos.

SEÇÃO 3. Composição e informações sobre os ingredientes

Fórmula	C ₂ H ₅ OH	C ₂ H ₆ O (Hill)
Nº CAS	64-17-5	
Nº CE	200-578-6	
Massa molar	46,07 g/mol	

Para obter o texto completo das frases de perigo mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Observações Não apresenta ingredientes perigosos conforme o Regulamento (EC) No. 1907/2006

SEÇÃO 4. Medidas de primeiros-socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros-socorros

Após inalação: Exposição ao ar fresco.

Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.

Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, mantendo a pálpebra aberta. Consultar um oftalmologista se necessário.



Ficha de Informações de Segurança de Produtos
Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

Data da revisão 26.07.2012

Versão 1.4

SEÇÃO 1. Identificação do produto e da empresa

1.1 Identificador do produto

No. de catálogo	101040
Nome do produto	2-Propanol grau de gradiente para cromatografia em fase líquida LiChrosolv®
Número de registro REACH	Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.

1.2 Usos identificados da substância ou mistura e usos não recomendados

Usos identificados	Reagente para análise, Solvente, Enchimento para colunas analíticas e separação preparativa Para informações adicionais sobre os usos, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merck-chemicals.com).
--------------------	---

1.3 Detalhes do fornecedor da folha de dados de segurança

Companhia	Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +5511 4616-5431 / +5511 4614-0109
-----------	---

1.4 Número do telefone de emergência

Cotia/SP * tel.: ++5511 46165431 * fax:++5511 46140109 Rio de Janeiro * tel.: ++552124442211 * fax: ++552124442001

SEÇÃO 2. Identificação de perigos

2.1 Classificação da substância ou mistura

Classificação (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Líquido inflamável, Categoria 2, H225

Irritação nos olhos, Categoria 2, H319

Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única, Categoria 3, H336

Para obter o texto completo das Declarações H mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Classificação (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

F	Facilmente inflamável	R11
Xi	Irritante	R36
		R67

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 101040
Nome do produto 2-Propanol grau de gradiente para cromatografia em fase líquida LiChrosolv®

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência
Perigo

Frases de perigo

H225 Líquido e vapores altamente inflamáveis.
H319 Causa irritação ocular séria.
H336 Pode causar sonolência e vertigem.

Frases de precaução

P210 Manter distante do calor/ de faíscas/ de chamas diretas/ de superfícies quentes. - Não fumar.
P233 Mantenha o recipiente bem fechado.
P305 + P351 + P338 SE NOS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Remover as lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue enxaguando.

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência
Perigo

N° CAS 67-63-0

Rotulagem (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

<i>Símbolo(s):</i>	F Xi	Facilmente inflamável Irritante
<i>R - Frase(s)</i>	11-36-67	Facilmente inflamável. Irritante para os olhos. Pode provocar sonolência e vertigens por inalação dos vapores.
<i>Frase(s) - S</i>	7-16-24/25-26	Manter o recipiente bem fechado. Manter afastado de chamas ou de fontes de ignição - não fumar. Evitar o contato com a pele e os olhos. No caso de contato com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

N° CE 200-661-7

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Símbolo(s): F
 Xi

Facilmente inflamável
Irritante

2.3 Outros perigos

A substância não atende os critérios para PBT ou vPvB conforme a regulamentação (CE) No. 1907/2006, Anexo XIII.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 101040
Nome do produto 2-Propanol grau de gradiente para cromatografia em fase líquida LiChrosolv®

SEÇÃO 3. Composição e informações sobre os ingredientes

Fórmula	CH ₃ CH(OH)CH ₃	C ₃ H ₈ O (Hill)
Nº CAS	67-63-0	
Nº CE	200-661-7	
Massa molar	60,1 g/mol	

Componentes perigosos (REGULAMENTAÇÃO (EC) Nº 1272/2008)

Nome químico (Concentração)

Nº CAS	Número de registo	Classificação
--------	-------------------	---------------

1-Propanol (<= 100 %)

A substância não atende os critérios para PBT ou vPvB conforme a regulamentação (CE) No. 1907/2006, Anexo XIII.

67-63-0	*)	Líquido inflamável, Categoria 2, H225 Irritação nos olhos, Categoria 2, H319 Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única, Categoria 3, H336
---------	----	---

*) Não há número de registo disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registo de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registo ou o registo está previsto para um prazo posterior.

Para obter o texto completo das Declarações H mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Componentes perigosos (1999/45/CE)

Nome químico (Concentração)

Nº CAS	Classificação
--------	---------------

1-Propanol (<= 100 %)

67-63-0	F, Facilmente inflamável; R11 Xi, Irritante; R36 R67
---------	--

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.

SEÇÃO 4. Medidas de primeiros-socorros

4.1 Descrição das medidas de primeiros socorros

Após a inalação: Exposição ao ar fresco. Caso o sinistrado esteja indisposto, chamar um médico.

Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar a roupa contaminada.

Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água. Consultar imediatamente um oftalmologista.

Depois de engolir: Atenção em caso de vômitos. Perigo de aspiração! Manter livres as vias respiratórias. Possível uma insuficiência pulmonar após a aspiração do vômito. Chamar o médico imediatamente .

4.2 Sintomas e efeitos mais importantes, agudos e retardados

efeitos irritantes, paralisia respiratória, Sonolência, Vertigem, Inconsciência, narcose, embriagado, Dor de cabeça, sonolência, Coma

Efeito desengordurante com formação de pele áspera e gretada.

4.3 Indicação da atenção médica imediata e do tratamento especial necessário

Não existem informações disponíveis.



Ficha de Informações de Segurança de Produtos
Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

Data da revisão 26.03.2012

Versão 1.6

SEÇÃO 1. Identificação do produto e da empresa

1.1 Identificador do produto

No. de catálogo	106035
Nome do produto	Metanol hypergrade para a cromatografia líquida LC-MS LiChrosolv®
Número de registro REACH	Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.

1.2 Usos identificados da substância ou mistura e usos não recomendados

Usos identificados	Reagente para análise, Solvente, Enchimento para colunas analíticas e separação preparativa Para informações adicionais sobre os usos, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merck-chemicals.com).
--------------------	---

1.3 Datalhes do fornecedor da folha de dados de segurança

Companhia	Merck S/A * Brasil * Rua Torre Eiffel, 100 - Parque Rincão - Gleba A Cotia - CEP: 06705-481 - São Paulo - SP * tel/fax: +5511 4616-5431 / +5511 4614-0109
-----------	---

1.4 Número do telefone de emergência

Cotia/SP * tel.: ++5511 46165431 * fax:++5511 46140109 Rio de Janeiro * tel.: ++552124442211 * fax: ++552124442001

SEÇÃO 2. Identificação de perigos

2.1 Classificação da substância ou mistura

Classificação (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Líquido inflamável, Categoria 2, H225
Toxicidade aguda, Categoria 3, Inalação, H331
Toxicidade aguda, Categoria 3, Dérmico, H311
Toxicidade aguda, Categoria 3, Oral, H301
Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única, Categoria 1, H370

Para obter o texto completo das Declarações H mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Classificação (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

F	Facilmente inflamável	R11
T	Tóxico	R23/24/25 - 39/23/24/25

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 106035
Nome do produto Metanol hypergrade para a cromatografia líquida LC-MS LiChrosolv®

2.2 Elementos do rótulo

Rotulagem (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência

Perigo

Frases de perigo

H225 Líquido e vapores altamente inflamáveis.

H301 + H311 + H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele ou se inalado.

H370 Causa dano aos órgãos.

Frases de precaução

P210 Manter distante do calor/ de faíscas/ de chamas diretas/ de superfícies quentes. - Não fumar.

P280 Use luvas de proteção/ roupas de proteção.

P302 + P352 SE NA PELE: Lavar com bastante água e sabão.

P309 + P310 EM CASO DE exposição ou de indisposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P403 + P235 Mantenha o recipiente/embalagem em local fresco bem ventilado.

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Pictogramas de risco



Palavra de advertência

Perigo

Frases de perigo

H301 + H311 + H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele ou se inalado.

H370 Causa dano aos órgãos.

Frases de precaução

P280 Use luvas de proteção/ roupas de proteção.

P309 + P310 EM CASO DE exposição ou de indisposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

N° CAS 67-56-1

Rotulagem (67/548/CEE ou 1999/45/CE)

<i>Símbolo(s):</i>	F	Facilmente inflamável
	T	Tóxico
<i>R - Frase(s)</i>	11-23/24/25- 39/23/24/25	Facilmente inflamável. Tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, no contato com a pele e por ingestão.
<i>Frase(s) - S</i>	7-16-36/37-45	Manter o recipiente bem fechado. Manter afastado de chamas ou de fontes de ignição - não fumar. Usar roupas de proteção e luvas adequadas. Nos casos de acidente ou indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível,

Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ
De acordo com a NBR 14725-4:2009

No. de catálogo 106035
Nome do produto Metanol hypergrade para a cromatografia líquida LC-MS LiChrosolv®

mostrar-lhe o rótulo).

Informações complementares

Experiência com exposição humana

N° CE 200-659-6

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Símbolo(s): F

T

R - Frase(s) 23/24/25-39/23/24/25

Frase(s) - S 36/37-45

Facilmente inflamável

Tóxico

Tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão. Tóxico: perigo de efeitos irreversíveis muito graves por inalação, no contato com a pele e por ingestão.

Usar roupas de proteção e luvas adequadas. Nos casos de acidente ou indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível, mostrar-lhe o rótulo).

2.3 Outros perigos

A substância não atende os critérios para PBT ou vPvB conforme a regulamentação (CE) No. 1907/2006, Anexo XIII.

SEÇÃO 3. Composição e informações sobre os ingredientes

Fórmula	CH ₃ OH	CH ₂ O (Hill)
N° CAS	67-56-1	
N° CE	200-659-6	
Massa molar	32,04 g/mol	

Componentes perigosos (REGULAMENTAÇÃO (EC) N° 1272/2008)

Nome químico (Concentração)

N° CAS	N° CE / Número de registo	N° de Index	Classificação
--------	---------------------------	-------------	---------------

Metanol (<= 100 %)

A substância não atende os critérios para PBT ou vPvB conforme a regulamentação (CE) No. 1907/2006, Anexo XIII.

67-56-1	200-659-6 / *)	-	Líquido inflamável, Categoria 2, H225 Toxicidade aguda, Categoria 3, H331 Toxicidade aguda, Categoria 3, H311 Toxicidade aguda, Categoria 3, H301 Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico - exposição única, Categoria 1, H370
---------	----------------	---	--

*) Não há número de registro disponível para essa substância, uma vez que a substância ou a utilização da mesma são isentas de registro de acordo com o Artigo 2 da norma REACH (CE) No. 1907/2006, a tonelagem anual não exige registro ou o registro está previsto para um prazo posterior.

Para obter o texto completo das Declarações H mencionadas nesta seção, consulte a seção 16.

Componentes perigosos (1999/45/CE)

Nome químico (Concentração)

N° CAS	N° CE	N° de Index	Classificação
--------	-------	-------------	---------------

Metanol (<= 100 %)

67-56-1	200-659-6	-	F, Facilmente inflamável; R11 T, Tóxico; R23/24/25-39/23/24/25
---------	-----------	---	---

Para o texto completo sobre as frases R mencionadas nesta Seção, ver a Seção 16.