UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação de limpeza da área de produção de medicamentos
contendo fármacos com alta atividade farmacológica

TATIANA TATIT DE FÁZIO

Dissertação para obtenção de título de
MESTRE

Orientadora:

Prof. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

SÃO PAULO
2005

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011332

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Fázio, Tatiana Tatit de
F287v Validação de limpeza da área de produção de medicamentos
contendo fármacos com alta atividade farmacológica / Tatiana
Tatit de Fázio. -- São Paulo, 2005.
140p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Medicamento : Controle de qualidade I. T. II. Santoro,
Maria Inês Rocha Miritello, orientador

615.19015 CDD

TATIANA TATIT DE FÁZIO

**VALIDAÇÃO DE LIMPEZA DA ÁREA DE PRODUÇÃO DE
MEDICAMENTOS CONTENDO FÁRMACOS COM ALTA ATIVIDADE
FARMACOLÓGICA**

**Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

07/11/2005

**Prof. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Orientadora/Presidente**

PROFA. DRA. MARIA PALMIRA D. GREMIÃO.

1º examinador

PROFA. DRA. THEREZA CRISTINA V. PENNA.

2º examinador

Se quisermos progredir, não
devemos repetir a história, mas
fazer uma história nova.

Gandhi.

Dedico esta dissertação aos
meus pais Antonio e Maria
Elisabeth, a minha avó Tâmara e
a meu esposo Roberto, que
sempre me apoiaram, tornando
esta conquista possível.

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, sinceros agradecimentos pela orientação, dedicação e incentivo constante durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores Érika R. M. Kedor-Hackmann, Anil K. Singh e Jorge S. Martins pelo convívio e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

À Fundação para o Remédio Popular – FURP na figura dos dirigentes Dr. Edson M. Nakazone e Dr. Luiz Henrique Bonacella pelo incentivo ao crescimento profissional de seus funcionários.

Aos colegas de FURP Márcia Aparecida Lucente, Rosana Ferreira e Dejair Serra Gil pela cooperação e apoio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	22
3. REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1. Validação de Limpeza.....	22
3.2. Medicamentos anti-retrovirais.....	39
3.3. Medicamentos imunossupressores.....	51
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1. Material.....	55
4.1.1. Reagentes, solventes e materiais diversos.....	55
4.1.2. Equipamentos.....	56
4.1.3. Padrões.....	56
4.2. Métodos.....	57
4.2.1. Seleção das condições cromatográficas.....	57
4.2.2. Cálculo do limite de aceitação e escolha dos padrões para Validação de Limpeza.....	58
4.2.3. Validação da metodologia analítica.....	60
4.2.3.1. Preparo de solução padrão.....	63
4.2.3.2. Preparo da amostra para teste de recuperação do método de amostragem.....	66
4.2.3.3. Preparo da curva analítica.....	67
4.2.3.4. Preparo da amostra para determinação da precisão.....	67
4.2.3.5. Preparo da amostra para determinação da exatidão.....	68
5. RESULTADOS	71
5.1. Seleção de condições cromatográficas.....	71
5.2. Cálculo do limite de aceitação para residual das substâncias...	78
5.3. Estudo do teste de recuperação da metodologia de amostragem para as substâncias estudadas.....	79

5.4. Validação da metodologia de CLAE.....	86
5.4.1. Validação da metodologia de CLAE para azatioprina.....	86
5.4.1.1. Preparo da curva analítica.....	86
5.4.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	86
5.4.1.3. Precisão.....	87
5.4.1.4. Seletividade e especificidade.....	88
5.4.1.5. Exatidão.....	88
5.4.2. Validação da metodologia de CLAE para estavudina.....	95
5.4.2.1. Preparo da curva analítica.....	95
5.4.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	95
5.4.2.3. Precisão.....	96
5.4.2.4. Seletividade e especificidade.....	97
5.4.2.5. Exatidão.....	97
5.4.3. Validação da metodologia para lamivudina e zidovudina....	105
5.4.3.1. Preparo da curva analítica.....	105
5.4.3.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	105
5.4.3.3. Precisão.....	106
5.4.3.4. Seletividade e especificidade.....	107
5.4.3.5. Exatidão.....	107
5.5. Validação do método espectrofotométrico no UV para determinação da azatioprina.....	116
5.5.1. Preparo da curva analítica.....	116
5.5.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	116
5.5.3. Precisão.....	117
5.5.4. Seletividade e especificidade.....	118
5.5.5. Exatidão.....	118
6. DISCUSSÃO.....	125
7. CONCLUSÃO.....	129
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130

LISTA DE FIGURAS

-
-
- **Figura 1.** Estrutura química dos agentes anti-retrovirais inibidores da transcriptase reversa 39
 - **Figura 2.** Linha de produção azatioprina comprimido, didanosina comprimido, lamivudina comprimido revestido, lamivudina+zidovudina comprimido revestido, zidovudina cápsula e estavudina cápsula 48
 - **Figura 3.** Estrutura química da azatioprina 54
 - **Figura 4:** Comprimentos de onda (nm) de absorção máxima para didanosina (A), estavudina (C), zidovudina (D) e lamivudina (B). 72
 - **Figura 5:** Comprimentos de onda (nm) de absorção máxima para azatioprina. 73
 - **Figura 6.** Cromatograma da solução padrão de azatioprina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água/ácido acético glacial 20:80:1, detecção a 280nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 75
 - **Figura 7.** Cromatograma da solução padrão de zidovudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 76
 - **Figura 8:** Cromatograma da solução padrão de estavudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 76
 - **Figura 9.** Cromatograma da solução padrão de lamivudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 77

- **Figura 10.** Cromatograma da solução padrão de lamivudina associada a zidovudina, nas concentrações de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 77
- **Figura 11.** Cromatograma representando o teste de recuperação para a estavudina em soluções de 10,0µg/mL, utilizando “swab” de poliéster. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 84
- **Figura 12.** Cromatograma representando o teste de recuperação para estavudina em solução de 10,0µg/mL, utilizando “swab” de algodão. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 85
- **Figura 13:** Curva analítica para azatioprina 89
- **Figura 14.** Cromatograma da solução preparada com comprimidos de 50mg de azatioprina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água/ácido acético glacial 20:80:1, detecção a 280nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 90
- **Figura 15:** Curva analítica da estavudina 98
- **Figura 16:** Cromatogramas da estavudina e da timina, em solução de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL 99
- **Figura 17.** Curva analítica da associação de lamivudina e zidovudina 108
- **Figura 18:** Cromatograma da solução preparada com comprimidos de lamivudina associada a zidovudina 150:300mg, nas concentrações de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µl 109

- **Figura 19.** Curva analítica para a azatioprina 119
- **Figura 20.** Espectros de UV para azatioprina. Condições: concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 14,0; 18,0 e 22,0 µg/mL, solvente metanol:água 20:80, cubeta de quartzo 1 cm, lâmpada de deutério 120
- **Figura 21.** Espectros de UV para azatioprina. Condições: concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 14,0; 18,0 e 22,0 µg/mL, solvente metanol:água 20:80, cubeta de quartzo 1 cm, lâmpada de deutério 120

LISTA DE TABELAS

• Tabela 1. Fator de segurança empregado no cálculo do limite de aceitação de resíduos na Validação de Limpeza	35
• Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos agentes anti-retrovirais e imunossupressores	42
• Tabela 3. Área dos equipamentos na linha de produção de azatioprina, zidovudina, estavudina, lamivudina, lamivudina+zidovudina e didanosina, considerando as partes do equipamento que entram em contato com o produto	69
• Tabela 4: Dados de menor dose terapêutica que promove efeito, maior dose diária administrada e tamanho de lote de produção das substâncias anti-retrovirais e azatioprina	70
• Tabela 5: : Esquema de obtenção das amostras para teste de recuperação	70
• Tabela 6. Parâmetros para análise das substâncias teste por CLAE	72
• Tabela 7. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para azatioprina por CLAE	73
• Tabela 8. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para zidovudina por CLAE	74
• Tabela 9. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para estavudina por CLAE	74
• Tabela 10.: Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para lamivudina por CLAE	75
• Tabela 11: Teste de recuperação da zidovudina (10,0 µg/mL), utilizando como solvente de diluição do resíduo 1,0 mL de metanol e dois tipos de “swab” (algodão e poliéster)	80
• Tabela 12. Teste de recuperação da zidovudina (10,0 µg/mL), utilizando como solvente de diluição do resíduo 2,0mL de metanol e “swab” de poliéster	81

- **Tabela 13.** Teste de recuperação de estavudina (10,0 µg/mL), utilizando ultrassom por 10 minutos 82
- **Tabela 14:** Teste de recuperação de azatioprina (10,0 µg/mL), utilizando ultrassom por 10 minutos 83
- **Tabela 15.** Resultados da curva analítica para azatioprina, com os respectivos desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) 89
- **Tabela 16.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para a azatioprina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$ 90
- **Tabela 17:** Repetibilidade do cromatógrafo líquido para soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL de azatioprina 91
- **Tabela 18.** Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de azatioprina 91
- **Tabela 19.** Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para azatioprina para cálculo da precisão entre amostras 92
- **Tabela 20.** Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com mesmo analista para amostras de azatioprina 92
- **Tabela 21.** Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para azatioprina 93
- **Tabela 22.** Resultados do teste de recuperação para solução padrão de azatioprina adicionada a amostras e analisadas por CLAE 94
- **Tabela 23.** Resultados da curva analítica para estavudina, com os respectivos apresentando desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) 98
- **Tabela 24.** Limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para a estavudina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$ 99
- **Tabela 25.** Repetibilidade do cromatógrafo líquido para amostras de 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL de estavudina 100

• Tabela 26. Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de estavudina	101
• Tabela 27. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para estavudina para cálculo da precisão entre amostras	102
• Tabela 28. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de estavudina	102
• Tabela 29. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para estavudina	103
• Tabela 30. Resultados do teste de recuperação para solução padrão de estavudina adicionado a amostras e analisados por CLAE	104
• Tabela 31. Resultados da curva analítica para lamivudina e zidovudina, apresentando desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR)	108
• Tabela 32. Limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para a lamivudina e zidovudina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$	109
• Tabela 33. Repetibilidade do cromatógrafo líquido para amostras de 10,0 µg/mL de lamivudina e zidovudina	110
• Tabela 34. Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de lamivudina e zidovudina	111
• Tabela 35. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) para cálculo da precisão entre amostras	112
• Tabela 36. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de lamivudina e zidovudina	113
• Tabela 37. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para lamivudina e zidovudina	114

- **Tabela 38.** Resultados do teste de recuperação para solução padrão de lamivudina e zidovudina adicionada a amostras e analisadas por CLAE 115
- **Tabela 39.** Resultados da curva analítica para azatioprina, com desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) entre três curvas de calibração 119
- **Tabela 40.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para azatioprina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$. 121
- **Tabela 41.** Repetibilidade do método espectrofotométrico no UV para soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL de azatioprina 121
- **Tabela 42.** Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para azatioprina para cálculo da precisão entre amostras 122
- **Tabela 43.** Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de azatioprina 122
- **Tabela 44.** Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para azatioprina 123
- **Tabela 45.** Resultados de teste de recuperação para solução padrão de azatioprina adicionado a amostras e analisados por espectrometria do UV 124

LISTA DE ABREVIATURAS

BPFM – Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
PMV – Plano Mestre de Validação
QI - Qualificação de Instalação
QO - Qualificação de Operação
POP- Procedimento Operacional Padrão
FDA – Food and Drug Administration
CIP - Limpeza automatizada ou “Cleanning in place”
MA - máximo de resíduo aceitável
ADI - dose aceitável
BL - menor tamanho de lote a ser produzido
R - maior dose diária administrada para um produto
NOEL - nível com efeito
.f - fator de segurança
LD - maior dose diária administrada do produto subsequente
DT- menor dose terapêutica unitária
.fr - fator de recuperação
AT - área total da linha de produção em estudo
A – área de amostragem
SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
AZT- zidovudina
ddI - didanosina
3TC - lamivudina
d4T - estavudina
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RESUMO

A Validação de Limpeza é um requisito das Boas Práticas de Fabricação, podendo ser definida como o ato documentado que atesta que qualquer procedimento de limpeza conduzem aos resultados esperados.

Alguns dos pré-requisitos fundamentais para validação de limpeza de uma linha de produção são: definição das etapas do processo produtivo; especificação dos insumos utilizados na produção; definição dos pontos críticos de processo; qualificação dos equipamentos da linha de produção; definição dos agentes de limpeza a serem utilizados e validação da metodologia analítica e de amostragem.

A validação da metodologia analítica e de amostragem utilizada na análise de resíduos presentes em equipamentos de produção é um dos primeiros passos para a validação de limpeza, pois garante a correta definição de agentes de limpeza e procedimentos adotados.

O método de amostragem direta da superfície é o mais empregado para análise de resíduos, realizado pelo esfregaço com “swab” em área pré-estabelecida da superfície do equipamento que entra em contato com o produto. Após a amostragem, o resíduo é removido e analisado por metodologias analíticas específica como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), e metodologias não-específicas, como a análise de carbono orgânico total (COT).

A Validação de Limpeza torna-se ainda mais crítica quando são envolvidos produtos que apresentem alto risco a saúde, que mesmo em quantidades residuais podem exibir alta atividade farmacológica, gerando efeitos adversos graves. Produtos como os antiretrovirais, imunossupressores e outros que são utilizados no tratamento de doenças crônicas e de difícil controle são extremamente críticos se considerados como possíveis resíduos em outros produtos.

ABSTRACT

The Cleaning Validation is a requirement of the Good Manufacture Practices, defined as the registered act that certifies that any procedure of cleanness leads to the aimed results. Some of the requirements for cleaning validation of a production line are: definition of the stages of the productive process; specification of the materials used in the production process; definition of the critical points of the process; qualification of the equipment of the production line; definition of the agents of cleaning to be used; validation of analytical methodology and sampling process. The validation of the analytical methodology and sampling used in the analysis of residues in production equipment is one of the first steps to be considered in the cleaning validation, therefore it guarantees the correct selection of cleaning agents and adopted procedures.

The method of direct sampling from the surface is used for analysis of residues, carried out by using a "swab" on the surface area of the equipment that is in direct contact with the product. After the sampling, the residue is removed and analyzed by specific analytical methodologies such as high performance liquid chromatography (HPLC), high performance thin layer chromatography (HPTLC), total organic carbon analysis (TOC). The Cleaning Validation becomes still more critical when high risk products are involved. That is the cause of residues with high pharmacological activity, generating serious adverse effects, such as products like anti-retrovirals, immunosuppressants and others that are used in the treatment of chronic illnesses. The control of these substances are extremely critical if they are considered as possible contaminants in other products.

1. INTRODUÇÃO

A Validação de Limpeza estuda e controla os procedimentos de limpeza, pretendendo assegurar que equipamentos utilizados durante o processo produtivo, não se tornem uma fonte de contaminação dos produtos farmacêuticos.

Os pontos críticos da Validação de Limpeza são a definição dos agentes de limpeza e procedimentos adotados, a amostragem, a metodologia analítica e determinação dos critérios de aceitação para resíduos de produtos e agentes de limpeza utilizados. A correta avaliação dos pontos críticos é fundamental para garantir a qualidade e segurança dos produtos farmacêuticos.

Os agentes de limpeza devem ser eficientes na remoção dos resíduos de produtos e serem seguros, garantindo a eficácia do procedimento de limpeza.

As metodologias de amostragem e análise dos residuais devem ser validadas e possuir especificidade e sensibilidade adequadas. A amostragem dos residuais é realizada com “swab” ou água de enxágue dos equipamentos. A metodologia por “swab” deve possuir estudo detalhado de porcentagem de recuperação da amostragem ou “recovery”, garantindo que os residuais existentes possam ser detectados.

As metodologias analíticas empregadas devem ser práticas e sensíveis aos critérios de aceitação estipulados, sendo normalmente adotadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), e metodologias não-específicas, como a análise de carbono orgânico total (COT).

Independente da metodologia adotada, os estudos preliminares devem comprovar sua adequação aos critérios de aceitação, baseados nos cálculos de limite de contaminação permitidos.

A produção e as operações de limpeza envolvidas nos processos produtivos de medicamentos com alta atividade farmacológica devem seguir critérios rígidos de Boas Práticas de Fabricação, dentre estes a Validação de Limpeza proporciona a segurança para os pacientes e para o pessoal envolvido na produção.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O projeto de pesquisa pretende estudar os pontos críticos de Validação de Limpeza adotados para uma Planta de Sólidos Orais, que produz medicamentos de alta atividade farmacológica.

Os produtos citados, além de fatores de risco grave, se envolvida a contaminação cruzada, dão origem a produtos de degradação de maior toxicidade, em decorrência dos procedimentos de limpeza.

Os objetivos principais da pesquisa são: padronizar os procedimentos de limpeza e desinfecção das áreas produtivas e validar metodologias de amostragem e métodos analíticos, para verificar a eficiência dos processos de limpeza.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Validação de Limpeza

Em 04 de agosto de 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a Resolução RDC nº 210/03, que estabelece as normas de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM), com o objetivo de assegurar a qualidade dos produtos na Indústria Farmacêutica.

Um dos critérios da BPFM é a Validação de Limpeza, estabelecida como ato documentado para atestar que os procedimentos de limpeza conduzem aos resultados esperados pela Garantia da Qualidade.

Alguns dos pré-requisitos fundamentais para validação de limpeza de uma linha de produção são: definição das etapas do processo produtivo; especificação dos insumos utilizados na produção; definição dos pontos críticos de processo; qualificação dos equipamentos da linha de produção;

definição dos agentes de limpeza a serem utilizados e validação da metodologia analítica e de amostragem.

Segundo a RDC nº 210/03 o termo validação é definido como o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados, considerando que todos os processos críticos devem ser validados concorrente, prospectiva ou retrospectivamente. (BRASIL, 2003)

A validação prospectiva é baseada na execução de testes que demonstram que um novo processo ou equipamento, está de acordo com especificações operacionais e de desempenho. Essa validação é realizada durante o desenvolvimento de um novo produto ou instalação de novos equipamentos, para eliminar erros que possam ocorrer na produção industrial. (BRASIL, 2003)

A validação concorrente é realizada durante a produção de rotina, garantindo que os primeiros lotes de produção industrial sejam avaliados abrangentemente, de acordo com testes e especificações estabelecidas. (BRASIL, 2003)

A validação retrospectiva é baseada na revisão e avaliação de registros de lotes ou processos anteriormente executados, atestando que um processo satisfaz as especificações funcionais e de desempenho. (BRASIL, 2003)

Nos processos de produção de medicamentos e de princípios ativos farmacêuticos, todas as etapas que afetam direta ou indiretamente a qualidade dos produtos devem ser qualificadas e validadas.

O programa de qualificação e validação deve ser documentado no Plano Mestre de Validação (PMV), um documento que descreve a política de validação, tornando claros os padrões para todas as operações, equipamentos, sistemas e utilidades que estão envolvidas no processo produtivo (PIC,1996: BRASIL,2003).

Antes do início da validação deve ser realizada uma análise da documentação do processo produtivo, incluindo a avaliação dos parâmetros e pontos críticos, que serão testados frente a especificações estabelecidas. A partir deste estudo é elaborada a documentação que será utilizada para validar os processos, denominada Protocolo de Validação. (OMS,2001; PIC,1996).

O protocolo de validação deve descrever as etapas do processo a ser validado, apresentar os pontos críticos de controle, os riscos e ações corretivas, bem como os testes, verificações e critérios de aceitação a serem adotados ao longo da validação. Este protocolo deve ser revisado e devidamente aprovado pelos responsáveis.

A execução da validação é realizada acompanhando-se três processos consecutivos, onde todos os parâmetros de trabalho, divergências e ocorrências durante a realização dos testes são registrados. Após a execução da validação, os dados são avaliados e é elaborado um Relatório

Final de Validação, que conterà as conclusões sobre a validação do processo.

Um processo validado deve ser monitorado periodicamente e revalidado a intervalos pré-estabelecidos ou quando ocorrerem mudanças que possam interferir na qualidade do produto, como por exemplo, a substituição de um equipamento da linha de produção.

Para uma validação de limpeza bem sucedida é necessário o amplo conhecimentos de todos os equipamentos a serem utilizados, principalmente no que se refere a material de construção e dimensional de componentes e peças que entram em contato com o produto.

Os equipamentos da linha de produção devem ser construídos de modo a facilitar a limpeza e permitir inspeção visual, das partes críticas do equipamento. Estes dados podem ser levantados durante a execução da qualificação (HPFB, 2003).

O termo qualificação é empregado para todos os testes realizados em equipamentos e sistemas, onde serão determinados os atributos relacionados ao desempenho adequado de suas funções e os parâmetros a serem utilizados para controle da sua operação. A qualificação está subdividida em: Qualificação de Instalação (QI), Qualificação de Operação (QO) e Qualificação de Desempenho (OMS,2001; PIC,1996; BRASIL,2003).

A Qualificação de Instalação engloba a documentação proveniente dos testes, que verificam se o equipamento foi corretamente instalado e funciona de acordo com o plano de instalação recomendado pelo fornecedor

do equipamento. Nos testes são verificados os requisitos de calibração, manutenção e limpeza (OMS, 2001; PIC, 1996).

A Qualificação de Operação documenta os testes referentes a correta operação do equipamento ou sistema, de acordo com um procedimento operacional padrão (POP) e os pontos críticos de controle, caso ocorram eventuais alterações (OMS, 2001; PIC, 1996).

A Qualificação de Desempenho avalia a funcionalidade do equipamento, desafiando o sistema a responder contra situações de controle.

Os equipamentos devem ser criteriosamente avaliados, pois na maioria das indústrias farmacêuticas, um único produto pode entrar em contato com diversos equipamentos de uma linha de produção, que podem ou não ser dedicadas a este produto.

Os equipamentos dedicados à fabricação de um determinado produto reduzem os riscos de contaminação, no entanto, sua limpeza não é menos importante e também deve ser validada. Por outro lado, a validação de limpeza de equipamentos não dedicados é mais crítica, pois inúmeros fatores podem promover a contaminação do produto. (AGALLOCO, 1998)

Após a validação de um processo todos os critérios estabelecidos devem ser monitorados. Alterações no processo devem gerar um estudo do impacto à qualidade final do processo, aquelas julgadas críticas são documentadas pelo Controle de Mudança, que estabelece as ações necessárias, inclusive a revalidação do processo. A revalidação deve

evidenciar que a alteração do processo não afeta diretamente a especificação estabelecida (PIC, 1996; EUROPEAN COMMISSION, 2001).

Neste contexto, os procedimentos de limpeza vem sendo inspecionados pelas agências reguladoras, devido a casos de contaminação cruzada relatados no passado.

Em 1988, o “Food and Drug Administration” (FDA) aumentou suas exigências no controle de contaminação, quando um lote de resina utilizada para processos farmacêuticos foi contaminado por resíduos de pesticidas agrícolas (FDA, 2003).

A validação de limpeza é parte integrante da Garantia de Qualidade que engloba todas as ações para garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade adotados, sendo seguros e eficazes para aplicação na terapêutica.

O objetivo da validação de limpeza é provar a eficiência do procedimento de limpeza na remoção de resíduos de produtos e excipientes, produtos de degradação e agentes de limpeza, através de monitoramento analítico, demonstrando que não há risco de contaminação-cruzada (HPFB, 2003).

Os resíduos e contaminantes podem ser originados de diversas maneiras durante o processo de produção. Estes resíduos podem ser provenientes de equipamentos da linha produtiva, do pessoal, dos produtos de degradação ou de resíduos dos procedimentos de limpeza.

Os contaminantes que atingem os produtos farmacêuticos podem ser divididos em três categorias: contaminantes químicos, físicos e microbiológicos.

Contaminantes químicos são representados por substâncias provenientes de produtos anteriormente manipulados, resíduos de agentes de limpeza, lubrificantes e óleos de máquinas e demais produtos químicos que possam acidentalmente contaminar o produto. A contaminação por resíduos provenientes de produtos anteriormente processados é denominada de contaminação-cruzada.

Contaminantes físicos (poeira e partículas inertes) e contaminantes microbiológicos (bactérias, fungos e vírus) podem ser provenientes do ar, água utilizada na limpeza e dos próprios operadores dos equipamentos.

A contaminação microbiológica deve ser monitorada para produtos com maior risco de contaminação, estabelecendo procedimentos de desinfecção adequados.

O mecanismo da limpeza é definido como a remoção de resíduos e contaminantes, através da ação mecânica, dissolução, detergência ou de reações químicas.

Os procedimentos de limpeza utilizados devem ser avaliados para se estabelecer o melhor método de realização da limpeza, sua reprodutibilidade e a melhor forma de amostragem e monitoramento dos possíveis resíduos. Os procedimentos de limpeza podem ser subdivididos em: manual, semi-automático e automático.

O procedimento automatizado de limpeza é utilizado normalmente para equipamentos de sistema fechado, como tanques de manipulação de líquidos, sistema de produção de granulados e injetáveis. Para equipamentos grandes e fixos o sistema é CIP ("Cleaning in place"), sistema que realiza a limpeza e desinfecção do equipamento no local de uso. Como os equipamentos móveis são removidos para áreas de lavagem, o sistema automatizado é denominado WIP ("Washing in place") (AGALLOCO, 1998).

A maior vantagem deste método é o estreito controle de quantidades de agentes de limpeza e sequência do processo utilizado. Contudo, durante a validação de limpeza pontos críticos, como sensores e alarmes devem ser avaliados para demonstrar sua correta operação, evidenciando que o sistema está sob controle (HPFB, 200; SCHIFFMANN, 2001).

O processo manual de limpeza é o mais utilizado na indústria farmacêutica, portanto o pessoal envolvido está diretamente responsável pela eficiência da operação. Assim sendo, o treinamento adotado deve ser contínuo para padronizar as rotinas, o uso correto da inspeção visual do equipamento e o acompanhamento de possíveis mudanças ou melhorias.

Independente do processo adotado, os agentes de limpeza não podem ser corrosivos aos equipamentos, devem ser atóxicos, facilmente solúveis em água, solubilizando ou suspendendo os resíduos, apresentando rápida remoção (BISMUTH, 1999; WESTMAN, 2000).

Os agentes de limpeza, tais como detergentes e desinfetantes, possuem composição variada, contendo uma série de tensoativos e outros componentes que devem ser removidos dos equipamentos e analisados durante a validação de limpeza (WESTMAN, 2000).

Portanto, a operação de limpeza deve ser padronizada, segura, eficaz e de fácil execução, otimizando e não agregando tempo à produção, sendo eficiente para remoção dos possíveis contaminantes.

Vários são os parâmetros que interferem na eficiência e padronização do procedimento de limpeza, como: equipamentos, agentes de limpeza, pessoal, operação de limpeza e tempos envolvidos, métodos de amostragem e análise dos resíduos.

Durante a validação de limpeza devem ser observados os seguintes tópicos :

- Verificação do equipamento quanto ao material de construção, vedação e partes que oferecem maior risco de contaminação.
 - Padronização do procedimento e do agente de limpeza.
 - Verificação dos resíduos de produtos químicos e microbiológicos deixados após a limpeza.
 - Tipo de limpeza utilizado, se manual ou automática.
 - Cuidados específicos para cada produto.
 - Tempo que o equipamento pode ser considerado limpo.
-

O monitoramento dos resíduos químicos é de grande importância, principalmente quando estão envolvidos produtos com alta atividade farmacológica e alta toxicidade. Os resíduos normalmente são analisados nas partes dos equipamentos que entram em contato com o produto, embora partes que não tenham contato devam ser estudadas quanto ao risco de contaminação que oferecem (HPFB, 2003).

Os resíduos químicos que podem contaminar um produto farmacêutico são lubrificantes, graxas, agentes de limpeza e desinfecção, outros produtos anteriormente fabricados. A análise de resíduos químicos pode ser realizada por métodos de amostragem diretos e indiretos da superfície dos equipamentos.

Os métodos de amostragem de superfície utilizados (FDA, 2003; HPFB, 2003) são:

- Amostragem direta da superfície do equipamento, pela técnica do esfregaço com “swab” em área pré-estabelecida. O “swab” também é conhecido como zaragatoa.
 - Amostragem indireta da superfície, pela técnica de Água de enxágue, principalmente utilizada em locais de difícil acesso e sistemas fechados.
 - Amostragem de placebo, que é produzido nos equipamentos em estudo e, posteriormente analisado.
-

Nozal e colaboradores (NOZAL, 2000; NOZAL, 2002; NOZAL, 2004) utilizaram a metodologia de amostragem com “swab” para realizar a análise de resíduos de lacidipina em equipamentos da área de produção, padronizando a utilização de dois “swabs” de algodão para amostragem das superfícies dos equipamentos. Anteriormente, o mesmo grupo validou uma metodologia de amostragem, também com utilização de dois “swab” de algodão para validar a amostragem de resíduos de sumatriptano e ácido acetilsalicílico em equipamentos de produção.

Mirza e colaboradores (MIRZA, 1999) utilizaram a amostragem com “swab” para validar a limpeza de equipamentos de produção de hidrocloreto de meclizina, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência para análise das amostras, a qual demonstrou boa precisão e exatidão para análise de quantidades residuais do composto.

Os métodos de análise e amostragem escolhidos devem ser validados e possuir recuperação adequada para favorecer a análise dos resíduos.

São inúmeras as metodologias de análise disponíveis para a determinação de resíduos de produtos farmacêuticos, sendo a mais utilizada a metodologia por CLAE, contudo métodos mais rápidos e de menor custo também podem ser utilizados.

O desenvolvimento destas metodologias de análise de resíduos vem sendo bastante estudado na atualidade. Klinkenberg (KLINKENBERG, 2003) validou a análise de resíduos de amlodipina utilizando a CLAE. A

metodologia demonstrou seletividade, precisão e exatidão para valores de resíduos de $0,76\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de amlodipina.

Katona e colaboradores (KATONA, 2000) validaram a análise para resíduos de cinco diferentes hormônios esteróides, em equipamentos de uma planta industrial. A metodologia analítica utilizada foi a cromatografia em camada delgada com sobrepressão, que apresentou sensibilidade semelhante à metodologia por CLAE, sendo uma alternativa de menor custo e tempo reduzido de análise.

Em Cuba, um grupo de pesquisa comparou dois métodos analíticos para resíduos de água de enxágue de reatores industriais. Foi demonstrado que a cromatografia em camada delgada não é capaz de detectar concentrações menores que $250,0\text{ mg/L}$ de resíduo do produto estudado e comparativamente a associação da análise de pH e condutividade da solução estudada permitiu uma análise rápida e apropriada para verificação da limpeza dos reatores (VALENTIN, 2001).

Vovk e colaboradores (VOVK, 1999) utilizaram a cromatografia em camada delgada de alta eficiência para análise de resíduos de norfloxacin em equipamentos de produção, a metodologia apresentou precisão e seletividade, apresentando limite de detecção de $2,0\mu\text{g}$ de norfloxacin.

Antes da amostragem para análise residual ser realizada é recomendada inspeção visual no equipamento, para liberação para a amostragem e análise de resíduos.

O limite aceitável de resíduo nos equipamentos não é estabelecido nas normas atuais. O FDA cita que o limite deve ser baseado em critérios lógicos, envolvendo o estudo do risco oferecido pelo resíduo de um determinado produto.

O cálculo do limite de aceitação para resíduos de produtos ativos em equipamentos de produção deve ser baseado em critérios como: dose terapêutica, potência farmacológica e toxicidade, existindo várias fórmulas matemáticas que podem ser empregadas com tal finalidade (BISMUTH, 1999).

A fórmula para máximo de resíduo aceitável (MA) que considera a toxicidade (Equação 1) é empregada multiplicando-se a ADI (dose aceitável) por BL, que representa o menor tamanho de lote que poderá ser produzido subsequentemente e dividindo por R, que representa a maior dose diária administrada para o produto subsequente. A ADI é obtida multiplicando-se o índice NOEL (nível com efeito) pelo peso médio de um adulto (W) e pelo fator de segurança (f) (Equação 2). O índice NOEL (Equação 3) representa a multiplicação da DL_{50} por um fator empírico, obtido do modelo animal de Layton e colaboradores (BISMUTH, 1999). O fator de segurança é um valor empírico apresentado na *Tabela 1*.

$$MA = \frac{ADI \times BL}{R} \quad (\text{Equação 1})$$

$$ADI = NOEL \times W \times f \quad (\text{Equação 2})$$

$$NOEL = DL_{50} \times \text{fator empírico} \quad (\text{Equação 3})$$

Tabela 1. Fator de segurança empregado no cálculo do limite de aceitação de resíduos na Validação de Limpeza.

Fator de segurança (f)	Forma de administração do produto
1/10 a 1/100 da dose diária	Produto tópico
1/100 a 1/1.000 da dose diária	Produtos orais
1/1.000 a 1/10.000 da dose diária	Produtos injetáveis e oftálmicos
1/10.000 a 1/100.000 da dose diária	Produtos laboratoriais

Também pode ser utilizada para cálculo do MA a dose terapêutica do produto (Equação 4), onde é multiplicada a menor dose terapêutica unitária (DT) pelo menor tamanho de lote produzido (B) e pelo fator de segurança (f) da *Tabela 1*, sendo dividido pela maior dose diária administrada do produto subsequente (LD).

$$MA = \frac{DT \times B \times f}{LD} \quad (\text{Equação 4})$$

O limite de aceitação é então calculado, multiplicando-se a MA pela área de amostragem (A) e pelo fator de recuperação (fr) do método de amostragem, dividindo-se pela área total da linha de produção em estudo (AT) (Equação 5).

$$LA = \frac{MA \times A \times fr}{AT} \quad (\text{Equação 5})$$

Como a maioria dos procedimentos de limpeza é padrão para uma série de produtos, podem ser agrupados em classes terapêuticas, utilizando para a validação o produto mais crítico (PIC, 1996).

O PIC recomenda, além disto, outros quatro critérios gerais:

1. Não mais do que 0,1% da dose terapêutica normal de um produto pode ser encontrado na maior dose terapêutica do produto subsequente.
-

2. Não mais do que 10 ppm de um produto em outro
3. Para determinação visual da limpeza, deve ser estabelecido o residual, por meio do qual o equipamento pode ser considerado como visualmente limpo.
4. Para produtos alergênicos, penicilínicos, esteróides e citotóxicos o limite deve ser o limite de detecção do método mais sensível disponível para análise. Ou então, devem ser utilizados equipamentos de produção dedicados a obtenção de um único produto.

O procedimento de limpeza é considerado validado quando três processos consecutivos apresentarem resultados satisfatórios. A revalidação deve ser aplicada em intervalos periódicos e sempre que ocorrerem mudanças, considerando que processos manuais são revalidados com periodicidade maior do que processos automatizados. Os testes executados serão documentados no Protocolo de Validação de Limpeza de cada processo (PIC, 1996).

A Validação de Limpeza torna-se ainda mais crítica quando são envolvidos produtos que apresentem alto risco a saúde, mesmo em quantidades residuais, por exibirem alta atividade farmacológica, gerando efeitos adversos graves. Produtos como os antiretrovirais, imunossuppressores e outros que são utilizados no tratamento de doenças crônicas e de difícil controle são extremamente críticos se considerados como possíveis resíduos em outros produtos.

Geralmente, os produtos de alta atividade farmacológica demandam áreas produtivas de maior custo, devido aos inúmeros riscos envolvidos na exposição ocupacional e de áreas adjacentes. Assim, muitos laboratórios farmacêuticos utilizam a mesma área produtiva para fabricar uma determinada linha de produtos (MOSER, 2000).

A produção em campanha é regulamentada pela ANVISA e vem sendo aceita para produção de medicamentos de interesse para saúde pública, como por exemplo, a produção em campanhas alternadas de medicamentos antiretrovirais e imunossupressores.

Neste contexto, a produção e operações de limpeza envolvidas nos processos de medicamentos de alta atividade farmacológica devem seguir critérios rígidos de Boas Práticas de Fabricação, dentre estes a Validação de Limpeza é crítica para segurança de pacientes e do pessoal envolvido na produção.

3.2. Medicamentos antiretrovirais

Os medicamentos antiretrovirais podem ser considerados produtos de alta atividade farmacológica, pois apresentam toxicidade elevada em comparação, por exemplo, a medicamentos quimioterápicos.

No Brasil, os agentes antiretrovirais mais utilizados para tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e profilaxia de infecções pelo vírus HIV são classificados como os inibidores da transcriptase reversa: zidovudina, estavudina, didanosina e lamivudina e suas associações, apresentados na *Figura 1* (WILLIAMS, 2002).

Figura 1. Estrutura química dos agentes antiretrovirais inibidores da transcriptase reversa

As reações de toxicidade de médio e longo prazo associadas aos inibidores da transcriptase reversa são ligadas a inibição secundária da enzima mitocondrial γ -polimerase, envolvida na síntese de enzimas formadoras de ATP. Dentre as reações observadas podem ser destacadas: miopatia (zidovudina), neuropatia (estavudina e didanosina), esteatose hepática e acidose láctica (zidovudina, estavudina e didanosina) e pancreatite (didanosina) (CARR, 2000; LAPOINTE, 2000).

A hipersensibilidade é observada em pacientes que utilizam os agentes antiretrovirais, destacando-se principalmente as manifestações eritomatosas, prurido, inchaço papilar com ou sem febre. Tais sintomas podem ser observados com uma a três semanas de terapia. A hipersensibilidade observada em pacientes aidéticos tratados com antiretrovirais é 100 vezes maior do que a observada na população em geral (CARR, 2000).

A lipodistrofia também está associada à terapia com medicamentos antiretrovirais. Embora o mecanismo correto desta reação ainda não seja conhecido, acredita-se que os medicamentos inibidores da transcriptase reversa podem levar à síndrome devido a sua toxicidade mitocondrial. A lipodistrofia é apresentada como excessiva perda de peso periférico (face, membros superiores e inferiores), acúmulo de gordura na região central (intra-abdominal) e diversas alterações metabólicas (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, resistência a insulina e Diabetes Mellitus tipo II) (CARR, 2000; HOBBS, 1995).

A zidovudina, azidotimina, AZT ou 3'azido-3'dioxitimina, foi o primeiro fármaco aprovado pelo FDA para tratamento de SIDA. Este composto é um análogo da timidina, considerado um importante precursor quimioterápico para combate do HIV (HOBBS,1995).

A zidovudina foi descoberta a partir de propriedades identificadas em nucleosídeos de algas marinhas. O laboratório Wellcome® desenvolvia um programa de avaliação das propriedades antivirais de nucleosídeos naturais de fontes marinhas visando o tratamento de Herpes. Com a descoberta do HIV a substância foi reavaliada, em 1986, e apresentou atividade frente a transcriptase reversa do vírus (AIDS, 2003). A dose usual é de 500 a 600 mg/dia em duas a seis doses ou 1000 mg/dia em duas doses. Para crianças a dose é de 2 mg/kg de seis em seis horas (PAPATEODORIDIS,2004). As características físico-químicas do AZT estão descritas na *Tabela 2*.

Quando atinge as células, o AZT é fosforilado por enzimas celulares. A forma fosforilada pode ser incorporada ao DNA viral interrompendo sua síntese por inibir a ação da transcriptase reversa viral.

Os efeitos adversos apresentados pelo AZT são anemia e leucopenia que ocorrem após poucas semanas após o início do tratamento, ocorrendo frequentemente astenia, insônia, miopatia, anorexia, dispneia, náusea e vômito (PAPATEODORIDIS, 2004; RACHLIS, 1996). A toxicidade hematopoiética associada à utilização de zidovudina é um dos principais agravantes da anemia, estando associada a sua toxicidade e interferência na síntese de DNA (GOGU, 1996).

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos agentes antiretrovirais e imunossupressores (MERCK,1996; KASHUBA,1999)

Substância	Fórmula / PM	Solubilidade	pka	Absorção UV
ZIDOVUDINA	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ PM 267,24	25mg/mL de água a 25°C	9,7	266 nm
ESTAVUDINA	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ PM 224,2	83mg/mL de água a 25°C	10,0	266 nm
LAMIVUDINA	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S PM 229,26	70mg/mL de água a 25°C	4,3	266 nm
DIDANOSINA	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃ PM 236,23	27,3mg/mL de água a 25°C	9,1	254 nm
AZATIOPRINA	C ₉ H ₇ N ₇ O ₂ S PM 277,26	Fracamente solúvel em água e etanol	8,2	280 nm

A estavudina (d4T) foi aprovada pelo FDA em 1994 sendo largamente empregada em associação a outros agentes antiretrovirais. É um análogo da timina que intracelularmente se converte no derivado trifosfato, inibindo competitivamente a transcriptase reversa, pela incorporação ao DNA viral. Dentre os efeitos adversos estão a neuropatia periferal, pancreatite, astenia, reações de hipersensibilidade, trombocitopenia, dispneia e mialgia (PAPATEODORIDIS,2004).

A posologia durante o tratamento com d4T varia de 40 mg a cada 12 horas, para pacientes de 60 kg, 30 mg a cada 12 horas, para pacientes com menos de 60 kg, e para crianças acima de 3 meses e com menos de 30 kg, em 1 mg /kg a cada 12 horas (PAPATEODORIDIS,2004).

A lamivudina (3TC) é um agente anti-retroviral análogo da citidina, com estrutura similar a zalcitabina (2',3'-dideoxycitidina), diferenciada pela presença de um grupo sulfuroso ligado ao carbono 3' do anel de ribose. Foi aprovada pelo FDA, em 1995, para uso como agente anti-retroviral no tratamento das infecções por HIV em adultos e crianças. A maioria dos tratamentos é empregada em associação com três ou quatro outros agentes, principalmente com a zidovudina (TOXNET,2003; NASCIMENTO,2004).

A 3TC é rapidamente absorvida por via oral, com biodisponibilidade de 86% em adultos, não apresentando alteração de absorção na presença de alimentos. Possui baixa ligação com proteínas plasmáticas; aproximadamente 12 horas após dose oral é eliminada na urina na forma do metabólito transulfóxido (TOXNET, 2003; NASCIMENTO, 2004).

A dose usual é de 150 mg duas vezes ao dia e para crianças de três meses a doze anos, de 4mg/kg duas vezes ao dia (máximo de 300mg/dia) (PAPATEODORIDIS, 2004).

No ambiente intracelular a lamivudina é fosforilada em sua forma ativa, o 5'-trifosfato, competindo com os nucleosídeos pela transcriptase reversa viral. Quando ocorre a ligação da lamivudina ao DNA viral é

bloqueada a terminação 3' da ligação fosfodiéster impedindo que a transcriptase reversa atue novamente (TOXNET,2003).

Em pacientes com distúrbios renais foi observado uma diminuição da função renal, relacionada a um decréscimo da creatinina, fato este que sugere a utilização do teste de creatinina para acompanhamento ocupacional em fabricantes do produto. Além da administração no tratamento da SIDA, a 3TC também é licenciada para tratamento da hepatite B crônica, induzindo uma diminuição inicial do vírus em 70 a 90% dos pacientes (PAPATEODORIDIS, 2004).

Dentre os efeitos adversos observados com a 3TC estão a acidose, pancreatites, náusea, vômito, diarreia, insônia e, raramente, neuropatia e pancreatite (PAPATEODORIDIS, 2004).

A didanosina ou dideoxiinosina (ddI) é um análogo de uma purina-dideoxinucleosídeo sintética. É rapidamente absorvida via oral e quando atinge a célula alvo é fosforilada dando origem à dideoxiadenosina, inibindo a transcriptase reversa viral, agindo como os demais inibidores da transcriptase reversa. A dose usual administrada para adultos é de 300 mg a cada 12 horas e para crianças, de 200mg/m² a cada 12 horas.

Os principais efeitos adversos observados com a terapia com didanosina são a neuropatia periférica, pancreatite, cefaléia e distúrbios gastrointestinais. Também são observados outros efeitos como, insônia, depressão da medula óssea, erupções cutâneas e distúrbios hepáticos.

Em indivíduos submetidos à exposição ocupacional aos antiretrovirais podem aparecer reações adversas severas, como: anemia, neutropenia e leucopenia, além da possibilidade de atravessarem a placenta e atingirem o feto em concentrações similares às observadas nos adultos.

Recentemente, a exposição ocupacional nas indústrias farmacêuticas e químicas tem sido estudada, contudo a literatura é limitada devido a dificuldades na realização destes estudos e na exposição dos funcionários destas instituições a vários agentes simultaneamente (GODDA, 2003).

A escala de toxicidade para estes inibidores pode ser relacionada a sua interferência na DNApolimerase mitocondrial levando a uma sequência onde a estavudina é a mais ativa, seguida da didanosina, da lamivudina e da zidovudina, que apresenta a menor toxicidade (LEE,2003).

O Brasil tem, aproximadamente, 600 mil portadores do vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que apresenta como agente etiológico o vírus HIV. Em média, a pessoa infectada pelo HIV demora entre 8 e 10 anos para começar a desenvolver os sintomas. Só então ela é notificada como um novo caso. Outro dado não menos preocupante é a crescente incidência da SIDA em relação à faixa etária de 13 a 19 anos em adolescentes do sexo feminino. Tal fato é explicado pelo início precoce da atividade sexual em relação aos adolescentes do sexo masculino (AIDS, 2003).

Quanto às principais categorias de transmissão entre os homens, as relações sexuais respondem por 58% dos casos de SIDA, com maior

prevalência nas relações heterossexuais. Já entre as mulheres, a transmissão do HIV se dá, predominantemente, pela via sexual, 86,2%. As demais formas de transmissão, em ambos os sexos, de menor peso na epidemia, são: transfusão, transmissão materno-infantil, inoculação parenteral ou por causas ainda ignoradas pelos pacientes (AIDS, 2003).

Os antiretrovirais são administrados a cada paciente por quatro anos em média, contendo três dos agentes antiretrovirais em associação. Atualmente, laboratórios farmacêuticos vinculados ao Governo tem fabricado e distribuído os medicamentos antiretrovirais gratuitamente à população, sendo os inibidores da transcriptase reversa os mais produzidos (AIDS ,2003).

Os agentes antiretrovirais produzidos industrialmente, no Brasil, são fabricados principalmente em formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas, comprimidos e comprimidos revestidos. Outras formas farmacêuticas, como soluções, suspensões e injetáveis são produzidas em menor escala.

O processo industrial de produção dos diferentes agentes antiretrovirais em formas farmacêuticas sólidas é extremamente semelhante, sendo basicamente utilizados a compressão por via seca, especificamente a compressão direta, e o encapsulamento. O fluxograma do processo de produção é apresentado na Figura 2.

O processo de produção é iniciado pela pesagem das matérias-primas que serão utilizadas. Normalmente, as indústrias farmacêuticas possuem uma central de pesagem e separação de insumos segregada da

área de produção. Nesta área, há necessidade da realização da validação de limpeza se as cabines de pesagem não forem dedicadas ao produto.

Quando o material fracionado é enviado à área de produção é realizada uma dupla conferência de todos os volumes pesados, evitando possíveis desvios de quantidade ou mesmo troca de insumos.

Alguns laboratórios farmacêuticos tamisam previamente cada matéria-prima, visando à homogeneização da granulometria dos pós e remoção de possíveis impurezas. Neste processo é utilizada uma peneira vibratória montada com malha de tamanho determinado, que facilita a tamisação de grande quantidade de insumos.

O processo de produção por compressão direta é largamente empregado devido à alta produtividade das compressoras, à facilidade de manipulação do produto e ao baixo risco de degradação dos fármacos.

Na compressão direta as matérias-primas (excipientes e ativo) que compõem o produto são adicionadas a um misturador e homogeneizadas por velocidade e tempo especificados. Os misturadores podem ser fixos, como o misturador em V, ou móveis como os misturadores cônicos, também conhecidos como “bins”.

A utilização de misturadores fixos é um agravante para a validação da limpeza, pois o mesmo misturador é utilizado para manipulação de diferentes produtos, aumentando o risco de contaminação-cruzada. Por outro lado, os misturadores “bins” podem ser dedicados para cada produto, devido a sua alta versatilidade operacional, minimizando os riscos de contaminação.

Figura 2. Linha de produção azatioprina comprimido, didanosina comprimido, lamivudina comprimido revestido, lamivudina+zidovudina comprimido revestido, zidovudina cápsula e estavudina cápsula

O processo de compressão pode ser realizado em sistemas fechados ou sistemas abertos. Nos sistemas fechados as compressoras são abastecidas com os pós através de dutos. Normalmente são utilizados dois pisos da fábrica para favorecer o abastecimento por gravidade, ou sistemas a vácuo fechados.

Nos sistemas abertos a dispersão de pó na área de produção é maior, pois parte do pó é disseminada no ambiente. As compressoras podem ser abastecidas tanto manualmente como através de sistemas a vácuo, dependendo da capacidade produtiva da máquina.

Os comprimidos produzidos podem ser embalados ou enviados para o revestimento.

Durante a validação de limpeza o processo utilizado na compressão e manipulação deve ser cuidadosamente avaliado, para verificação dos riscos de contaminação para o produto subsequente.

A compressão direta é utilizada para produtos como: didanosina comprimidos mastigáveis, lamivudina comprimido revestido, lamivudina+zidovudina comprimidos revestidos.

O processo de encapsulamento possui o mesmo processo de manipulação da compressão direta, conforme Figura 3. Os pós misturados são levados à máquina encapsuladeira, onde quantidade determinada de material é acondicionada dentro de cápsulas gelatinosas duras. O processo de encapsulamento possui uma produtividade do menor que o processo de compressão.

Exemplos de medicamentos comercializados sob a forma de cápsulas são a estavudina e a zidovudina.

Muitos estudos vem sendo realizados para padronização de metodologias para análise dos medicamentos antiretrovirais.

Simon e colaboradores (SIMON, 2001) desenvolveram uma metodologia para análise simultânea de treze antiretrovirais, incluindo a zidovudina, estavudina, lamivudina e didanosina por CLAE, utilizando como fase móvel acetronitrila/água e metanol/água, apresentando excelentes resultados de precisão, exatidão seletividade em amostras de plasma humano.

Trabalhos recentes demonstram que é possível a análise simultânea de diferentes agentes antiretrovirais por CLAE. Pereira e colaboradores (PEREIRA, 2000) validaram a análise simultânea de zidovudina e lamivudina utilizando CLAE ligada à espectrometria de massa. Enquanto, Fan e colaboradores (FAN, 2002) utilizaram a metodologia analítica de CLAE e partição iônica para análise destes mesmos compostos.

Voloov e colaboradores (VOLOSOV, 2002) realizaram a quantificação de estavudina e zidovudina, utilizando fase móvel com metanol e metodologia de CLAE ligada a espectrometria de massa, obtendo excelentes resultados de precisão e exatidão em amostras de plasma humano.

A associação das metodologias de CLAE e espectrometria de massa apresenta boa solução para a análise destes compostos. Entretanto, Rezk e colaboradores (REZK, 2003) realizaram a validação da metodologia de

análise por CLAE com detecção no ultravioleta, para determinação simultânea de nevirapina e inibidores da transcriptase reversa, em amostras de plasma, utilizando gradiente com duas fases móveis (acetronitrila/metanol e acetato de amônia) com coluna C18 polarizada. O método apresentou exatidão de 97 a 105%, precisão de 0,5% e precisão entre dias de 5,1%.

3.3. Medicamentos imunossupressores

A azatioprina é um imunossupressor utilizado principalmente em transplantes renais. Atua inibindo a proliferação de células T e células B, envolvidas no mecanismo de rejeição, seu uso é limitado devido à alta toxicidade. A estrutura química da azatioprina é apresentada na Figura 3.

É administrado por via oral, sendo bem absorvida no trato gastrointestinal. É metabolizada a 6-mercaptopurina tornando-se um análogo de purina, que pode assim ser incorporada na formação dos ácidos nucléicos, causando inibição nos primeiros estágios do metabolismo das purinas. Também inibe enzimas envolvidas na síntese do DNA e do RNA, outros nucleotídeos e proteínas. Assim sendo, bloqueia a função da célula T e inibe sistema de anticorpos diminuindo quantidade de monócitos e granulócitos circulantes. Devido ao baixo efeito sobre a resposta auto-imune

já estabelecida é mais efetiva na prevenção da rejeição do que no tratamento da rejeição aguda (MUELLER, 2004; DERVIEUX, 1998).

A dose inicial no tratamento de transplante é de 3 a 5mg por kg de peso corporal por dia, iniciando a administração no mesmo dia do transplante.

O efeito mais observado no tratamento é a depressão das células marrons, manifestando-se como leucopenia, no entanto, anemia e trombocitopenia também ocorrem, como consequência do seu emprego. Distúrbios gastrointestinais incluem a pancreatite e, em menor frequência, náuseas, vômitos e diarreia. A hepatotoxicidade ocorre, mas não está ligada à dose administrada. Após o tratamento com azatioprina já foram relatados alguns tipos de tumores, como carcinoma hepatobiliar e tumor mesenquimal (MUELLER,2004).

A azatioprina pode ser analisada através da CLAE. Nos EUA, um grupo de pesquisa utilizou fase móvel de acetonitrila e trietanolamina, com pH 3,2, para análise simultânea da azatioprina e 6-mercaptopurina. (VanOS,1996)

Industrialmente, os comprimidos de azatioprina são produzidos por via úmida, ou granulação por via úmida, devido as características do material. Inicialmente as matérias-primas fracionadas são tamisadas e é preparada a solução aglutinante. Uma das possibilidades é a utilização de pasta de amido como aglutinante para este produto.

O material sólido é adicionado a uma bateadeira planetária ou granulador e umidecido com solução aglutinante. Neste processo denominado de granulação úmida é preparada uma massa úmida. Esta massa é calibrada para homogeneização dos tamanhos de partículas utilizando-se um moinho, com tela de tamanho especificado. Após esta calibração o produto pode ser seco em estufa ou leito até a obtenção de uma porcentagem de umidade ideal para os granulados.

Os granulados obtidos do processo de secagem ainda possuem um tamanho heterogêneo de partícula e serão novamente calibrados por moinho, contudo o tamanho de tela utilizado será menor para redução do tamanho das partículas para que exista uma correta fluidez do material na compressão.

Posteriormente, os granulados são levados para a mistura final, onde é realizada a adição de lubrificantes, para finalização da manipulação do produto. Assim, o material pode ser comprimido e embalado. O fluxograma do processo de produção pode ser observado na Figura 2.

AZATHIOPRINA

Figura 3. Estrutura química da azatioprina

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes, solventes e materiais diversos

- ◆ Metanol grau cromatográfico MERCK[®]
 - ◆ Água purificada por sistema MilliQ-Plus[®]
 - ◆ Ácido acético glacial p.a. MERCK[®]
 - ◆ Membrana hidrofóbica HPLP 0,45µm MILLIPORE[®]
 - ◆ Unidade filtrante HV 0,45µm MILEXtm, MILLIPORE[®]
 - ◆ Frascos de vidro âmbar
 - ◆ Placas de aço inoxidável AISI 316 (25 cm²)
 - ◆ “Alpha[®] Swab” com cabeça pequena de poliéster, modelo TX761,
Cabeça 6.8 mm largura X 16.8 mm comprimento em poliéster.
TEXWIPE[®]
-

- ◆ “Alpha[®] Swab” com cabeça grande de poliéster, modelo TX714, Cabeça 12.7 mm largura x 25.7 mm comprimento em poliéster TEXWIPE[®]
- ◆ “Swab” de algodão com haste estéril AVP[®]
- ◆ Vidraria geral

4.1.2. Equipamentos

- ◆ Cromatógrafo líquido VARIAN[®] modelo 5000, “loop” fixo de 20µl RHEODYNE[®] com válvula giratória de injeção modelo 7125.
 - ◆ Detector de ultravioleta variável VARIAN[®] modelo 4000
 - ◆ Integrador VARIAN[®] modelo 4400
 - ◆ Medidor de pH DM 21 DIGIMED[®] modelo TE901
 - ◆ Sistema de filtração a vácuo
 - ◆ Banho de ultrassom USC1450 (25 khz)
 - ◆ Coluna cromatográfica Nova-Pak C18 60 Å 4µm, dimensão de 3,9 X150mm WATERS[®], conteúdo dimetiloctadecilsilica ligada a sílica amorfa.
 - ◆ Purificador de água MilliQ-Plus MILLIPORE[®]
 - ◆ Espectrofotômetro de Ultravioleta Shimadzu[®]
-

4.1.3. Padrões

A azatioprina (99,7%) , zidovudina (99,5%) , estavudina (99,5%) e lamivudina (99,5%) foram cedidas pela Fundação para o Remédio Popular - FURP e empregadas como substâncias químicas de referência. Todas as substâncias apresentavam laudo de análise aprovado na FURP.

4.2. Métodos

4.2.1. Seleção das condições cromatográficas

Para verificação do comprimento de onda (λ) de maior absorção para cada substância estudada foram utilizados os seguintes parâmetros de espectrometria do UV:

- Solução padrão na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ de azatioprina, zidovudina, estavudina e lamivudina,
 - Cubeta de quartzo de 1cm,
 - Solvente da solução padrão: metanol/água 20:80,
 - Lâmpada de deutério.
-

Os parâmetros cromatográficos empregados para verificação da metodologia de CLAE para análise das substâncias foram:

- ◆ Coluna cromatográfica Nova-Pak C18, dimensão de 3,9 X150mm.
- ◆ Volume de injeção : 20 μ l
- ◆ Vazão: azatioprina, zidovudina e lamivudina de 1,0 mL/min e estavudina de 0,8mL/min.
- ◆ Temperatura: aproximadamente 25 °C $\pm$ 2 °C
- ◆ Solução para injeção:

Todas as soluções a serem injetadas no cromatógrafo foram previamente filtradas em sistema filtros Millex[®]

- ◆ Fase móvel:

As fases móveis foram filtradas por filtro 0,45 μ m e desaeradas em banho de ultrassom por 20 minutos.

4.2.2. Cálculo do limite de aceitação e escolha dos padrões para a Validação de Limpeza

Para cálculo do limite de aceitação foram utilizadas as equações 4 e 5, que são baseadas na dose terapêutica do produto.

Foram medidas as áreas de cada equipamento (*Tabela 3*) que entram em contato com o produto. No entanto, como para cada produto existe uma linha diferente, foi considerada a soma de todos os equipamentos comuns aos produtos. A linha em estudo se refere a uma Fábrica com planta de produção de sólidos orais, a qual produz, em campanhas alternadas, os produtos anti-retrovirais e azatioprina, sendo o fluxograma de produção ilustrado na *Figura 3*. A *Tabela 4* apresenta os valores de menor dose terapêutica (DT), maior dose diária (LD) e menor tamanho de lote para os produtos (B), que representam 50% do tamanho do lote padrão.

Para a Validação de Limpeza dentro de uma planta produtiva pode ser estabelecido o “worst case” ou pior caso para a validação, sendo assim considerado como padrão para os demais processos de limpeza. Contudo a definição do pior caso deve ser realizada para cada forma farmacêutica em separado, devido às características peculiares de cada método de produção e dos equipamentos utilizados. Além disto, devem ser escolhidas as substâncias de maior toxicidade ou atividade farmacológica, por

apresentarem maior risco caso ocorra contaminação cruzada. (HPFB, 2003; BRASIL, 2003; PIC, 1996)

No estudo proposto, a substância de maior toxicidade é a azatioprina. Nestas condições, será utilizada para validação da limpeza da linha de compressão via úmida e de comprimidos. Para a linha de compressão – via seca será utilizado o produto de associação, com lamivudina e zidovudina e para a linha de encapsulamento, a escolha será a estavudina, devido a maior toxicidade, quando comparada aos demais anti-retrovirais.

4.2.3. Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia analítica será baseada nas recomendações do ICH (Tripartite International Conference on Harmonization) nos documentos: Validation of Analytical Procedures and Methodology, bem como nas observações da Farmacopéia Americana ed. 26 no capítulo: Validation of Compendial Methods (ICH,2003; USP,2000; SHABIR, 2003; ERMER,2001)

A validação do método será realizada determinando-se: linearidade, precisão, especificidade, exatidão e limite de detecção e quantificação (ICH,2003; USP,2000; SHABIR, 2003; ERMER,2001; ORR,2003; BRITAIN,1998).

A linearidade é a representação da capacidade do método de gerar resultados proporcionais à concentração da amostra dentro de uma variação conhecida de concentração. Sendo assim, foi preparada a curva analítica com seis concentrações da substância em análise para cálculo do coeficiente de correlação e definição da equação da curva (ICH, 2003).

A precisão determina o grau de concordância entre resultados de amostras individuais analisadas, em idênticas condições de teste. A precisão foi avaliada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) entre as amostras, sendo o valor de referência de DPR 2%. O cálculo da precisão intermédia realizada no mesmo laboratório com diferentes analistas, em dias diferentes também foi considerada (ICH, 2003).

A exatidão é expressa como a proximidade entre os resultados obtidos na metodologia e o valor de referência apresentado. É medida pelo preparo da amostra com quantidades conhecidas de substância teste, sendo calculada pela porcentagem de recuperação do método. Para análise de resíduos o valor aceitável de recuperação é de 70 a 120%, com precisão de $\pm 20\%$ (RIBANI, 2004). A exatidão pode ser determinada por diferentes metodologias. A primeira metodologia é baseada na comparação do método com um segundo cuja exatidão já esteja estabelecida. A determinação da exatidão pode também ser baseada no teste de recuperação, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de padrão da substância teste a um placebo da amostra.

A especificidade é o parâmetro que determina a capacidade do método em avaliar de forma inequívoca a substância teste, na presença de componentes que poderiam interferir na determinação, como excipientes ou produtos de degradação. Assim para tal verificação, é utilizado o placebo de um produto de mercado com composição definida de excipientes (ICH, 2003).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração de substância teste a ser detectada com limite de confiabilidade e o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade da substância testada a ser analisada de forma quantitativa e com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de detecção (LD) apenas é calculado com base no desvio padrão (DP) e na inclinação da curva analítica (IC), considerando que o valor aceitável é 3 vezes maior do que o ruído da linha de base, expresso como : $LD = DP / IC \times 3$

O limite de quantificação (LQ) é expresso como a menor quantidade da substância teste a ser analisada de forma quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação será calculado com base no desvio padrão (DP) e na inclinação da curva analítica (IC), considerando que o valor aceitável seja 10 vezes maior do que o ruído da linha de base, expresso como : $LQ = DP / IC \times 10$

O valor obtido de LQ será preparado por diluição da solução estoque e analisado para cálculo do RSD%, que deverá ser inferior a 2%.

4.2.3.1. Preparação da solução padrão

A. Solução padrão de azatioprina

Para preparação da solução estoque foram pesados analiticamente 25,0mg de azatioprina e transferidos para balão volumétrico de 100mL. Posteriormente, foram adicionados aproximadamente 40mL de metanol e a solução foi levada ao banho de ultrassom por cinco minutos. O volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução de 0,25mg/mL de azatioprina. Esta solução foi mantida em refrigerador de 2 a 8 °C. Para a validação, a solução para a análise foi preparada no dia de utilização.

As soluções intermediárias de azatioprina nas concentrações de 50,0µg/mL, 20,0µg/mL e 10,0µg/mL foram obtidas pela diluição da solução estoque, completando-se o volume com metanol / água / ácido acético glacial 20:80:1.

B. Solução padrão de zidovudina

A solução estoque de zidovudina foi preparada pesando-se analiticamente 25,0 mg. Após a transferência para um balão volumétrico de 100mL, o volume foi completado com metanol/água 20:80, obtendo-se solução de concentração 0,25 mg/mL de zidovudina. Esta solução foi

mantida em refrigerador de 2 a 8 °C. Para a validação, a solução estoque para análise foi preparada no dia de utilização.

A solução intermediária de zidovudina nas concentrações de 50,0µg/mL, 20,0µg/mL e 10,0µg/mL foram obtidas pela diluição da solução estoque, completando-se o volume com metanol/água 20:80.

C. Solução padrão de lamivudina

A solução estoque de lamivudina foi preparada pesando-se analiticamente 25,0 mg, que foram transferidos para balão volumétrico de 100mL. O volume foi completado com metanol/água 20:80, obtendo-se solução com concentração de 0,25 mg/mL de lamivudina. Esta solução foi mantida em refrigerador de 2 a 8 °C. Para a validação a solução para análise foi preparada no dia de utilização.

As soluções intermediárias de lamivudina nas concentrações de 50,0µg/mL, 20,0µg/mL e 10,0µg/mL foram obtidas pela diluição da solução estoque, sendo completado o volume com metanol/água 20:80.

D. Solução padrão de estavudina

A solução estoque de estavudina foi preparada pesando-se analiticamente 25,0mg. Após transferência para balão volumétrico de 100mL, o volume foi completado com água MilliQ[®], obtendo-se solução de concentração de 0,25 mg/mL de estavudina. Esta solução foi mantida em refrigerador de 2 a 8 °C. Para a validação, a solução estoque foi preparada no dia de utilização.

A solução intermediária de estavudina na concentração de 50,0µg/mL, 20,0µg/mL e 10,0µg/mL foram obtidas pela diluição da solução estoque, sendo completado o volume com metanol/água 20:80.

E. Solução padrão de lamivudina + zidovudina

A solução estoque de lamivudina+zidovudina foi preparada pesando-se analiticamente 25,0 mg de cada substância. Após a transferência para balão volumétrico de 100mL, o volume foi completado com metanol/água 20:80. Obteve-se solução com concentração de 0,25 mg/mL de lamivudina+zidovudina. Esta solução foi mantida em refrigerador de 2 a 8 °C. Para a validação, a solução para análise foi preparada no dia de utilização.

As soluções intermediárias de lamivudina+zidovudina nas concentrações de 50,0µg/mL, 20,0µg/mL e 10,0µg/mL foram obtidas pela diluição da solução estoque, completando o volume com metanol/água 20:80.

4.2.3.2. Preparação da amostra para teste de recuperação do método de amostragem

Placas de aço inoxidável de 25 cm² foram contaminadas com 1mL da solução de 10,0 µg/mL do produto teste e secas em estufa a 60 °C (± 3 °C). A amostragem com “swab” de poliéster foi realizada utilizando-se água MilliQ® para umedecer o “swab”. Posteriormente o “swab” foi passado na placa em sentido ziguezague sequencialmente da direita para esquerda, retornando da esquerda para direita, de cima para baixo e retornando de baixo para cima. Após a amostragem o “swab” foi imerso em 2,0mL de fase móvel, para diluição do resíduo removido da placa, e a solução com o “swab” imerso foi levada ao banho de ultrassom por 10 min. A solução obtida foi filtrada com sistema filtro Millex® e injetada num volume de 20,0 µL no cromatógrafo.

4.2.3.3. Preparação da curva analítica

A curva analítica foi preparada utilizando-se seis concentrações da substância teste : 2,0µg/mL, 6,0µg/mL, 10,0µg/mL, 14,0µg/mL, 18,0µg/mL e 22,0 µg/m.

Foram pesados 25,0 mg da substância teste e transferidas para balão volumétrico de 100mL. O volume foi completado com a fase móvel correspondente, obtendo-se solução com concentração de 25 µg/mL. Uma alíquota de 5,0mL desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25mL, sendo completado o volume com fase móvel, para obter-se uma solução contendo 50,0 µg/mL. A solução de 50,0 µg/mL foi transferida para uma bureta de 50mL para preparo das soluções de diferentes concentrações, utilizando balões de 25mL.

4.2.3.4. Preparação da amostra para determinação da precisão

As amostras a serem utilizadas para determinação da repetibilidade, precisão inter-dia e precisão entre analistas foram todas preparadas seguindo a metodologia descrita anteriormente para preparo da amostra para teste de porcentagem de recuperação. Para confiabilidade do teste de recuperação foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) para as soluções padrão contendo 10,0 µg/mL de cada substância.

4.2.3.5. Preparação da amostra para determinação da exatidão

A solução padrão da substância teste foi preparada como descrito anteriormente para obtenção de uma solução de 20,0 µg/mL.

A amostra com quantidade conhecida de substância teste foi preparada partindo-se de uma solução estoque de 50,0 µg/mL, da qual foi transferida volumetricamente 2,0 mL para um balão volumétrico de 10mL. Após completado o volume do balão, foi imerso na solução um “swab” de poliéster, para simulação da amostra a ser analisada.

Para as amostras preparadas, foram adicionadas quantidades conhecidas de padrão, conforme Tabela 5. Todas as amostras foram preparadas de forma que as concentrações obtidas estivessem dentro da faixa linear da curva analítica.

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada através da equação:

$$R\% = \frac{C_{ap} - C_a}{C_p} \times 100, \text{ onde}$$

R% - Porcentagem de recuperação

C_{ap} - Concentração da amostra adicionada de padrão

C_a - Concentração da amostra

C_p - Concentração do padrão

Tabela 3. Área dos equipamentos na linha de produção de azatioprina, zidovudina, estavudina, lamivudina, lamivudina+zidovudina e didanosina, considerando-se as partes do equipamento que entram em contato com o produto

PRODUTO	EQUIPAMENTO	ÁREA (cm ²)
Compressão - Via úmida	Batedeira planetária	14.507,93
	Granulador cônico	10.812,64
	Estufa a vapor	60.000,00
	Peneira vibratória	8.295,34
	Misturador V	33.076,00
	Compressora	123,77
	Envelopadora	602,99
	Área total	127.418,67
Encapsulamento	Peneira vibratória	8295,34
	Misturador V	33.076,00
	Encapsuladora	8.953,86
	Enfrascadora	25.813,79
	Área total	76.138,99
Compressão - Via Seca	Peneira vibratória	8295,34
	Misturador V	33076,00
	Compressora	123,77
	Drageadeira	389,56
	Enfrascadora	25813,79
	Área total	67.698,46

Tabela 4. Dados de menor dose terapêutica que promove efeito, maior dose diária administrada e tamanho de lote de produção das substâncias anti-retrovirais e azatioprina

	MENOR DOSE	MAIOR DOSE	TAMANHO
PRODUTO	TERAPÊUTICA (DT)	DIÁRIA (LD)	DE LOTE
Azatioprina	210 mg	350mg	90.000g
Didanosina	200 mg	600mg	51.180g
Estavudina	4 mg	80mg	99.000g
Zidovudina	8 mg	600mg	102.000g
Lamivudina	8 mg	300mg	100.000g

Tabela 5 . Esquema de obtenção das amostras para teste de recuperação

Balão	Volume de	Concentração	Volume	Concentração
volumétrico	amostra	da amostra	adicionado	final em $\mu\text{g/mL}$
de 10mL	adicionado	em $\mu\text{g/mL}$	de padrão	
	em mL		20,0 $\mu\text{g/mL}$	
Padrão	-	-	5,0	10,0
1	2,0	10,0	1,0	12,0
2	2,0	10,0	2,0	14,0
3	2,0	10,0	3,0	16,0
Amostra	2,0	10,0	-	10,0

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de condições cromatográficas

Os valores de comprimento de onda máximo de absorção no ultravioleta, fase móvel, fluxo e tempo de retenção são apresentados na *Tabela 6* e ilustrados nas *Figuras 4 e 5*.

Os cromatogramas obtidos para cada substância são ilustrados nas *Figuras 6, 7, 8, 9 e 10*.

Os valores estatísticos para análise cromatográfica das soluções padrão de azatioprina nas concentrações de 10,0µg/mL e 20,0µg/mL, zidovudina nas concentrações de 10,0µg/mL e 20,0µg/mL, estavudina nas concentrações 10,0µg/mL e 20,0µg/mL e lamivudina na concentração de 10,0µg/mL são apresentados nas *Tabelas 7, 8, 9 e 10*, respectivamente.

Tabela 6. Parâmetros para análise das substâncias teste por CLAE

Substância	Fluxo mL/min	Fase móvel	λ	Tempo de retenção
Azatioprina	0,8	Metanol / Água 20:80 1% ácido acético (pH 3,0)	280 nm	4,9
Zidovudina	1,0	Metanol / Água 20:80 (pH 6,8)	266 nm	6,01
Lamivudina	1,0	Metanol / Água 20:80 (pH 6,8)	270 nm	2,59
Estavudina	0,8	Metanol / Água 20:80 (pH 6,8)	266 nm	2,91

Figura 4. Comprimentos de onda (nm) de absorção máxima para didanosina (A), estavudina (C), zidovudina (D) e lamivudina (B)

Figura 5. Comprimentos de onda (nm) de absorção máxima para azatioprina.

Tabela 7. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para azatioprina por CLAE

AZATIOPRINA 20,0 µg/mL	AZATIOPRINA 10,0 µg/mL
23158	12267
23901	12225
23749	12354
23361	12217
23919	12089
23763	12263
23651	12228
N = 7	N = 7
Média = 23643	Média = 12235
Dp = 272,6	Dp= 79,3
DPR = 1,15	DPR = 0,65

Tabela 8. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para zidovudina por CLAE

ZIDOVUDINA 20,0 μ g/mL	ZIDOVUDINA 10,0 μ g/mL
15678	7401
15649	7608
15382	7457
15373	7525
15866	7622
15621	7353
N = 6	N = 6
Média = 15595	Média = 7494
Dp = 188,98	Dp = 109,76
DPR = 1,2	DPR = 1,4

Tabela 9. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para estavudina por CLAE

ESTAVUDINA 10,0 μ g/mL	ESTAVUDINA 20,0 μ g/mL
10818	21786
10811	21861
10776	21597
10786	21972
10691	22258
10674	22070
N = 6	N = 6
Média = 10759	Média = 21924
Dp = 61,73	Dp = 230,27
DPR = 0,57	DPR = 1,05

Tabela 10. Resultados estatísticos do teste de repetibilidade para lamivudina por CLAE

LAMIVUDINA 10,0 µg/mL
8736
8731
8933
8958
8854
8996
N = 6
Média = 8868
Dp= 114,10
DPR = 1,29

Figura 6. Cromatograma da solução padrão de azatioprina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água/ácido acético glacial 20:80:1, detecção a 280nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

Figura 7. Cromatograma da solução padrão de zidovudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µl

Figura 8: Cromatograma por CLAE para solução padrão de stavudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µl

Figura 9. Cromatograma da solução padrão de lamivudina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

Figura 10. Cromatograma da solução padrão de lamivudina associada a zidovudina, nas concentrações de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

5.2. Cálculo do limite de aceitação para residual das substâncias

O cálculo do limite de aceitação para as substâncias foi efetuado considerando-se os valores apresentados nas *Tabelas 3 e 4*, onde a menor dose terapêutica (DT) é 4mg. O menor tamanho de lote para os produtos é de 25.590.000mg, pois deve ser considerada a produção de lotes reduzidos, que podem ser 50% do lote original. A maior dose diária (LD) foi de 600 mg e o fator de segurança 1/1000. O valor encontrado para máximo resíduo aceitável (MA) foi de 170,6 mg. Como área de amostragem (A) padrão foi utilizada uma superfície de 25 cm² e como área total da linha de produção (AT), o valor de 76.652,32 cm². Como o fator de recuperação do método de amostragem ainda não é conhecido será utilizado o valor de 30%. Obteve-se um valor de limite de aceitação de 16,7 µg de resíduo em cada “swab” analisado. Sendo assim, o valor inicial para os testes de recuperação com “swab” será de 10,0 µg, para que sejam verificadas interferências de concentrações um pouco menores do que a padronizada.

5.3. Estudo do teste de recuperação da metodologia de amostragem para as substâncias estudadas

O teste de recuperação da metodologia de amostragem foi realizado segundo método descrito e os valores apresentados para a zidovudina, estavudina e azatioprina podem ser observadas nas *Tabelas 11, 12 e 13*, respectivamente. O valor considerado como ideal para recuperação da metodologia de amostragem deve ser superior a 70%, sendo assim, deverá ser utilizado como padrão o “swab” de poliéster, pois esse apresenta um poder de recuperação superior ao “swab” de algodão. Além disto, pode ser observada uma grande interferência do “swab” de algodão nos cromatogramas ilustrados nas *Figuras 11 e 12*.

Tabela 11. Teste de recuperação da zidovudina (10,0 µg/mL), utilizando como solvente de diluição do resíduo 1,0 mL de metanol e dois tipos de “swab” (algodão e poliéster)

Amostra	Solvente de diluição	Tipo “swab” utilizado	DPR (%) n=3	Recuperação da amostragem (%)
1	1mL metanol	“Swab” algodão	1,72	58,3
2	1mL metanol	“Swab” algodão	16,45	65,7
3	1mL metanol 10min ultrassom	“Swab” poliéster TX761	1,03	68,6
4	1mL metanol	“Swab” poliéster TX761	1,82	64,6

Tabela 12. Teste de recuperação da zidovudina (10,0 µg/mL), utilizando como solvente de diluição do resíduo 2,0mL de metanol e “swab” de poliéster

Amostra	Solvente de diluição	Tipo “swab” utilizado	DPR (%) n=3	Recuperação da amostragem (%)
1	2 mL fase móvel 10min ultrassom	“Swab” poliéster TX761	0,64	87,58
2	2 mL fase móvel 10 min ultrassom	“Swab” poliéster TX761	1,84	83,90

Tabela 13. Teste de recuperação de estavudina (10,0 µg/mL), utilizando ultrassom por 10 minutos

Amostra	Tipo “swab” utilizado	Solvente diluição	DPR (%) n=3	Recuperação da amostragem (%)
1	“Swab” algodão	Fase móvel 1mL	4,57	36,70
2	“Swab” algodão	Fase móvel 1mL	5,26	35,1
3	“Swab” poliéster TX761	Fase móvel 2 mL	0,80	80,0
4	“Swab” poliéster TX761	Fase móvel 1mL	5,43	74,4
5	“Swab” poliéster TX714	Fase móvel 1mL	0,97	65,5

Tabela 14. Teste de recuperação de azatioprina (10,0 µg/mL), utilizando ultrassom por 10 minutos

Área pico solução padrão	Amostra	Tipo swab utilizado	Solvente diluição	DPR (%)	Área do pico	Recuperação (%)
12903 (DPR = 0,96) n=3		"Swab" de	Fase móvel			
	1	poliéster	2mL	2,7	7922	61,40
		TX714				
		"Swab" de	Fase móvel			
	2	poliéster	2mL	3,5	9380	72,70
		TX761				
		"Swab" de	Fase móvel			
	3	algodão	2mL	2,0	5969	46,26

Figura 11. Cromatograma representando o teste de recuperação para a estavudina em soluções de 10,0 μ g/mL, utilizando “swab” de poliéster. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C $\pm$ 2°C, volume de injeção 20,0 μ L

Figura 12. Cromatograma representando o teste de recuperação para estavudina em solução de 10,0µg/mL, utilizando “swab” de algodão. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

5.4. Validação da metodologia de CLAE

A validação da metodologia para análise de resíduos foi realizada para as substâncias azatioprina, estavudina e lamivudina e zidovudina.

5.4.1. Validação da metodologia de CLAE para azatioprina

5.4.1.1. Obtenção da curva analítica

Para cálculo da linearidade foi preparada a curva analítica utilizando seis concentrações, entre 2,0 µg/mL e 22,0 µg/mL, sendo obtidos os valores apresentados na *Tabela 15*. A curva e sua respectiva equação estão apresentadas na *Figura 13*.

5.4.1.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado através da multiplicação do desvio padrão (DP) por três vezes o ruído da linha de base, dividido pela inclinação da curva analítica (IC), enquanto o limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando-se o desvio padrão (DP) por dez vezes o ruído da linha de base e dividido pela inclinação da curva analítica (IC), conforme valores apresentados na *Tabela 16*.

Foi preparada uma solução na concentração de 0,29 µg/mL para verificação do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) para o limite de quantificação, sendo obtidos os valores de 30,20 e 1,81% respectivamente.

5.4.1.3. Precisão

Inicialmente foi calculada a repetibilidade, ou seja, a precisão intra-análise, para amostras de azatioprina, demonstrando a precisão entre o mesmo analista e a instrumentação, (*Tabelas 17 e 18*).

Posteriormente, foram preparadas dez soluções de amostras de azatioprina, que foram injetadas no cromatógrafo líquido para determinação da precisão da recuperação da metodologia de amostragem empregada, com a finalidade de quantificar o resíduo de azatioprina, (*Tabela 19*).

A precisão entre dois dias consecutivos foi determinada pela preparação de amostras em dias diferentes (*Tabela 20*).

Foram determinadas ainda, a precisão entre dois analistas, a fim de verificar a capacidade da metodologia de reproduzir os resultados, mesmo com analistas diferentes. Os valores obtidos estão apresentados na *Tabela 21*.

Continuação da Tabela 21

5.4.1.4. Seletividade e especificidade

Foram preparadas soluções de padrão contendo 10,0 µg/mL de azatioprina, e soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL utilizando comprimidos de 50mg de azatioprina, com intuito de verificar-se a seletividade do método em presença de excipientes. Foram obtidos os cromatogramas com tempo de retenção de 5,0 min (*Figura 14*).

5.4.1.5. Exatidão

Para cálculo da porcentagem de recuperação do método foram preparadas as amostras conforme *Tabela 5*. Os resultados obtidos para as concentrações analisadas estão demonstrados na *Tabela 22*.

Tabela 15. Resultados da curva analítica para azatioprina, com os respectivos desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR)

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	ÁREA MÉDIA	DP	DPR
2,0	2317	9,90	0,43
6,0	7095,5	0,71	0,01
10,0	12253	23,33	0,19
14,0	17,63	5,66	0,03
18,0	21825	173,24	0,79
22,0	27110	4,24	0,02

Figura 13. Curva analítica para azatioprina

Tabela 16. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para a azatioprina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$

Parâmetro	DP	Fator de multiplicação	IC	Concentração (µg/mL)
Limite de quantificação	36,18	3	1235,4	0,09
Limite de detecção	36,18	10	1235,4	0,29

Figura 14. Cromatograma da solução preparada com comprimidos de 50mg de azatioprina na concentração de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água/ácido acético glacial 20:80:1, detecção a 280nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

Tabela 17. Repetibilidade do cromatógrafo líquido para soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL de azatioprina

Amostras de 10,0 µg/mL (n=6)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP(n=3)	37,54	40,82	42,02	43,05	41,96
Media área	12230,67	5147,70	5080,01	5095,95	5107,22
DPR	0,31	0,79	0,80	0,71	0,83
MEDIA PADRÃO (n=3)				6115,33	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				5107,22	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				83,5	

Tabela 18. Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de azatioprina

Amostra (injeção)	Área do pico
1	5104
2	5085
3	5190
4	5100
5	5155
6	5126
7	5161
8	5181
9	5195
10	5180
DP	38,72
Área media	5147,7
DPR	0,75

Tabela 19. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para azatioprina para cálculo da precisão entre amostras

Amostras	Área média (n=6)	DP	DPR	Recuperação da amostragem (%)
1	5090	42,90	0,84	79,5
2	5100	60,91	0,70	79,6
3	5095	50,23	0,99	79,5
4	5055	61,08	0,61	78,9
5	4995	35,72	0,71	78,0
6	5064	72,01	0,73	79,1
7	5036	32,85	0,65	78,6
8	5102	46,74	0,92	79,7
9	5109	65,93	0,96	79,8
10	5084	45,35	0,89	79,4
Precisão entre amostras	5013	295,93	5,83	79,2

Tabela 20. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com mesmo analista para amostras de azatioprina

Parâmetros	Amostra DIA 1	Amostra DIA 2
ÁREA MÉDIA	5095	5164
DP	69,8	70,6
DPR (n=10)	1,25	0,90
DP ENTRE DIAS		70,2
DPR ENTRE DIAS		1,07

Tabela 21. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para azatioprina

Analista	Amostras	Área média (n=6)	DP	DPR	Recuperação (%)
1	1	5100	65,91	1,29	79,6
	2	5065	35,62	0,70	79,1
	3	5096	42,17	0,83	79,6
	4	5036	76,58	1,52	78,6
	5	5032	38,47	0,76	78,6
	Média	5065,8	295,93	5,8	79,1
2	6	5102	60,97	1,19	79,7
	7	5136	70,25	1,37	80,2
	8	5125	45,67	0,89	80,0
	9	5145	39,95	0,78	80,3
	10	5090	45,64	0,90	79,5
	Média	5119,6	295,93	5,78	79,9
Precisão entre analistas		5092,7	295,93	6,01	79,3

Tabela 22. Resultados do teste de recuperação para solução padrão de azatioprina adicionada a amostras e analisadas por CLAE

AMOSTRA	Concentração de padrão adicionada em $\mu\text{g/mL}$	Concentração recuperada em $\mu\text{g/mL}$ (n=3)	% de Recuperação	Recuperação média $\pm$ DP
1	2,00	1,98	99,00	99,19 $\pm$ 0,57
2	4,00	3,95	98,75	
3	6,00	5,99	99,83	

5.4.2. Validação da metodologia de CLAE para estavudina

5.4.2.1. Obtenção da curva analítica

Para cálculo da linearidade foi preparada a curva analítica utilizando seis concentrações, entre 2,0 µg/mL e 22,0 µg/mL, sendo obtidos os valores apresentados na *Tabela 23*. A curva e sua respectiva equação estão apresentadas na *Figura 15*.

5.4.2.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado através da multiplicação do desvio padrão (DP) por três vezes o ruído da linha de base, dividido pela inclinação da curva analítica (IC), enquanto que o limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando-se o desvio padrão (DP) por dez vezes o ruído da linha de base e dividido pela inclinação da curva analítica (IC), conforme valores apresentados na *Tabela 24*.

Foi preparada uma solução na concentração de 0,65 µg/mL para verificação do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) para o limite de quantificação, sendo obtidos os valores de 26,25 e 2,10%, respectivamente.

5.4.2.3. Precisão

Inicialmente foi calculada a repetibilidade, ou seja, a precisão intra-análise, para amostras de estavudina, demonstrando a precisão entre o mesmo analista e a instrumentação, conforme *Tabelas 25 e 26*.

Posteriormente, foram preparadas dez amostras de estavudina e injetadas no cromatógrafo líquido para determinar a precisão entre a recuperação da metodologia de amostragem empregada para recuperar o resíduo de estavudina na superfície testada, conforme *Tabela 27*.

A precisão entre dois dias consecutivos foi determinada preparando-se amostras em dias diferentes, como apresentado na *Tabela 28*.

Foram determinadas ainda, a precisão entre dois analistas, a fim de verificar a capacidade da metodologia de reproduzir os resultados. Mesmo com analistas diferentes, os valores obtidos foram semelhantes e estão apresentados na *Tabela 29*.

5.4.2.4. Seletividade e especificidade

Foram preparadas soluções de amostra contendo 10,0 µg/mL de timina, produto de degradação da estavudina, e soluções de amostras de 10,0 µg/mL de cápsulas de 30mg de estavudina, com intuito de verifica-se a seletividade do método em presença de excipientes e do produto de degradação. Foram obtidos os cromatogramas apresentados na *Figura 16*.

5.4.2.5. Exatidão

Para cálculo da porcentagem de recuperação do método foram preparadas as amostras conforme *Tabela 5*. Os resultados obtidos para as concentrações analisadas estão apresentados na *Tabela 30*

Tabela 23: Resultados da curva analítica para estavudina, com os respectivos apresentando desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR)

Concentração (µg/mL)	Área Média	DP	DPR
2,0	2.092,33	17,47	0,84
6,0	6.348,67	15,53	0,24
10,0	10.748,33	23,71	0,22
14,0	15.030,33	83,51	0,56
18,0	19.356,67	161,81	0,84
22,0	23.419,33	112,57	0,48

Figura 15. Curva analítica da estavudina

Tabela 24. Limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para a estavudina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$

	DP	Fator de multiplicação	IC	Concentração (µg/mL)
Limite de detecção	69,1	3	1067	0,19
Limite de quantificação	69,1	10	1067	0,65

Figura 16. Cromatogramas da estavudina e da timina, em solução de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol/água 20:80, detecção a 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 0,8 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µL

Tabela 25. Repetibilidade do cromatógrafo líquido para amostras de 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL e 20,0 µg/mL de estavudina

Amostras de 5,0 µg/mL (n=3)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP (n=3)	51,54	8,49	25,46	48,08	73,11
Media área	2.724,83	2.361,00	2.215,00	2.295,00	2.290,33
DPR	0,95	0,36	1,15	2,10	3,19
MEDIA ÁREA PADRÃO (n=3)				2.724,83	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				2.290,33	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				84,05 %	
Amostras de 10,0 µg/mL (n=3)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP(n=3)	45,25	38,89	76,37	36,06	194,94
Media área	10.494,00	4.752,50	4.459,00	4.383,50	4.531,67
DPR	0,43	0,82	1,71	0,82	4,30
MEDIA PADRÃO (n=3)				5247,00	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				4.531,67	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				86,37	
Amostras de 20,0 µg/mL (n=3)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP(n=3)	0,71	381,13	342,24	0,71	284,81
Media área	22.337,50	8.951,50	8.488,00	9.006,50	8.815,33
DPR	0,70	4,26	4,03	0,01	3,23
MEDIA PADRÃO				11.168,75	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				8.815,33	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				78,93	

Tabela 26. Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de estavudina

Amostra (injeção)	Área do cromatograma
1	4320
2	4316
3	4337
4	4306
5	4308
6	4245
7	4469
8	4279
9	4259
10	4353
DP	62,32
Área media	4.319,20
DPR	1,44

Tabela 27. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para estavudina para cálculo da precisão entre amostras

Amostras	Área média (n=6)	DP	DPR	Recuperação da amostragem (%)
1	4.626,50	40,25	0,87	85,14
2	4.475,17	63,20	1,41	82,35
3	4.089,33	65,19	1,59	82,35
4	4.008,33	35,88	0,90	73,76
5	4.436,00	64,89	1,46	81,63
6	3.711,83	76,69	2,07	68,31
7	4.572,33	47,53	1,04	84,14
8	4.398,17	41,66	0,95	80,94
9	3.900,83	48,47	1,24	71,78
10	4.212,50	19,31	0,46	77,52
Precisão				
entre amostras	4243,10	307,24	7,24	78,08

Tabela 28. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de estavudina

Parâmetros	Amostra DIA 1	Amostra DIA 2
ÁREA MÉDIA	4.319,20	4.240,40
DP	62,32	64,04
DPR (n=10)	1,44	1,51
DP ENTRE DIAS		63,18
DPR ENTRE DIAS		1,48

Tabela 29. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para estavudina

Analista	Amostras	Área média (n=6)	DP	DPR	Recuperação (%)
1	1	4.062,00	31,87	0,78	78,39
	2	4.169,00	86,47	2,07	80,46
	3	4.216,00	58,03	1,38	81,37
	4	3.978,00	77,67	1,95	76,77
	5	4.265,67	52,49	1,23	82,32
	Média	4.138,13	116,96	2,83	79,86
2	6	4.101,00	56,15	1,37	79,15
	7	4.368,50	61,48	1,41	84,31
	8	4.193,83	30,34	0,72	80,94
	9	4.030,17	56,14	1,39	77,78
	10	4.289,50	29,06	0,68	82,78
	Média	4196,60	136,96	3,26	80,99
Precisão entre analistas		4167,37	123,96	2,97	80,43

Tabela 30. Resultados do teste de recuperação para solução padrão de estavudina adicionado a amostras e analisados por CLAE

AMOSTRA	Concentração de padrão adicionada em $\mu\text{g/mL}$	Concentração recuperada em $\mu\text{g/mL}$ (n=3)	Recuperação (%)	Recuperação média $\pm$ DP
1	2,00	2,01	100,50	101,47 $\pm$ 1,47
2	4,00	4,03	100,75	
3	6,00	6,19	103,17	

5.4.3. Validação da metodologia para lamivudina e zidovudina

5.4.3.1. Obtenção da curva analítica

Para cálculo da linearidade foi preparada a curva analítica utilizando seis concentrações, entre 2,0 µg/mL e 22,0 µg/mL, sendo obtidos os valores apresentados na *Tabela 31*. A curva e sua respectiva equação estão apresentadas na *Figura 17*.

5.4.3.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado através da multiplicação do desvio padrão (DP) por três vezes o ruído da linha de base, dividido pela inclinação da curva analítica (IC), enquanto que o limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando-se o desvio padrão (DP) por dez vezes o ruído da linha de base e dividido pela inclinação da curva analítica (IC), conforme valores apresentados na *Tabela 32*.

Foi preparada uma solução na concentração de 1,20 µg/mL para verificação do desvio padrão (DP) e do desvio padrão relativo (DPR) para o limite de quantificação, sendo obtidos os valores de 91,36 e 2,03%, respectivamente.

5.4.3.3. Precisão

Inicialmente foi calculada a repetibilidade, ou seja, a precisão intra-análise, para amostras de lamivudina e zidovudina, demonstrando a precisão entre o mesmo analista e a instrumentação, conforme *Tabelas 33 e 34*.

Posteriormente, foram preparadas dez amostras de lamivudina e zidovudina e realizadas injeções no cromatógrafo líquido para determinar a precisão entre a recuperação da metodologia de amostragem empregada para recuperação do resíduo de estavudina, conforme *Tabela 35*.

A precisão entre dois dias consecutivos foi determinada pelo preparo de amostras em dias diferentes, como apresentado na *Tabela 36*.

Foram determinadas ainda, a precisão entre dois analistas, a fim de verificar a capacidade da metodologia de reproduzir os resultados. Mesmo com analistas diferentes, os valores obtidos foram semelhantes e estão apresentados na *Tabela 37*.

5.4.3.4. Seletividade e especificidade

Foram preparadas soluções de amostra contendo 10,0 µg/mL a partir de comprimidos de 150mg:300mg de lamivudina e zidovudina, respectivamente, com o intuito de verificar-se a seletividade do método em presença de excipientes e do produto de degradação. Foram obtidos os cromatogramas apresentados na *Figura 18*.

5.4.3.5. Exatidão

Para cálculo da porcentagem de recuperação do método foram preparadas as amostras conforme *Tabela 5*. Os resultados obtidos para as concentrações analisadas estão apresentados na *Tabela 38*

Tabela 31: Resultados da curva analítica para lamivudina e zidovudina, apresentando desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR)

Concentração (µg/mL)	lamivudina			zidovudina		
	Área Média	DP	DPR	Área Média	DP	DPR
2,0	1443	14,14	0,98	1362,5	6,36	0,47
6,0	4836	59,40	1,23	4396	83,44	1,9
10,0	8002,5	62,93	0,79	7367,5	38,89	0,53
14,0	11256,5	27,58	0,24	10322,5	2,12	0,02
18,0	14505	45,25	0,31	13345	4,24	0,03
22,0	17534,5	101,12	0,58	16068	74,95	0,47

Figura 17. Curva analítica da associação de lamivudina e zidovudina

Tabela 32. Limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) para a lamivudina e zidovudina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$

Fármaco	Parâmetros	DP	Fator de multiplicação	IC	Concentração (µg/mL)
Lamivudina	Limite de detecção	51,74	3	801,02	0,36
	Limite de quantificação	51,74	10	801,02	1,21
Zidovudina	Limite de detecção	35,0	3	735,14	0,36
	Limite de quantificação	35,0	10	735,14	1,21

Figura 18. Cromatograma da solução preparada com comprimidos de lamivudina associada a zidovudina 150:300mg, nas concentrações de 10,0 µg/mL. Condições cromatográficas Fase móvel metanol/água 20:80, 266nm, coluna cromatográfica Nova-Pak C18, vazão 1,0 mL/min, temperatura 25 °C ± 2°C, volume de injeção 20,0 µl

Tabela 33. Repetibilidade do cromatógrafo líquido para amostras de 10,0 µg/mL de lamivudina e zidovudina

Amostras de zidovudina 10,0 µg/mL (n=3)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP(n=3)	32,16	30,73	30,12	36,47	32,44
Media área	3112,33	3130,33	3152,00	3054,67	3112,33
DPR	1,03	0,98	0,96	1,19	1,01
MEDIA PADRÃO (n=3)				3952,83	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				3112,33	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				78,74	
Amostras de lamivudina 10,0 µg/mL (n=3)					
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Entre amostras
DP(n=3)	69,46	34,65	28,54	54,22	34,14
Media área	4366,0	3292,33	3426,67	3349,33	3356,11
DPR	1,58	1,05	0,83	1,62	1,17
MEDIA PADRÃO (n=3)				4366,0	
MEDIA ÁREA AMOSTRA				3356,11	
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				76,86	

Tabela 34. Precisão entre injeções no cromatógrafo líquido para uma mesma amostra de lamivudina e zidovudina

Amostra (injeções)	Área do cromatograma lamivudina	Área do cromatograma zidovudina
1	8917	7891
2	8732	8094
3	8645	7732
4	8769	8045
5	8795	7951
6	8562	7723
DP	123,21	155,36
Área média	8736,67	7906
DPR	1,41	1,96

Tabela 35. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) para cálculo da precisão entre amostras

	Amostra	Área média (n=3)	DP	DPR	Recuperação da amostragem (%)
1	3TC	3422,3	10,69	0,31	85,08
	AZT	3218	29,82	0,92	84,93
2	3TC	3186	117,00	3,67	79,20
	AZT	3047	190,37	6,25	80,42
3	3TC	3454	128,35	3,72	85,86
	AZT	2943,3	133,25	4,53	77,68
4	3TC	2891	47,15	1,50	78,28
	AZT	2950,3	71,93	2,43	77,87
5	3TC	3022	64,16	2,12	75,12
	AZT	2835,3	122,04	4,30	74,83
6	3TC	3734,7	87,87	2,35	92,84
	AZT	3171	42,0	1,52	83,69
7	3TC	3515	80,0	2,27	87,38
	AZT	3190	120,3	3,77	84,19
8	3TC	3690	92,5	2,50	91,73
	AZT	3208	130,2	4,06	84,67
9	3TC	3230	52,13	1,61	80,29
	AZT	2903	96,2	3,31	76,62
10	3TC	2800	49,2	1,76	69,61
	AZT	3096	65,3	2,11	81,71
Precisão entre amostras	3TC	3320,3	296,24	8,92	82,54
	AZT	3056,20	140,70	4,60	80,60

Tabela 36. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de lamivudina e zidovudina

Parâmetro	Amostra DIA 1 3TC	Amostra DIA 2 3TC	Amostra DIA 1 AZT	Amostra DIA 2 AZT
ÁREA MÉDIA	3123	3509	3095	2809
DP	54,3	66,3	95,6	152,3
DPR (n=6)	1,74	1,88	3,08	5,42
DP ENTRE DIAS	272,94		202,2	
DPR ENTRE DIAS	7,78		6,85	

Tabela 37. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para lamivudina e zidovudina

Analista		Amostra	Área média (n=3)	DP	DPR	Recuperação da amostragem (%)	
1	1	3TC	3322	54,23	1,63	82,58	
		AZT	2865	36,92	1,29	75,61	
	2	3TC	3191	16,23	0,51	79,32	
		AZT	2932	21,56	0,73	77,38	
	3	3TC	3265	14,96	0,46	81,16	
		AZT	3022	19,65	0,65	79,76	
	4	3TC	3362	23,65	0,70	83,56	
		AZT	3156	25,42	0,8	83,29	
	5	3TC	3029	12,03	0,39	75,29	
		AZT	3045	60,12	1,97	80,37	
	6	3TC	3765	23,63	0,63	93,89	
		AZT	2866	31,25	1,09	75,64	
	2	7	3TC	3515	19,62	0,56	87,38
			AZT	3190	69,03	2,16	84,19
8		3TC	3690	75,12	2,03	91,73	
		AZT	3208	18,25	0,57	84,67	
9		3TC	3230	43,20	1,39	80,29	
		AZT	2903	51,02	1,75	76,62	
10		3TC	2800	65,32	2,33	69,60	
		AZT	3096	12,03	0,38	81,71	
Precisão		3TC	3316,9	290,11	8,75	82,45	
entre analistas		AZT	3028,3	132,34	4,37	79,97	

Tabela 38. Resultados do teste de recuperação para solução padrão de lamivudina e zidovudina adicionada a amostras e analisadas por CLAE

AMOSTRA	Concentração de padrão adicionada em $\mu\text{g/mL}$	Concentração recuperada em $\mu\text{g/mL}$ de 3TC E AZT	Recuperação (%)	Recuperação média $\pm$ DP
		N=3		
1	2,0	2,03 (3TC)	101,5	99,50 $\pm$ 1,54
		1,95 (AZT)	97,5	
2	4,0	3,94 (3TC)	98,5	99,53 $\pm$ 2,03
		3,98 (AZT)	99,5	
3	6,0	6,03 (3TC)	100,5	
		6,10 (AZT)	101,6	

5.5. Validação do método espectrofotométrico no UV para determinação da azatioprina

5.5.1. Preparação da curva analítica

Para cálculo da linearidade foram preparadas três curvas de calibração utilizando sete concentrações, entre 2,0 µg/mL e 22,0 µg/mL de azatioprina, sendo obtidos os valores apresentados na *Tabela 39*. A curva e sua respectiva equação estão apresentadas na *Figura 19* e os espectros de UV na *Figura 20*.

5.5.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi calculado através da multiplicação do desvio padrão (DP) por três vezes o ruído da linha de base, dividido pela inclinação da curva analítica (IC), enquanto o limite de quantificação (LQ) foi calculado multiplicando-se o desvio padrão (DP) por dez vezes o ruído da linha de base e dividido pela inclinação da curva analítica (IC), conforme valores apresentados na *Tabela 40*.

5.5.3. Precisão

Inicialmente foi calculada a repetibilidade, ou seja, a precisão intra-análise, para amostras de azatioprina, demonstrando a precisão entre o mesmo analista e a instrumentação, (*Tabelas 41*).

Posteriormente, foram preparadas dez soluções de amostras de azatioprina e realizadas leituras no UV, a 280nm, para determinar a precisão entre a recuperação da metodologia de amostragem empregada para recuperar o resíduo de azatioprina aplicado na superfície testada (*Tabela 42*).

A precisão entre dois dias consecutivos foi determinada pelo preparo de amostras em dias diferentes, (*Tabela 43*).

Foram determinadas ainda, a precisão entre dois analistas, a fim de verificar a capacidade da metodologia de reproduzir os resultados, mesmo com analistas diferentes. Os valores obtidos são apresentados na *Tabela 44*.

5.5.4. Seletividade e especificidade

Foram preparadas soluções de padrão contendo 10,0 µg/mL de azatioprina, e soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL de azatioprina utilizando comprimidos de 50mg de azatioprina, com intuito de verificar-se a seletividade do método em presença de excipientes. Foram obtidos os espectros apresentados na *Figura 21*.

5.5.5. Exatidão

Para cálculo da porcentagem de recuperação do método foram preparadas as amostras conforme *Tabela 5*. Os resultados obtidos para as concentrações analisadas estão demonstrados na *Tabela 45*.

Tabela 39. Resultados da curva analítica para azatioprina, com desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) entre três curvas de calibração

CONCENTRAÇÃO (µg/mL)	Absorção em 280nm	DP	DPR
2,0	0,1242	0,0034	2,77
4,0	0,2559	0,0074	2,89
6,0	0,3785	0,0116	3,07
10,0	0,6426	0,0137	2,14
14,0	0,8858	0,0049	0,56
18,0	1,1454	0,0079	0,69
22,0	1,3828	0,0096	0,69

Figura 19. Curva analítica para a azatioprina

Figura 20. Espectros de UV para azatioprina. Condições: concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 14,0; 18,0 e 22,0 µg/mL, solvente metanol:água 20:80, cubeta de quartzo 1 cm, lâmpada de deutério

Figura 21. Espectros de UV para azatioprina. Condições: concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 14,0; 18,0 e 22,0 µg/mL, solvente metanol:água 20:80, cubeta de quartzo 1 cm, lâmpada de deutério

Tabela 40. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para azatioprina, calculados segundo equação $LQ = DP/IC \times 10$ e $LD = DP/IC \times 3$.

Parâmetros	DP	Fator de multiplicação	IC	Concentração (µg/mL)
Limite de quantificação	0,05057	10	0,0633	7,98
Limite de detecção	0,05057	3	0,0633	2,39

Tabela 41. Repetibilidade do método espectrofotométrico no UV para soluções de amostras contendo 10,0 µg/mL de azatioprina

Amostras de 10,0 µg/mL (n=6)				
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Entre amostras
Media área	0,3174	0,30688	0,3410	0,32394
DP(n=3)		0,0051	0,0004	0,0241
DPR		1,67	0,11	7,45
MEDIA PADRÃO (n=3)				0,317395
MEDIA AMOSTRA				0,32394
% RECUPERAÇÃO DA EXTRAÇÃO				102,06

Tabela 42. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre dez amostras de análise de resíduo para azatioprina para cálculo da precisão entre amostras

Amostra	Absorção	Recuperação (%)
1	0,33459	105,42
2	0,29212	92,04
3	0,34245	107,89
4	0,30645	96,55
5	0,29305	92,33
6	0,29205	92,01
7	0,23293	73,39
8	0,28699	90,42
9	0,28744	90,56
10	0,26696	84,11
Média amostras	0,293503	92,47
DP	0,0311	
DPR	0,29	

Tabela 43. Cálculo da precisão entre dois dias consecutivos com o mesmo analista para amostras de azatioprina

Parâmetros	Amostra DIA 1	Amostra DIA 2
MÉDIA (n=6)	5095	5164
DP	69,8	70,6
DPR (n=10)	1,25	0,90
DP ENTRE DIAS		70,2
DPR ENTRE DIAS		1,07

Tabela 44. Resultados de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e recuperação entre cinco amostras para cálculo da precisão entre dois analistas para análise de resíduo para azatioprina

Analista	Amostra	Absorção	Recuperação (%)
1	1	0,34808	109,66
	2	0,3118	98,23
	3	0,30675	96,64
	4	0,29457	92,80
	5	0,30213	95,18
	Média	0,31267	98,51
2	6	0,29301	92,31
	7	0,28131	88,62
	8	0,30664	96,60
	9	0,30670	96,62
	10	0,32959	103,84
	Média	0,30345	95,60
Média entre analistas		0,30806	
		DP 0,02	97,06
		DPR 6,16	

Tabela 45. Resultados de teste de recuperação para solução padrão de azatioprina adicionado a amostras e analisados por espectrometria do UV

AMOSTRA	Concentração de padrão adicionada em $\mu\text{g/mL}$	Concentração recuperada em $\mu\text{g/mL}$	Recuperação (%)	Recuperação média $\pm$ DP
1	2,0	1,98	99,00	99,19 $\pm$ 0,57
2	4,0	3,95	98,75	
3	6,0	5,99	99,83	

6. DISCUSSÃO

As condições cromatográficas foram definidas partindo-se da obtenção dos valores de comprimento de onda (λ) de absorção máxima de cada substância a ser analisada e da escolha da fase móvel que apresentasse tempo de retenção menor e melhores valores de desvio padrão relativo para as amostras.

O comprimento de onda padronizado para leitura da associação de zidovudina e lamivudina de, 266 nm, não será crítico para análise de CLAE, pois a diferença no valor do λ é pequena, possibilitando assim a análise conjunta das substâncias.

Os resultados de precisão demonstraram repetibilidade adequada frente às condições cromatográficas adotadas, pois o desvio padrão relativo

obtido para todas as substâncias está abaixo de 2,0%, preconizado como ideal.

Após a definição das condições cromatográficas para as substâncias teste, foi realizado um estudo para definição da metodologia de realização do teste de recuperação da amostragem por "swab". O teste de recuperação da amostragem é realizado para padronização do modo correto de amostrar uma superfície de um equipamento de produção, para sua liberação após limpeza e realização da Validação da Limpeza da linha de produção.

Os resultados do teste de recuperação para as substâncias azatioprina, estavudina e zidovudina demonstraram aumento da recuperação com a utilização de ultrassom para auxiliar na dissolução do resíduo, em substituição a agitação e a alteração do volume de solvente de diluição para fase móvel, bem como a utilização do "swab" de poliéster. Sendo assim, foi padronizado o método de amostragem para posterior validação da metodologia.

A validação da metodologia analítica de CLAE para a estavudina apresentou resultados adequados. A precisão observada entre dez amostras com DPR de 7,24% era esperada devido a característica da preparação da amostra para o teste. A metodologia de amostragem apresentou valor médio de recuperação de 78,08%, valor considerado satisfatório por ser maior que 70%, preconizado como ideal.

A validação da metodologia analítica de CLAE para a zidovudina e lamivudina apresentou resultados de repetibilidade adequados. A

metodologia apresentou linearidade, com índice de correlação (R) de 0,9998. A precisão observada entre dez amostras com DPR de 8,92% para lamivudina e 4,60% para zidovudina, também está relacionada à característica da preparação da amostra para o teste. A metodologia de amostragem apresentou valor médio de recuperação de 82,54% para lamivudina e 80,60% para zidovudina.

É importante destacar que a recuperação obtida nos testes preliminares com zidovudina isolada é de 85,74%, demonstrando uma pequena diminuição da recuperação quando presentes os dois compostos. Isto se deve a capacidade do swab de recuperar a quantidade de substância presente na superfície amostrada, contudo esta diminuição não é representativa, pois o valor considerado satisfatório deve ser maior do que 70%, preconizado como ideal.

A validação da metodologia analítica de CLAE para a azatioprina apresentou resultados satisfatórios. O valor da precisão entre as amostras apresentou valor de DPR de 5,83% e a recuperação da amostragem de 79,2%, ambos considerados satisfatórios.

A metodologia analítica por espectrometria no UV para a determinação da azatioprina apresentou resultados promissores para validação como método alternativo à utilização da metodologia por CLAE, podendo ser adotado como método de rotina, devido a facilidade da realização do teste. A amostra apresentou absorção média de 0,293503 em 280nm, ou seja, está dentro da faixa de linearidade para o método, que é de

0,2 a 1,2. No entanto, este método não possibilita quantificação segura de valores inferiores, pois apresenta DPR de aproximadamente 3,0 para análise abaixo de 10,0 µg. Contudo a metodologia não pode ser descartada, podendo ser utilizado como um método limite, onde valores acima do especificado deverão ser considerados como rejeitados.

Para a estavudina, a metodologia por espectrometria no UV não apresentou resultados tão promissores, pois a amostra apresentou absorção média de 0,18093, valor abaixo da faixa de linearidade. Sendo assim, a metodologia de CLAE continua sendo o método de escolha para esta substância.

Para a associação de lamivudina e zidovudina existe a dificuldade para padronização da metodologia de UV, pois ambas as substâncias apresentam alta absorção em comprimentos de onda muito próximos, colocando a CLAE como metodologia de escolha para a associação.

7. CONCLUSÃO

Pelos estudos realizados pode-se concluir que:

- A validação da metodologia por CLAE para análise de amostras contendo resíduos de azatioprina, estavudina e da associação de lamivudina e zidovudina é adequada e pode ser utilizada para a realização da Validação de Limpeza de linha de produção.
 - A metodologia por espectrometria no UV apresentou-se como bom método de análise de rotina e alternativa à utilização da CLAE para a Validação de Limpeza da associação entre lamivudina e zidovudina.
 - Em estudos futuros poderão ser verificadas a utilização da metodologia de cromatografia em camada delgada de alta eficiência e de outras metodologias para validação da análise de resíduos de produtos farmacêuticos em equipamentos utilizados na produção industrial.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGALLOCO, J.; BRAME, W.; FERENC, B.; HALL, W.E.; JENKINS, K.
Points to consider for cleaning validation **PDA J. Pharmac. Sci.** -
Technical Report, n.29, p.1-22., 1998
2. AIDS no Brasil. Disponível em: [http: // www. Aids.gov.br](http://www.Aids.gov.br) Acesso em:
10/07/2003.
3. BISMUTH, G., NEUMANN,S. **Cleaning Validation**. 1.ed. Englewood:
Interpharm Press, 1999.

<p>Nota: As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).</p>
--

-
4. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 210, de 4 de agosto de 2003. Normatiza as Boas Práticas de Fabricação para a Indústria de Medicamentos e outras considerações. **Diário oficial da União**, 04 ago 2003.
 5. BRASIL. Resolução n ° 89, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jul. 2003.
 6. BRITTAIN, H. G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharm. Techn.** p.4-9,1998
 7. CARR, A. ; COOPER, D.A. Adverse effects of anti-retroviral therapy – **Adverse drug reactions**, Australia, v.356, p. 1423-1430, 2000.
 8. DERVIEUX, T.; BOULIEU,R. Simultaneous determination of 6-thioguanine and methyl 6-mercaptopurine nucleotides of azathioprine in red blood cells by HPLC. **Clinical Chemistry** v.44, n.3, p.551-555, 1998
 9. ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. **J. Pharm. Biomed. Anal.** Amsterdam, v.24, p. 755-767, 2001
-

10. EUROPEAN COMMISSION. Guide to Good Manufacturing Practice, Anexo 15 Brussels Commission of the European Communities, 2001 11p.
11. FAN, B.; STEWART, J. T. Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC **J. Pharm. Biomed. Anal.** Amsterdam, v.28, p.903-908, 2002
12. FDA. Guide to Inspections Validation of Cleanning Processes Disponível em: http://www.fda.gov/ora/inspect_ret/lgs/valid.htm Acesso em : 19/02/2003
13. GENNARO, A. R. **Remington - The Science and Practice of Pharmacy**. 20 ed. Washington: Lippincott, 2002.
14. GOBBA F. Occupational exposure to chemicals and sensory organs: A neglected research field. **Neurotoxicology**. Amsterdam, v.24, n.4-5, p.675-691, 2003
15. GOGU, S. R.; AGRAWAL, K. C. The protective role of zinc and N-acetylcysteine in modulating zidovudine induced hematopoietic toxicity. **Life Science**. New Orleans, v.59, n.16, p.1323-1329, 1996
-

-
16. HOBBS, G.A.; KEILBAUCH, S.A.; RIEF, P.M.; SIMPSON, M.V. Cellular targets of 3'-azido-3'-deoxythymine: an early (non-delayed) effect on oxidative phosphorylation **Bioch. Pharm.** v.50, n.3, p. 381-390, 1995
17. HPFB – Inspectorate – Health Products and Food Branch – Canadá
Cleaning Validation Guidelines. Disponível em
<file:///a:/guia%20canada.htm>. Acesso em 09/09/03.
18. <http://www.toxnet.net>. Acesso em 11/10/2003
19. ICH. INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION Q2b
Text on validation of analytical procedure methodology. Disponível em:
<http://www.ich.org>. Acesso em 19/09/2003.
20. KASHUBA, A. D. M.; DYER, J. R.; KRAMER, L. M.; RAASCH, R. H.;
ERON J. J.; COHEN, M. S. Anti-retroviral-drug concentrations in semen:
implication for sexual transmission of human immunodeficiency virus
type 1 **Antimicrobial agents and Chemotherapy** v.43, n.8, p.1817-1826,
1999
-

21. KATONA, Z.; VINCZE, L.; VEGH, Z.; TROMPLER, A.; FODOR, K. F.
Cleaning Validation procedure eased by using overpressured layer chromatography. **J. Pharm. Biomed. Anal.** Amsterdam, v.22, p. 349-353, 2000
22. KLINKENBERG, R.; STREEL, B.; CECCATO, A. Development and validation of a liquid chromatography method for the determination of amLodipine residues on manufacturing equipments surfaces. **J. Pharm. Biomed. Anal.** Amsterdam, v.32, p. 345-352, 2003.
23. LAPOINTE N.; SAMSON J.; PELLETIER V.; LEMAY M.; BONNIN A.C.; BOUCHER M.; VALOIS S.; KHAMMY A. . Anti-retroviral toxicity in neonates exposed to mono- double or triple therapy for 6 weeks **AIDS**. v. 14, suppl.4, 2000
24. LEE, H.; HANES, J. AND JOHNSON, K. A. Toxicity of Nucleoside analogues to Treat AIDS and the selectivity of the Mitochondrial DNA polymerase **Biochemistry**, Austin, v.42, n.50, p.14711-14719, 2003.
25. MARTINDALE, W.H. **The Extra Pharmacopeia**. 31ed. London: Royal Pharmacopeira Society, p. 622 – 625; 630-631, 1996.
-

-
-
26. MERCK Index 12ed. Whitherhouse Stationp.114; 1720, 1996
27. MIRZA, T.; LUNN, M. J.; KEELEY, F. J.; GEORGE, R. C.;
BODENMILLER, J. R. Cleaning level acceptance criteria and high
pressure liqy=uid chromatography procedure for the assay of meclizine
hydrochlride residue in swabs colleted from pharmaceutical
manufacturing equipament surface. **J. Pharm. Biomed. Anal.**
Amsterdam, v. 19, p. 747-756, 1999
28. MOSER, M.; CALDERARI, G.; MORINI, P. Cleaning Validation of a
multipurpose plant for active pharmaceutical ingredient bulk production
Chimia. v.54, p.731-733, 2000.
29. MULLER, X. M. Drug Immunosuppression therapy for Adult Heart
Transplantation. Part 1: Immune Response to allograft and Mechanism of
action of Immunosuppressants **Ann. Thorac. Surg.** Quebec, v.77, p.354-
362, 2004.
30. NASCIMENTO, J. E.; MAGALHÃES, N. S. S.; RIBEIRO, R. M.;
PONTES,A.; ALVES, A. J. Avaliação farmacocinética de comprimidos
contendo lamivudina e zidovudina em plasma humano. **Revista
Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** São Paulo, v.40, n.1, p.59-66,
2000
-
-

31. NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIIRMENEZ, J. J. MARTINS, M.T.
Development and validation of an LC assay for sumatriptan succinate residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals. **J. Pharm. Biomed. Anal.** Amsterdam, v.30, p.285-29, 2002.
32. NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIIRMENEZ, J. J. MARTINS, M.T.
Development and validation of a liquid chromatography method for determination of lacidipine residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals **J. Chromatogr. A.** Amsterdam, v.1024, p.115-122, 2004
33. NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; JIIRMENEZ, J. J. MARTINS, M.T..
Validation of the removal of acetylsalicylic acid recovery and determination of residues on various surfaces by high performance liquid chromatographic **J. Chromatogr. A.** Amsterdam, v. 970, p.69-75, 2000
34. OMS. Validation of manufacturing processes In: Guide to Good manufacturing practices 2001 Disponível em: www.oms.org Acesso em: 15/10/2003.
35. ORR, J.D.; KRULL, I.S.; SWARTZ, M. E. Validation of impurity methods Part I **ICGC North America** v.21, n.7, p.627-633, 2003
-

36. PAPATEODORIDIS, G. V. Review Article: current management of chonic Hepatite B **Aliment. Pharmacol. Ther**, England, v.19, p. 25-37, 2004.
37. PIC. Principles of Qualification and Validation in Pharmaceutical Manufacture Convention for the Mutual Regognitian of Inspections in respect of the Manufacture of Pharmaceutical Products nº 5 Genova: PIC, 1996 p.
38. RACHLIS A., FANNING M.M. Zidovudine Toxicity - Clinical-Features And Management **Drug Safety**, v.4, n.8, p.312-320, 1993
39. REZEK, N. L.; TIDWELL, R. R.; KASHUBA, A. D. M. Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse trnascriptase inhibitor and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr. B**. Amsterdam, v.791, p.137-1347, 2003
40. REZEK, N. L.; TIDWELL, R. R.; KASHUDA, A. D. M. Simultaneous determination of lamivudina and zidovudine concentrations in human seminal plasma using high-performance liquid chromatography and tander mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**. Amsterdam, v.742, p.173-183, 2000
-

41. RIBANI, M, BOTTOLI, C G, COLLINS, C H. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quím. Nova**, São Paulo, v.27, n. 5, p.771-780, 2004.
42. SCHIFFMAN, A.; LUY, B.; BATTIG, M.; LEUENBERGER, H. WIP/CIP and closed equipment systems in field of pharmaceutical solid dosage forms **Pharmazeutische Industrie**, Berlim, v.63, n. 2, p. 203-212, 2001
43. SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis **J. Chromatogr. A**. Amsterdam, v.987, p.57-66, 2003
44. SIMON, V.A.; THIAM, M. D.; LIPFORD, L. C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high-performance liquid chromatography **J. Chromatogr. A**. Amsterdam, v.913, p.447-453, 2001
45. UNITED States Pharmacopeia. 26ed. Rockville: United States Pharmacopeia, 2000 p.150, 1641, 2439-2442
-

-
46. VALENTIN, L. C.; SANTAMARINA, Z. H.; ARMAS, M. D.; GOMEZ, I. W.
Validación de la limpieza del reactor empleado en la preparación de
medicamentos **Rev. Cubana Farm**, Habana, v.35, n.1, p.34-39, 2001
47. VanOS, E. C.; McKINNEY, J. A.; ZINS, B. J.; MAYS, D. C.; SCHRIVER,
Z. H.; SANDBORN, W. J.; LIPSKY, J. J. Simultaneous determination of
azathioprine and 6-mercaptopurine by high-performance liquid
chromatography. **J. Chromatogr. B**. Amsterdam, v. 679, p. 147-154,
1996.
48. VLOSOV, A.; ALEXANDER, C.; TING, L.; SOLDIN, S. J. Simple rapid
method for quantification of anti-retrovirals by liquid chromatography –
tandem mass spectrometry **Clinical Biochemistry** v.35, p. 99-103, 2002
49. VOVK, I.; SIMONOVSKA, B.; ANDRENESEK, S. Cleaning validation by
TLC determination of norfloxacin as residues on pharmaceutical
equipment surfaces. **J. Chromatogr. A**. Amsterdam, v.862, p.209-215,
1999
50. WESTMAN, L.; KARLSSON, G. Methods for detecting residues of
cleaning agents during cleaning validation. **PDA J. Pharmac. Sci.** v.54,
n.5, p.365-371, 2000.
-

51. WILLIAMS, D. A., LEMKE, T.L. **Foyle's Principles of Medicinal Chemistry**, 5th ed, London: Lippincott, 2002 p. 952-977

615, 40685
p 536