

Maio 2011
Revisão: Maio 2013

GUIA PARA O CÁLCULO DO PERÍODO DE CARÊNCIA EM TECIDOS COMESTÍVEIS



Guia nº 3 - G.F.



AUTORES

Participaram na realização deste guia membros das seguintes instituições que fazem parte do grupo ad hoc de Fármacos Veterinários da Fundação PROSAIA:

Relação em ordem alfabética:

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE):

Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET):

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

- Divisão de Produtos Veterinários e Alimentos para Animais. Divisão Nacional de Agroquímicos, Produtos Veterinários e Alimentos – SENASA.
- Coordenação de Resíduos Químicos da Divisão de Laboratório Animal - Divisão Geral de Laboratório e Controle Técnico – SENASA.

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA):

- Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As. – Tandil.

Universidad Nacional del Litoral (UNL):

- Cadeira de Farmacologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Nacional del Litoral.
- Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade Nacional del Litoral.

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

- Cadeira de Farmacologia, Faculdade de Ciências Veterinárias e Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nacional de La Plata.

Coordenação do grupo a cargo del Dr. Javier Pardo (Fundação PROSAIA)



Tabela de Conteúdos

Prólogo	4
1. Introdução.....	6
2. Glossário.....	6
3. Alcance do guia.....	9
4. Estimativa do período de carência	9
4.1. Modelo estatístico	9
4.1.1. Banco de dados.....	10
4.1.2. Supostos da análise de regressão linear.....	11
4.1.2.1. Homogeneidade de variâncias (homocedasticidade)	11
4.1.2.2. Linearidade do \ln dos dados experimentais	11
4.1.2.3. Normalidade dos erros	11
4.1.3. Procedimento estatístico baseado no LMR	12
4.1.4. Procedimento alternativo baseado no LMR	13
4.2. Tempo de carência estimado a partir dos resíduos no local de injeção.....	13
4.2.1. Interpretação.....	14
4.2.2. Princípios gerais	14
4.2.3. Desenho do estudo e coleta de amostras	14
4.2.4. Procedimento baseado no LMR	15
4.2.5. Procedimento baseado na IDA	15
4.2.6. Procedimento baseado no limite de exposição alternativo.....	17
5. Referências	21
6. Anexo	22



Prólogo

PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de productos farmacéuticos veterinarios.

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el acecho de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de productos farmacéuticos veterinarios y biológicos de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria - inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los productos farmacológicos. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los productos farmacéuticos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

Las Buenas Prácticas de Manufactura.

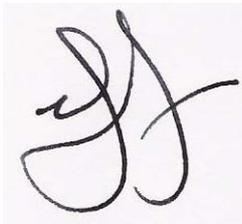
“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura,



HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de antibióticos, garantía de que los productos farmacológicos utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Productos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.



Dr. Carlos Van Gelderen



Dr. Alejandro Schudel



1. Introdução

A segurança do consumidor precisa ser resguardada através da valoração de todas as substâncias farmacologicamente ativas destinadas a serem usadas em animais produtores de alimentos. Os períodos de carência são determinados com o objetivo de assegurar que os resíduos de tais substâncias nos tecidos comestíveis se reduzam até concentrações permitidas.

Enquanto o limite máximo de resíduos (LMR) para um determinado tecido é aplicado para o princípio ativo em si mesmo, o período de carência é determinado de forma individual para cada medicamento veterinário como parte do processo de autorização de comercialização.

O princípio ativo incluído no medicamento veterinário que é administrado aos animais produtores de alimentos não necessariamente é a substância que estará presente nos produtos comestíveis. Os sistemas enzimáticos ou fluidos fisiológicos de um animal podem agir sobre esse princípio ativo administrado e produzir novas substâncias como metabolitos que podem ser tanto ou mais nocivos para o consumidor do que o princípio ativo original. A concentração destas substâncias nos produtos comestíveis de origem animal será em função da velocidade e do grau de absorção do agente farmacológico original, a velocidade do metabolismo e a taxa de excreção tanto do princípio ativo original quanto de seus metabolitos. Portanto, o resíduo total do agente farmacológico administrado nos animais tratados estará composto pelo princípio ativo original, metabolitos livres e metabolitos que estão unidos a moléculas endógenas.

Devido a que os diferentes componentes dos resíduos totais podem diferir em seus potenciais toxicológicos, é que se deve fornecer informação sobre a natureza química, a quantidade e a persistência dos resíduos totais nos tecidos comestíveis dos animais que foram objeto do tratamento.

A forma mais simples e prática de determinar o período de carência tem sido a de identificar o momento em que as concentrações permanecem abaixo do LMR em todos os tecidos monitorados de todos os animais experimentais. Em alguns casos, e quando existe uma variabilidade marcada entre os dados de eliminação, é de praxe acrescentar um período como fator de segurança.

Em alguns casos, foram utilizados métodos estatísticos que, de ser aceitos de forma generalizada, gerariam uma grande oportunidade de harmonização.

A escolha do método estatístico a ser utilizado é responsabilidade do solicitante e, em qualquer caso, deverá estar devidamente justificado com documentos adequados.

Neste guia, são descritos os procedimentos padronizados para poder estabelecer o período de carência apropriado para cada princípio ativo associado a uma forma farmacêutica, dose e via de administração proposta para uma determinada espécie animal, a fim de garantir a segurança do consumidor.

2. Glossário

Cesta básica de alimentos padrão: É uma estimativa da quantidade total de alimento de origem animal que é consumida diariamente por um adulto de 60kg. A cesta básica de alimentos utiliza valores arbitrários de consumo que se baseiam nos percentis superiores da ingestão diária de alimentos de origem animal.

Os valores de consumo diário de alimentos de origem animal são:



Para mamíferos:

300 g de músculo, 50 g de gordura ou gordura e pele, 100 g de fígado e 50 g de rim.

Para aves:

300 g de músculo, 90 g de gordura e pele, 100 g de fígado e 10 g de rim.

Para peixes:

300 g de músculo e pele em proporções naturais

Também, considera-se um consumo de 1,5 l de leite, 100 g de ovos e 20 g de mel.

A estimativa do risco de consumo de resíduos presentes em uma cesta básica de alimentos se realiza considerando a IDA.

Princípio ativo – Agente Farmacológico (do inglês API: Active Pharmaceutical Ingredient):

É toda substância que pode ser utilizada para a cura, mitigação, tratamento, prevenção ou diagnóstico das doenças do homem ou dos animais.

Ingestão Diária Aceitável (IDA): É a estimativa do resíduo, expresso em termos de unidades de peso por quilograma de peso vivo (kg/pv), que pode ser ingerido diariamente durante toda a vida, sem risco apreciável para a saúde do consumidor.

Intervalo de confiança: É uma série de valores entre os quais se espera achar com certo grau de certeza o valor de um parâmetro populacional, neste caso, a pendente da reta de regressão linear.

Limite Máximo de Resíduo (LMR): É a máxima concentração permitida de resíduo marcador em um tecido animal (ex. fígado, rim, músculo ou gordura) ou produto animal, que resulta do uso de um medicamento veterinário, expresso em mg/kg (ppm) ou µg/kg (ppb) sobre peso fresco, conforme a legislação vigente.

Limite de quantificação (LOQ): É a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um aceitável nível de exatidão e precisão.

Limite de detecção (LOD): É a menor concentração de analito a partir da qual é possível demonstrar a presença do mesmo na amostra experimental com um grau aceitável de certeza.

Limites de tolerância: São os valores extremos de uma série de valores (intervalo) entre os quais se espera achar com certo grau de certeza uma determinada porcentagem dos indivíduos de uma população determinada.

Medicamento veterinário: toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada (elaborada) cuja administração se faça de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, cura ou tratamento das doenças dos animais.

Período de Carência – Período de Retirada – Restrição de Uso – Período de Supressão:

Período de tempo mínimo que deve decorrer entre a última aplicação de um medicamento veterinário a um animal, nas condições normais de emprego, e a obtenção de produtos alimentícios desse animal, para garantir que tais produtos alimentícios não contenham resíduos em quantidades que superem os limites máximos estabelecidos.

Produto Veterinário (definido segundo CAMEVET): Entende-se por produto veterinário toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração, seja individual ou coletiva, diretamente administrada ou misturada com os alimentos ou água de bebida, destinada à prevenção, diagnóstico, cura ou tratamento das doenças dos animais, incluindo aditivos, suplementos, promotores, melhoradores da produção animal, antissépticos,



desinfetantes de uso ambiental ou em equipamentos e ectoparasiticidas e todo outro produto que, utilizado nos animais e no seu habitat, proteja, restaure ou modifique suas funções orgânicas e biológicas. Compreende também os produtos destinados ao embelezamento dos animais.

Resíduo marcador: É um analito que é confiável para determinar a presença de resíduos de uma determinada droga em um tecido. O resíduo marcador pode ser a molécula mãe ou qualquer um de seus metabolitos, produtos de degradação ou uma combinação de qualquer um destes. O marcador também pode ser um derivado químico de um ou vários dos componentes do resíduo. A relação entre o resíduo marcador e a concentração dos resíduos de interesse nos tecidos comestíveis deve ser conhecida (resíduo marcador/ resíduos de interesse). O LMR reflete, então, a maior concentração permitida do resíduo marcador nos tecidos comestíveis.

Resíduo total: Termo que faz referência à totalidade dos resíduos relacionados. O total de resíduos normalmente inclui todos os resíduos relacionados ao agente farmacológico (molécula mãe junto com seus metabolitos) e, na maior parte dos casos, é idêntica à totalidade de resíduos determinada por estudos radiométricos de depleção tecidual.

Resíduos de importância toxicológica: Para fazer a estimativa de uma exposição baseada em uma IDA toxicológica, o resíduo de interesse é o resíduo de importância toxicológica. Este inclui normalmente todos os compostos relacionados com a molécula (molécula mãe com os metabolitos) e, na maior parte dos casos, é idêntica à totalidade de resíduos determinada por estudos de depleção tecidual radiométricos. No entanto, se for demonstrado que um componente do resíduo ou uma fração da totalidade dos resíduos é toxicologicamente inativo, é possível descontá-la do resíduo total ou de qualquer outra fração de resíduos que não seja biodisponível por via oral ou de metabolitos dos que se sabe que são toxicologicamente inativos.

Resíduos de interesse farmacológico: Para fazer a estimativa de uma exposição baseada em uma IDA farmacológica, o resíduo de interesse é o resíduo de importância farmacológica. Normalmente, é considerada a molécula mãe mais qualquer outro resíduo da mesma. Frente à ausência de dados sobre atividade farmacológica dos componentes do resíduo total, assume-se que o total de resíduos apresenta a mesma atividade farmacológica que a molécula mãe.

Resíduos de interesse microbiológico: Para fazer a estimativa da exposição baseada em uma IDA microbiológica, o resíduo de interesse é o que tem importância microbiológica. Na maior parte dos casos, é idêntico aos resíduos que são determinados em ensaios microbiológicos. Frente à ausência de tais dados, pode ser usado o resíduo total ou alternativamente a soma dos componentes individuais dos que se sabe apresentam atividade microbiológica. Portanto, admite-se que a atividade microbiológica do resíduo total ou dos metabolitos e/ou produtos de degradação é igual à molécula mãe.

Local da injeção: É uma área do tecido na qual o medicamento veterinário foi injetado. As amostras de tecido obtidas dos locais de injeção para a realização de estudos de resíduos devem ser representativas do que, com probabilidade, será selecionado como tecido comestível nos procedimentos de abate. A amostra de tecidos deverá incluir tecido muscular, tecido conectivo e gordura subcutânea em proporções naturais (o recorte das amostras para eliminar o tecido conectivo e a gordura aderida ao músculo é considerado um procedimento artificial que se afasta da situação real). Os locais de injeção não devem incluir a porção de pele que os cobre, já que a mesma não é requerida para a análise dos resíduos.

Tecido: Todo tecido animal comestível, inclusive músculos e subprodutos (Definições estabelecidas e adotadas pelo Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares - JECFA).



3. Alcance do guia

Este guia é uma recomendação para o cálculo de períodos de carência adequados para tecidos comestíveis provenientes de animais produtores de alimentos quando a eles se administra um medicamento veterinário (MV) determinado, em uma tentativa de harmonizar a metodologia utilizada internacionalmente para esses fins. Este guia também coloca a ênfase na determinação do tempo de carência pelo método estatístico baseado no limite máximo de resíduos (LMR), que é considerado de primeira escolha.

O guia não tem como alcance o cálculo de períodos de carência em outros produtos de origem animal como leite, ovos, mel e produtos de aquicultura, já que estes requerem uma outra consideração.

Procedimentos descritos:

- Procedimento estatístico baseado no LMR
- Procedimento alternativo baseado no LMR.
- Tempo de carência pré-abate estimado a partir dos resíduos no local de injeção (inclui método baseado no LMR, IDA e procedimento baseado no limite de exposição alternativo).

Os estudos de resíduos mencionados devem incluir a descrição e a validação dos métodos analíticos (ver Guia PROSAIA 2: “Guia para a Validação de Métodos Analíticos para a Determinação de Resíduos em Matrizes Biológicas”).

Para o desenho experimental da fase animal, recomenda-se ver o Guia PROSAIA 1 “Guia técnico para a Condução de Estudos de Metabolismo e Cinética de Resíduos de Agentes farmacológicos de Uso Veterinário em Animais Produtores de Alimentos”

4. Estimativa do período de carência

4.1. Modelo estatístico

O cálculo do período de carência mediante o método estatístico se baseia em princípios aceitos de farmacologia básica. Tomando como base um modelo farmacocinético de um compartimento, a relação entre a concentração de um princípio ativo e o tempo durante as fases de absorção, distribuição e eliminação, pode ser descrita por termos matemáticos multi-exponenciais. Entretanto, a eliminação da substância e/ou metabolitos a partir dos tecidos dá lugar a uma curva de concentrações teciduais que segue um declínio exponencial de ordem um, que pode ser adequadamente descrito por um modelo de um compartimento com um só termo exponencial. A equação de primeira ordem aparente que descreve a cinética de depleção tecidual é a seguinte:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

onde C_t é a concentração tecidual em um tempo dado, C_0 é a concentração do resíduo no tempo zero, e é a base dos logaritmos naturais, k é a constante de primeira ordem aparente de eliminação e t é o tempo.

O termo C'_0 representa o ponto de interseção no eixo da ordenada a tempo zero, o mesmo é, na verdade, só uma concentração teórica necessária para o ajuste dos dados experimentais com o



modelo de um só termo exponencial . Por pertencer a uma equação que descreve uma função exponencial decrescente, a constante leva sinal negativo.

A linearidade do gráfico do logaritmo natural das concentrações teciduais em função do tempo ($\ln C_t$ vs t), proporciona evidência de que o modelo de um termo exponencial é aplicável e que a análise estatística de regressão linear dos dados transformados logaritmicamente pode ser considerada como método confiável para a estimativa do período de carência. Nesse caso, os dados experimentais podem ser descritos pela equação de primeiro grau, também conhecida como equação geral de uma reta que está dada pela seguinte expressão:

$$y = a + bx$$

onde y é um valor sobre o eixo da ordenada, x é um valor no eixo da abscissa, a é o ponto onde a reta cruza o eixo da ordenada e b indica a quantidade com a qual y muda por cada unidade de mudança em x . O valor de a é conhecido como ordenada na origem y o valor de b como pendente da reta.

O procedimento utilizado para obter a reta desejada é conhecido como método de quadrados mínimos, e a reta resultante (melhores valores médios estimados em cada ponto da amostragem) é conhecida como reta de quadrados mínimos.

4.1.1. Base de dados

A análise de regressão linear requer que os dados experimentais sejam independentes uns dos outros. Em geral, os dados de depleção tecidual reúnem esta condição devido a que surgem de indivíduos diferentes.

Caso se disponha de medições em duplicata ou triplicata de concentrações teciduais de uma única amostra, será utilizado o valor médio para a realização da análise de regressão linear .

Para evitar o erro no cálculo da pendente e o ponto de interseção, cada dado de concentração tecidual deverá surgir, sempre que for possível, do mesmo número de medições repetidas.

Os dados experimentais de concentração tecidual que forem menores ao limite de detecção (LOD) e menores ao limite de quantificação (LOQ) serão considerados como valores opcionais e seu uso deverá ser fundamentado corretamente.

Devem ser excluídos da análise os dados experimentais reportados como menores ao LOD.

Quando todos ou alguns dos dados experimentais reportados em um dia de abate forem “opcionais”, deverá ser considerada a possibilidade de excluir da análise o tempo de abate correspondente. É preciso levar em conta que existe a necessidade de um mínimo de três pontos de amostragem (dias de abate) determinados durante a fase de eliminação terminal e um mínimo de três amostras (animais) por ponto de amostragem para poder realizar uma análise de regressão linear.

Como indicação geral, de acordo com a espécie animal, deveriam ser utilizados entre 4 e 10 animais por ponto de amostragem (dia de abate). Um esquema básico seria contar com dados de



concentrações teciduais de 16 (dezesseis) animais, os quais seriam abatidos em grupos de 4 (quatro) indivíduos em 4 (quatro) dias de abate convenientemente distribuídos.

Os dados experimentais de concentração tecidual devem ser reportados tal qual foram quantificados, isto é, sem ser corrigidos pelos valores de recuperação da técnica analítica, os quais devem ser anexados aos dados dos experimentos de recuperação e o fator de correção que deriva deles. Neste caso, antes de realizar a análise de regressão linear, os dados experimentais devem ser corrigidos com o fator de correção de recuperação antes de ser transformados logaritmicamente.

4.1.2. Supostos da análise de regressão linear

Para realizar uma análise de regressão linear é necessário que se cumpram os seguintes pressupostos básicos:

- Que existe homogeneidade de variâncias (homocedasticidade) entre os \ln dos dados experimentais em cada ponto de amostragem (dia de abate).
- Que existe linearidade dos \ln dos dados experimentais em função do tempo.
- Que existe distribuição normal (gaussiana) dos erros.

4.1.2.1. Homogeneidade de variâncias (homocedasticidade)

Deve-se confirmar que as variâncias dos \ln dos dados experimentais dos diferentes dias de abate são homogêneas. Diferentes testes estatísticos podem ser usados para este propósito, como o teste de Bartlett₁, o teste de Hartley₉ e o teste de Cochran₁₆.

4.1.2.2. Linearidade do \ln dos dados experimentais

A inspeção visual do gráfico dos \ln dos dados experimentais em função do tempo é, frequentemente, suficiente para assegurar que existe relação linear entre os dados experimentais.

Um desvio da linearidade dos \ln dos dados experimentais nos primeiros tempos de amostragem pode indicar que o processo de distribuição dos resíduos marcadores ainda não foi concluído e, portanto, estes pontos deveriam ser excluídos da análise.

Desvios da linearidade nos últimos pontos de amostragem podem ser por causa de concentrações abaixo do LOD, portanto, o processo cinético de depleção tecidual não deve ser considerado nestes tempos de amostragem e está justificada a exclusão destes valores da análise estatística.

Deve-se levar em conta que os outros dados experimentais presentes nos restantes pontos de amostragem devem ser conservados, a menos que a sua exclusão esteja devidamente justificada.

Para assegurar estatisticamente a linearidade da reta de regressão, é preciso realizar uma análise de variância. O procedimento consiste em comparar a variação entre os grupos de médias e a reta estimada com a variação entre animais dentro dos grupos.



4.1.2.3. Normalidade dos erros

A distribuição normal dos erros pode ser observada mediante inspeção visual das residuais ordenadas versus sua frequência de distribuição acumulativa em uma escala de probabilidade normalizada.

As residuais são as diferenças entre os valores observados e seus correspondentes valores estimados (diferença entre os valores transformados logaritmicamente e os valores estimados pela reta de regressão).

Uma linha reta indica que a distribuição das residuais observada é consistente com o pressuposto de uma distribuição normal. Para verificar os resultados do gráfico de residuais, pode ser aplicado o teste de Shapiro-Wilk¹³. Este teste tem demonstrado eficácia mesmo em presença de amostras pequenas.

O gráfico da frequência acumulativa de distribuição das residuais pode ser usado com um teste muito sensível. Os desvios a partir da linha reta indicam uma distribuição não normal das residuais, que pode ser por causa de:

- Desvios a partir da normalidade dos dados das concentrações teciduais dos resíduos marcadores transformados logaritmicamente dentro de um ou mais grupos de abate.
- Desvios a partir dos valores estimados pela regressão linear (reta de regressão).
- Não homogeneidade de variâncias (heterocedasticidade).
- Valores aberrantes.

Na apresentação dos dados experimentais usando as residuais normalizadas (residual dividida pelo erro residual S_y , x), um valor aberrante poderia apresentar um valor <-4 o $> + 4$, indicando que a residual apresenta um valor desviado quatro desvios padrão da linha de regressão.

4.1.3. Procedimento estatístico baseado no LMR

O período de carência deverá ser calculado usando os resultados dos dados estimados pela linha de regressão. O período de carência é o tempo em que o limite superior do intervalo de tolerância a 95% estimado com um intervalo de confiança a 95% intercepta o valor do limite máximo de resíduos (LMR).

Se este tempo não corresponde a um dia completo, o período de carência estimado se arredonda até o dia seguinte. Por exemplo, se o período de carência estimado é 6,3 dias, então, este será fixado em 7 dias.

O valor do limite superior do intervalo de tolerância a 95% com um intervalo de confiança a 95% será calculado utilizando o método de distribuição de t não centralizado que se descreve no anexo.

Não é válido estimar o período de carência a partir da ausência de dados de concentração tecidual menores que o LMR. Portanto, para calcular o mesmo, é necessário contar com dados experimentais que apresentem valores menores que LMR, pelo menos, no último tempo de amostragem. Dada esta perspectiva, é necessário que o LOQ da técnica analítica seja sempre menor que o LMR utilizado.

O período de carência pode ser estimado usando o software WT1.4 recomendado pela FDA e pela EMEA, que é uma versão informatizada do método descrito no U.S Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA)⁵. O período de carência também pode ser



estimado usando o método desenvolvido por Stange¹⁴ e proposto pela EMEA⁵, que é metodologicamente mais simples de realizar e fornece resultados comparáveis com o método que utiliza a distribuição de t não centralizado.

4.1.4 Procedimento alternativo baseado no LMR

Este procedimento, também conhecido como “regra de decisão”, é um método alternativo quando os dados experimentais disponíveis não permitem o uso do modelo estatístico baseado no LMR.

Não é possível propor recomendações gerais para este procedimento, já que os resultados dependerão do tamanho da amostra, do momento em que se realize o abate dos animais, da coleta das amostras biológicas, da variabilidade dos dados experimentais e dos fatores relacionados com a metodologia analítica.

O método se baseia em estabelecer o período de carência no momento em que as concentrações teciduais de todos os animais se encontrarem abaixo do valor do LMR⁷. No entanto, uma vez que foi calculado o tempo, deve ser estabelecida uma margem de segurança para compensar a incerteza biológica que representa a variabilidade da cinética de depleção tecidual.

A dimensão da margem de segurança dependerá de vários fatores relacionados com o desenho experimental e com as propriedades farmacocinéticas do princípio ativo estudado.

Apesar de não ser possível oferecer uma recomendação geral aplicável a todos os casos, um guia aproximado para calcular a duração da margem de segurança é aumentar em 10% - 30% o valor do tempo em que todas as concentrações teciduais se encontram abaixo do LMR. A outra alternativa é aumentar o mencionado tempo em um valor equivalente a 1-3 vezes a meia-vida de depleção tecidual.

4.2. Tempo de carência estimado a partir dos resíduos no local de injeção

Além do efeito da formulação, da dose e da frequência de administração, a via de administração também exerce uma influência substancial sobre a duração do período de carência. As formulações injetáveis podem apresentar uma cinética de eliminação de resíduos a partir do local de injeção significativamente mais lenta que a observada nos demais tecidos comestíveis.

Este fenômeno pode ser atribuído ao desenho de sistemas de liberação lenta, formulações de depósito, propriedades físico-químicas da molécula, a via de administração subcutânea, intramuscular ou outros fatores atribuíveis à variabilidade da via de administração (por exemplo, no tecido conectivo entre os músculos semitendinoso e semimembranoso).

Logo depois da administração, reações teciduais como fibrose, encapsulamento, necrose ou outro tipo de dano, bem como a dispersão não homogênea de certas formulações, podem provocar a liberação retardada dos agentes farmacológicos a partir do local da injeção. Consequentemente, os resíduos neste local podem ser muito elevados em comparação com os demais tecidos comestíveis, tendendo a se reduzir de forma errática. Portanto, a variabilidade entre animais pode ser elevada.

Diferentemente de outros tecidos, a localização exata das amostras dos locais de injeção destinadas a serem analisadas pode ter um impacto considerável sobre a concentração de resíduos encontrada. Além disso, o metabolismo e/ou degradação dos princípios ativos no local de injeção



pode ocasionar que a composição do resíduo total seja muito diferente a respeito do encontrado em outros tecidos.

Tudo isso demonstra que de um ponto de vista farmacológico, o local de injeção não é comparável de forma direta com músculo ou outros tecidos comestíveis. Da mesma forma, os períodos de carência estabelecidos para tecido muscular de localização remota a respeito do local de injeção não são adequados para assegurar que os resíduos presentes no local de injeção tenham reduzido a concentração em níveis abaixo do LMR e a ingestão diária admissível (IDA). Portanto, os resíduos no local de injeção precisam de uma consideração particular a respeito do risco para os consumidores dos animais tratados.

4.2.1. Interpretação

Deve-se levar em conta que o período de carência no local de injeção estimado conforme este guia, não necessariamente deve ser considerado como o período de carência definitivo para o produto veterinário estudado.

O período de carência no local de injeção deve ser considerado em comparação com os períodos de carência baseados na depleção de resíduos nos outros tecidos comestíveis. Finalmente, o período de carência selecionado para o medicamento veterinário estudado deverá estar devidamente justificado.

4.2.2. Princípios gerais

Para um medicamento veterinário injetável, os resíduos de interesse que permanecem no local de injeção precisam ser conhecidos. No caso dos medicamentos veterinários que contêm novos princípios ativos, é necessário realizar uma apropriada caracterização dos resíduos relacionados com as moléculas ativas, incluindo metabolitos e produtos de degradação e/ou conversão de possível impacto biológico. Esta informação é obtida de estudos de depleção de resíduos radiométricos (por exemplo, resíduo total) ou quando for apropriado, de estudos de depleção de resíduos orientados à caracterização toxicológica, farmacológica e microbiológica dos mesmos.

Para medicamentos veterinários que contêm princípios ativos conhecidos e dos quais é conhecida a composição dos resíduos no local da injeção, os estudos de depleção de resíduos radiométricos não são necessários e só é requerida a valoração do princípio ativo original ou qualquer outro componente relevante do resíduo no local de injeção (por exemplo, o resíduo marcador). A informação referente à relação entre resíduo marcador/resíduo total pode ser obtida a partir da informação disponível na literatura.

Mudanças na composição de excipientes que modifiquem a biodisponibilidade do fármaco podem ter efeitos significativos sobre a depleção de resíduos no local de injeção e, portanto, nestes casos, os estudos de depleção tecidual de resíduos serão necessários para caracterizar a depleção no local da injeção.

Quando o produto injetável contém um derivado do resíduo marcador especificamente formulado (por exemplo, um derivado éster do princípio ativo original), o método analítico deveria ser adaptado para poder determinar a concentração atual do resíduo marcador no local de injeção.



4.2.3 Desenho do estudo e coleta de amostras

Para a coleta da amostra, recomenda-se consultar o Guia nº 1 GF: “Guia Técnico para a Condução de Estudos de Metabolismo e Cinética de Resíduos de Agentes Farmacológicos de Uso Veterinário em Animais Produtores de Alimentos”, item 4.6.2.

O relatório do estudo de depleção de resíduos no local de injeção deverá ser acompanhado de uma descrição completa e detalhada do desenho e as condições experimentais, a seleção do local de injeção do produto, a técnica usada para a injeção, o instrumental utilizado, a profundidade da injeção (intramuscular), medidas tomadas para permitir a localização precisa do local de injeção no momento do abate, detalhe da técnica de obtenção e acondicionamento da amostra.

4.2.4 Procedimento baseado no LMR

Para as substâncias que têm LMR para músculo, o local de injeção é normalmente considerado como tecido muscular e a valoração dos resíduos no mesmo deverá levar em consideração o LMR e a concentração do resíduo marcador no músculo.

O tempo de carência deverá assegurar que a concentração do resíduo marcador no local de injeção se reduziu abaixo do LMR. Neste caso, admite-se que a totalidade do tecido muscular de um animal ao que foi administrada uma formulação injetável por via intramuscular ou subcutânea provém exclusivamente do local de injeção.

Para substâncias lipossolúveis, de aplicação subcutânea em suínos, a amostra do local de injeção deverá ser coletada do panículo adiposo. Nesse caso, os resíduos presentes no panículo adiposo devem ser comparados com o LMR do tecido adiposo.

A experiência mostra que, em muitos casos, o método baseado no LMR dá lugar a uma estimativa segura e adequada do período de carência para o local de injeção. No entanto, quando este procedimento é aplicado, deve-se corroborar que o resíduo marcador no músculo é válido para predizer os resíduos de interesse no local de injeção. Por exemplo, um resíduo marcador não deve ser considerado como apropriado se o mesmo não for um componente do resíduo total no local de injeção (por exemplo, um metabolito que não esteja presente no local da injeção).

Em outras palavras, em certas circunstâncias, o tempo de carência baseado no LMR não necessariamente assegura que a ingestão de resíduos presentes na cesta básica de alimentos, incluindo o local de injeção, esteja abaixo da IDA. Se houver algum indício de que o método baseado no LMR é inconsistente com a IDA, uma estimativa paralela baseada na IDA deverá ser realizada para confirmar que o período de carência estimado é apropriado.

4.2.5 Procedimento baseado na IDA

Para substâncias que não têm LMR estabelecido, o valor de referência para a valoração dos resíduos no local de injeção é a IDA. A valoração dos resíduos no local de injeção mediante a IDA deveria abranger todos os aspectos da substância estudada (a IDA toxicológica, farmacológica e microbiológica).

Dependendo do tipo de IDA, os resíduos de interesse podem ser qualquer um dos resíduos relacionados ou a fração ativa, farmacológica, microbiológica e/ou toxicológica dos resíduos totais.

A ingestão diária de resíduos deve ser calculada usando o consumo padrão baseado na composição da cesta básica de alimentos padrão formada por: 300 g de tecido do local da injeção, 50 g de gordura e pele, 100 g de fígado e 50 g de rim.



O local de injeção, neste caso, deve ser tratado como tecido muscular e os 300 g da porção muscular da cesta básica de alimentos devem representar os tecidos do local da injeção.

O procedimento para calcular o tempo de carência conforme o método baseado na IDA é o seguinte:

- 1- Determinar a quantidade de resíduo de interesse em 300g do local de injeção de cada animal em cada ponto de amostragem (abate) e no restante dos tecidos comestíveis, caso seja necessário, levar em conta a relação resíduo marcador/resíduo de interesse. Admite-se que a porção de 300g de tecido muscular provém total e exclusivamente do local da injeção. Estes 300g de tecido muscular não devem ser confundidos com os 500g da amostra obtida para a determinação da concentração de resíduos. A quantidade de resíduos contida em 300g deve derivar da concentração presente nos 500g de amostra processada.
- 2- Para cada animal, determinar em cada ponto de amostragem a soma dos resíduos na cesta básica de alimentos padrão, em que a quantidade de resíduos em músculo é substituída pela quantidade determinada no local de injeção.
- 3- Caso seja requerida a estimativa do tempo de carência do total de resíduos, a concentração tecidual do resíduo marcador deve ser transformada através do fator de correção determinado pela relação resíduo marcador/resíduos totais, conforme a equação abaixo:

$$IR = (C \times F)/R$$

onde:

IR = ingestão de resíduo.

C = concentração do resíduo marcador.

F = gramas de tecido consumido (segundo a cesta básica de alimentos padrão).

R = relação entre resíduo marcador e concentração total de resíduos.

4- Identificar a IDA apropriada.

5- Estimar o tempo de carência utilizando o procedimento descrito a seguir:

A ingestão diária de resíduos (IR) na cesta básica de alimentos padrão (500g) é determinada para cada animal em cada ponto de amostragem (abate) utilizando a equação abaixo:

$$IR = (C_M \times F_M) + (C_H \times F_H) + (C_R \times F_R) + (C_G \times F_G)$$

Onde:

IR = ingestão diária de resíduo.

C = concentração do resíduo marcador.



F = valores de consumo (0,3 kg de músculo, 0,1 kg de fígado, 0,05 kg de rim e 0,05 kg de gordura).

Subíndices = M (músculo), H (fígado), R (rim) e G (gordura).

Caso seja necessária a estimativa da ingestão diária de resíduos totais, aplica-se o fator de correção derivado da relação entre a concentração do resíduo marcador e a concentração de resíduos totais, como se mostra a seguir:

$$IR = (C_M \times F_M/R_M) + (C_H \times F_H/R_H) + (C_R \times F_R/R_R) + (C_G \times F_G/R_G)$$

Onde:

R = resíduo marcador/resíduo total

A base do método é estabelecer o período de carência no tempo em que os valores de IR de todos os animais se encontram abaixo do valor da IDA. No entanto, uma vez estimado esse tempo, deve-se estabelecer uma margem de segurança para compensar a incerteza biológica que representa a variabilidade da cinética de depleção tecidual.

A dimensão da margem de segurança depende de vários fatores relacionados com o desenho experimental e as propriedades farmacológicas do princípio ativo estudado.

Apesar de que não é possível oferecer uma recomendação geral aplicável a todos os casos, um guia aproximado para calcular a duração da margem de segurança é aumentar em 10% - 30% o valor do tempo em que todos os valores de IR se encontram abaixo da IDA.

4.2.6 Procedimento baseado no limite de exposição alternativo

Em princípio, este procedimento é aplicado a princípios ativos para os quais não se estabeleceu um valor de IDA, mas que são utilizados como componentes de formulações injetáveis e que deixam grandes quantidades de resíduos no local de injeção mantendo sua atividade biológica.

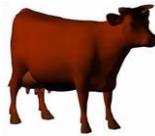
Exemplos de limites de exposição podem ser: quantidade máxima de ingestão recomendada (por exemplo, vitaminas), máximo nível de ingestão tolerável (por exemplo, minerais/elementos traços), níveis basais ou naturais para compostos que podem ser produzidos de forma endógena (hormônios) ou qualquer outro limite que puder resultar apropriado.

Em todo caso, a conveniência dos limites de exposição escolhidos deve ser cientificamente justificada. A derivação deste período de carência é, em princípio, análogo ao método descrito para a estimativa baseada no LMR ou a IDA.

O período de carência deve ser determinado por comparação dos dados de concentração de resíduos com o limite alternativo que, em geral, faz referência a uma determinada concentração (por exemplo, análogo ao método baseado no LMR) ou a uma quantidade determinada de resíduos ingerida (por exemplo, análogo ao método baseado na IDA).



ESQUEMA COMPARATIVO DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE DOS TECIDOS COMESTÍVEIS E ESTIMATIVA DO PERÍODO DE CARÊNCIA MEDIANTE O PROCEDIMENTO BASEADO NO LMR.

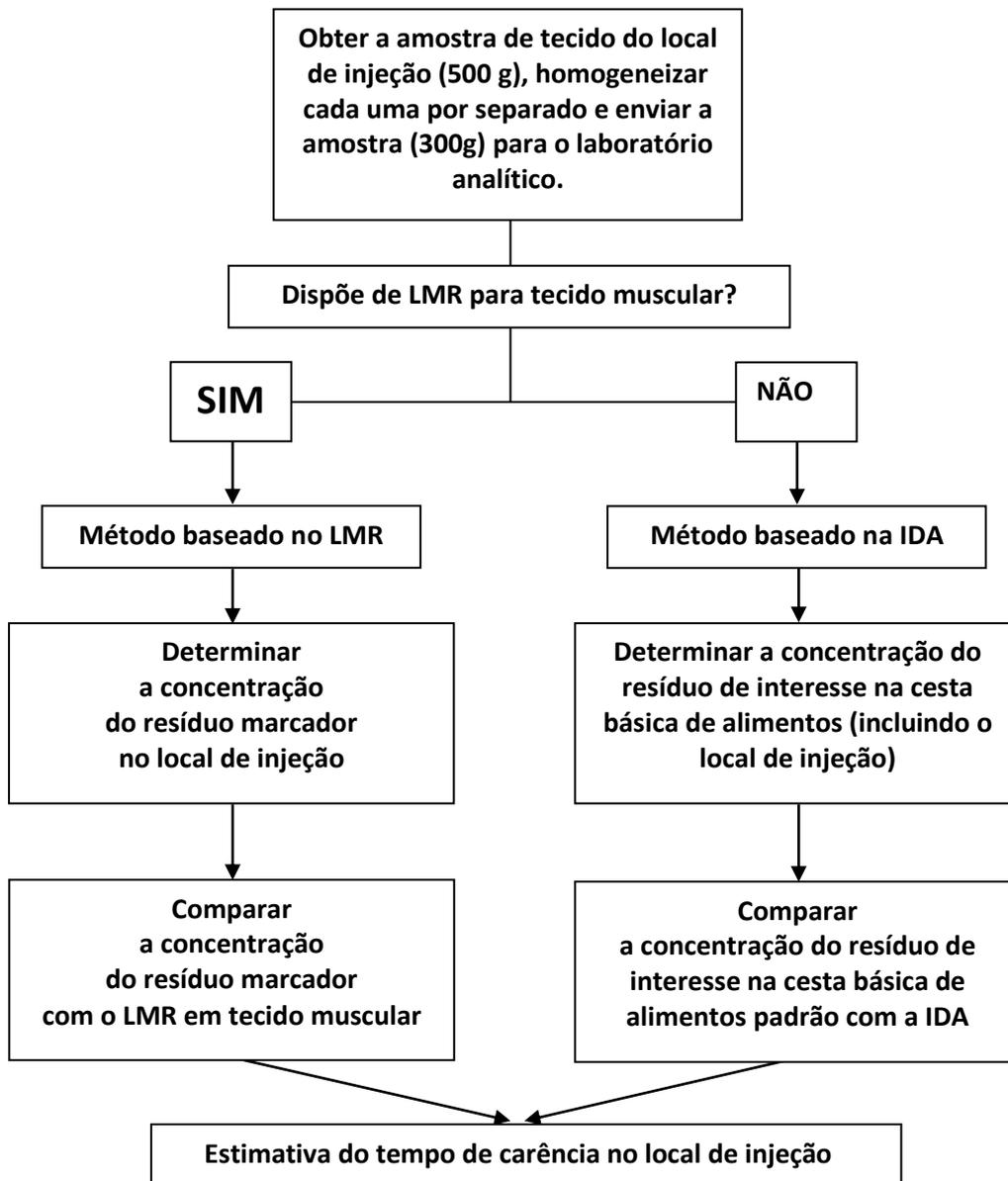
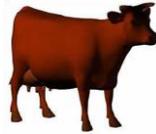


1- O período de carência deve ser estimado para todos os tecidos comestíveis e será calculado baseado nos procedimentos propostos neste guia. O período de carência mais prolongado será considerado o mais apropriado.

2- Se o produto veterinário foi administrado por via parenteral (IM – SC), o período de carência do tecido muscular será substituído pelo período de carência dos tecidos no local de injeção.



ESQUEMA COMPARATIVO DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE DOS TECIDOS NO LOCAL DE INJEÇÃO E ESTIMAÇÃO DO PERÍODO DE CARÊNCIA MEDIANTE OS PROCEDIMENTOS BASEADOS NO LMR E NA IDA

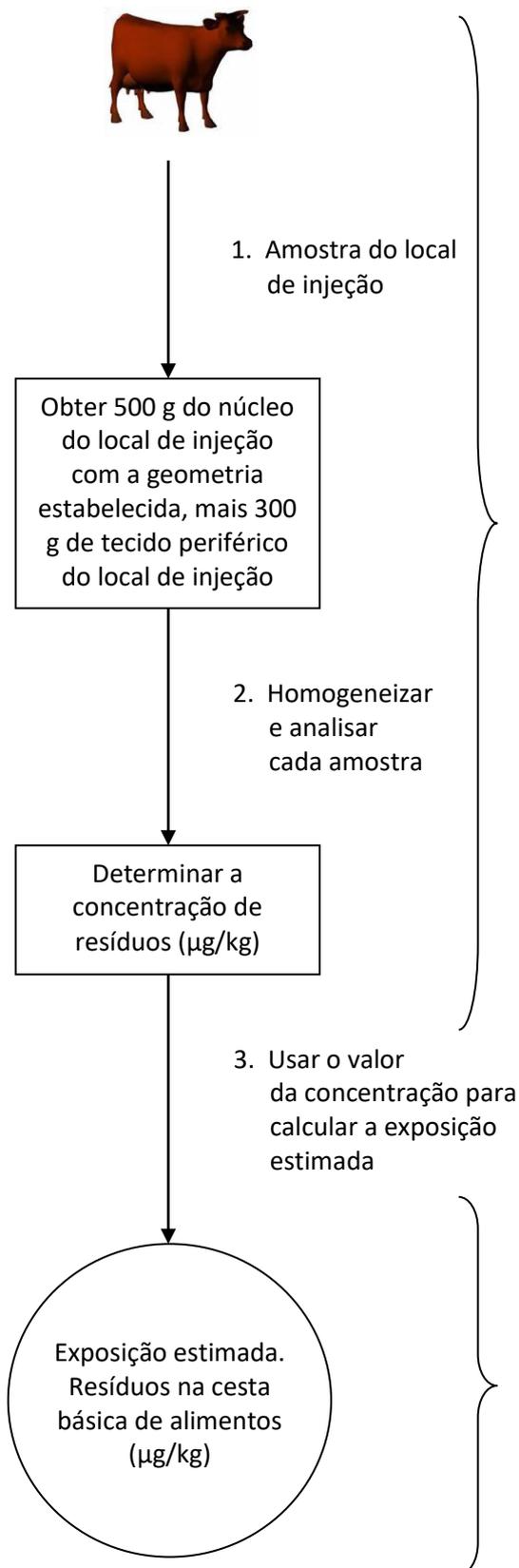


1- Em certos casos, é necessário que o método baseado na IDA seja realizado paralelamente para corroborar a confiabilidade do período de carência estimado pelo método baseado no LMR, para assegurar que os resíduos presentes na cesta básica de alimentos apresentem valores abaixo da IDA

2- Deve ser calculado baseado nos procedimentos propostos neste guia. O período de carência estimado pelo procedimento baseado no LMR deve ser estimado para o restante dos tecidos comestíveis. O tempo de carência mais prolongado será considerado o mais apropriado.



ESQUEMA DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE DOS TECIDOS NO LOCAL DE INJEÇÃO E ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO NA CESTA BÁSICA DE ALIMENTOS PADRÃO



Amostragem no local de injeção.

1. A amostragem do local de injeção é diferente daquela realizada para os demais tecidos comestíveis como fígado, rim e tecido muscular, sobre os quais se admite que os resíduos se encontrem distribuídos de forma homogênea e que a localização da área de amostragem tem pouco ou nenhum impacto na quantificação da concentração de resíduos.
2. No local de injeção, a distribuição homogênea dos resíduos não pode ser admitida de forma automática. Devido aos processos de dispersão e/ou difusão, se produz um gradiente de concentração dentro da área de liberação do princípio ativo com elevadas concentrações ao redor do centro da região em que foi aplicada a injeção. Como resultado disso, a localização exata do tecido e a anatomia do mesmo podem ter um impacto considerável na determinação da concentração dos resíduos.
3. O método de amostragem deverá assegurar a obtenção da área de maior concentração de resíduos. Recomenda-se coletar do local de injeção aproximadamente 500 g de tecido com o ponto de injeção no centro do mesmo. Esta amostra deverá ter a forma de um cilindro de 10 cm de diâmetro e 6 cm de profundidade (intramuscular) ou 15 cm de diâmetro e 2,5 cm de profundidade (subcutâneo), admitindo que esta massa tecidual representa o local primário de injeção. Para assegurar que a amostra inclui o máximo nível de resíduos, deverá ser obtida uma segunda amostra de tecido periférico de aproximadamente 300 g.

Exposição da cesta básica de alimentos padrão estimada pela IDA.

4. A contribuição do local de injeção na cesta básica de alimentos padrão pode ser obtida multiplicando a concentração de resíduos com os valores de consumo (kg/dia). O valor de consumo padrão de músculo para uma pessoa de 60 kg é de 0,3 kg.
5. A exposição dos resíduos na cesta básica de alimentos padrão se calcula da seguinte forma:

$$IR = (C_M \times F_M) + (C_H \times F_H) + (C_R \times F_R) + (C_G \times F_G)$$

onde:

IR = ingestão diária de resíduo

C = concentração do resíduo marcador

F = valores de consumo (0,3 kg de músculo, 0,1 kg de fígado, 0,05 kg de rim e 0,05 kg de gordura).

Subíndices = M (músculo), H (fígado), R (rim) e G (gordura).

5. Referências

- 1- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Statistical Society Series A 160, 268–282.
- 2- CVMP (1994) Position Paper: Approach towards Harmonisation of Withdrawal Periods, III/5934/94-EN, Nov. 1994.
- 3- David, H.A. (1952). "Upper 5 and 1% points of maximum F-ratio." *Biometrika*, 39, 422–424.
- 4- EMEA/CVMP/036/95: Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. (CVMP adopted April 96).
- 5- EMEA/CVMP/542/03-FINAL: Guideline on Injection Site Residues. (CVMP into effect April 2005).
- 6- FDA (1983), General Principles for Evaluating the Safety of Compound Used in Food-Producing Animals.
- 7- FDA (1994), General Principles for Evaluating the Safety of Compound Used in Food-Producing Animals.
- 8- Graf, U.; Henning, H.I.; Stange, P.T. (1987) *Wilrich, Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik*, 3rd ed., Springer Verlag, Berlin, Hidelberg, New York, London, Paris, Tokio.
- 9- Hartley, H.O. (1950). The Use of Range in Analysis of Variance *Biometrika*, 37, 271–280.
- 10- O'Brien, R.G. (1981). A simple test for variance effects in experimental designs. *Psychological Bulletin*, 89, 570–574.
- 11- Owen, D.B. (1962), *Handbook of Statistical Tables*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- 12- Pearson, E.S., Hartley, H.O. (1970). *Biometrika Tables for Statisticians*, Vol 1.
- 13- Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika* 52 (3-4): 591–611.
- 14- Stange, K. (1971) *Angewandte Statistik*, Vol. II, pp. 141-143, Springe Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 15- VICH (2009) Guidelines for the validation of analytical Methods used in residue Depletion Studies. VICH International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, GL 49 (MRK) - Method Used in Residue Depletion Studies. For consultation at step 4 - Draft 1.



16- William, J., Conover (1999). Practical Nonparametric Statistics (Third Edition ed.) Wiley, New York, NY USA. pp. 388–395.



6. Anexo

Procedimentos estatísticos

Teste de Bartlett

O teste de Bartlett¹ é usado para checar se um número de k amostras provém de populações que apresentam variâncias semelhantes. A igualdade de variâncias entre diferentes amostras se denomina homogeneidade de variâncias ou homocedasticidade.

O uso do teste de Bartlett se justifica no fato de que muitos testes estatísticos como, por exemplo, o teste de diferenças de médias de t -de Student ou a análise de variância, admitem que as variâncias entre diferentes amostras são iguais.

A FDA^{6, 7} recomenda o uso deste teste devido a sua robustez, embora seja extremamente sensível a desvios de normalidade. Por outro lado, este teste só pode ser usado quando cada grupo de dados é igual ou maior a 5 (cinco). Apresente a vantagem de que é possível comparar grupos de dados de diferentes tamanhos.

O teste de Bartlett é utilizado para verificar a hipótese nula H_0 de que as variâncias populacionais são iguais a respeito da hipótese alternativa H_1 de que ao menos dois são diferentes. Se dispusermos de k amostras com um tamanho de n_i amostras e uma variância S_i^2 a estatística de Bartlett será:

$$X^2 = \frac{(N - k) \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \left(\frac{1}{n_i - 1} \right) - \frac{1}{N - k} \right)}$$

onde $N = \sum_{i=1}^k n_i$ y $S_p^2 = \frac{1}{N - k} \sum_i (n_i - 1) S_i^2$ é o estimador da variância total.

O estatístico do teste de Bartlett tem aproximadamente uma distribuição X^2_{k-1} . A hipótese nula é rejeitada quando $X^2 > X^2_{k-1, \alpha}$, onde $X^2_{k-1, \alpha}$ é o valor crítico superior para uma distribuição X^2_{k-1} .

Teste de Hartley

Este teste, desenvolvido em 1950 por Hartley⁹, é também conhecido como teste de F_{\max} ou teste de F_{\max} de Hartley. É utilizado em análise de variância para verificar que diferentes grupos têm variâncias semelhantes, condição indispensável para realizar comparações entre grupos mediante a aplicação de testes estatísticos paramétricos. O teste apresenta a desvantagem de que só pode ser utilizado para comparar grupos de dados de igual tamanho.

O teste se baseia no cálculo da relação entre a variância grupal maior ($\max s_j^2$) e a variância grupal menor ($\min s_j^2$). O valor resultante é então comparado com o valor crítico presente em uma tabela de distribuição de F_{\max} 3, 12.

Admite-se que os grupos apresentam variâncias semelhantes se o valor calculado for menor que o valor crítico.

O teste de Hartley admite que os dados de cada grupo apresentam distribuição normal e que os grupos apresentam igual número de indivíduos. Este teste, embora conveniente, é pouco sensível a desvios de distribuição normal¹⁰.



Teste de Cochran

Este teste, desenvolvido por William Gemmill Cochran¹⁶ é uma análise de duas vias de blocos aleatórios em que o resultado da comparação só pode ter dois resultados. O teste de Cochran, também conhecido como Teste Q de Cochran, é um teste de estatística não paramétrica.

A EMEA⁵ considera que este é o melhor teste, já que é mais simples que o teste de Bartlett. Por outro lado, é menos sensível a desvios de normalidade que este último e, também, pode ser utilizado para analisar grupos de dados de diferentes tamanhos.

O teste admite que o número de tratamentos experimentais é maior que dois ($k > 2$) e que as observações estão organizadas em um determinado número (b) blocos, como se apresenta a seguir:

	Tratamento 1 (k_1)	Tratamento 2 (k_2)	Tratamento$_i$ (k_i)
Bloco 1 (b_1)	X_{11}	X_{12}	X_{1k}
Bloco 2 (b_2)	X_{21}	X_{22}	X_{2k}
Bloco 3 (b_3)	X_{31}	X_{32}	X_{3k}
Bloco 4 (b_4)
Bloco$_i$ (b_i)	X_{b1}	X_{b2}	X_{bk}

O teste de Cochran parte da hipótese nula (H_0) que afirma que os tratamentos são iguais, e a hipótese alternativa (H_1) afirma que existe diferença entre os tratamentos.

A estatística do teste de Cochran é:

$$T = k(k-1) \sum_{j=1}^k \left(X_{\bullet j} - \frac{N}{k} \right)^2 / \sum_{i=1}^b X_{i\bullet} (k - X_{i\bullet})$$

onde

k é o número de tratamentos

$X_{\bullet j}$ é o valor total das colunas ao $j^{\text{ésimo}}$ tratamento

b é o número de blocos

$X_{i\bullet}$ é o valor total das células ao $i^{\text{ésimo}}$ bloco

N é o valor do total das amostras



O nível de significância da região crítica está dado por:

$$T > X_{1-\alpha, k-1}^2$$

onde $X_{1-\alpha, k-1}^2$ é o quantil $(1-\alpha)$ da distribuição de qui-quadrado com um grau de liberdade de $k-1$. A hipótese nula é rejeitada se o valor da estatística cai dentro da região crítica.

Teste de Shapiro-Wilk

Este teste foi publicado em 1965 por Samuel Shapiro e Martin Wilk¹³, e é utilizado para verificar a hipótese nula (H_0) de que uma amostra X_1, \dots, X_n provém de uma população com distribuição normal.

O teste parte da hipótese nula (H_0) que afirma que os dados experimentais provêm de uma população com distribuição normal, e a hipótese alternativa (H_1) afirma que os dados experimentais provêm de uma população com distribuição não normal. A estatística do teste é a seguinte:

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

onde:

$x_{(i)}$ é a $i^{\text{ésima}}$ ordem estatística, ex: o menor valor na amostra.

\bar{x} é a média da amostra.

As constantes a_i estão dadas pela seguinte equação:

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

onde

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

m_1, \dots, m_n são valores esperados da ordem estatística de variáveis independentes e com idêntica distribuição aleatória, provenientes de populações com distribuição normal e V é a matriz de covariância dessas ordens estatísticas.

A hipótese nula é rejeitada quando o valor da estatística (W) é menor que o erro alfa selecionado (0,05). Caso a estatística (W) seja maior que o nível alfa selecionado, então, não se pode rejeitar a hipótese nula e se admite que os dados experimentais provêm de uma população com distribuição normal.



Cálculo do limite superior do intervalo de tolerância

Embora a FDA^{6, 7} proponha estimar o limite superior do intervalo de tolerância a 99% com um intervalo de confiança a 95%, existe uma objeção a esse critério que é a excessiva extrapolação dos valores do intervalo de tolerância já que, muitas vezes, este intercepta o valor do LMR em um tempo posterior aos valores das últimas concentrações teciduais detectadas. Esta excessiva extrapolação pode resultar em uma inadequada estimativa do tempo de carência. A EMEA⁵ propõe um intervalo de tolerância a 95%, minimizando o problema da extrapolação e proporcionando uma estimativa mais realista do tempo de carência.

Método de distribuição de t não centralizado (FDA)

O limite superior do intervalo de tolerância a qualquer tempo se calcula segundo a seguinte equação:

$$T(y) = a + b.t + k.s. \left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{xt}}{\sum t_i - \bar{xt}} \right)^2 \right]^{0.05}$$

onde:

$k = 95^{\text{mo}}$ percentil de uma distribuição de “ t ” não centralizado com um parâmetro não centralizado “ d ” e graus de liberdade igual a S^2 .

$$d = \frac{z}{\left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{xt}}{\sum t_i - \bar{xt}} \right)^2 \right]^{0.05}}$$

$z = 95^{\text{mo}}$ percentil de uma distribuição padrão normalizada.

Para calcular o valor de “ k ”, consultar D.B. Owen, Handbook of Statistical Tables, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts (1962)¹¹. Utilizando o valor de “ d ” e a tabela de fatores para o cálculo dos valores críticos da distribuição de “ t ” não centralizado com um percentil de 95% (0,95) e “ n ” graus de liberdade.

O limite superior do intervalo de tolerância se calcula como o antilogaritmo do valor calculado. Conferir que o valor estimado não exceda o valor do LMR. Se isso acontecer, deve-se aumentar o valor de t e repetir o procedimento de cálculo até que o valor calculado seja inferior ao LMR. Nesse caso, o valor de t se corresponde com o tempo de carência.



Método de Stange (EMEA)

O cálculo do limite superior do intervalo de tolerância a 95% com um intervalo de confiança a 95% pode ser realizado também com o procedimento reportado por de Stange¹⁴, como se descreve a seguir:

$$Ty = a + bt + k_T S_{y,x}$$

onde:

Ty = limite superior do intervalo de tolerância a um tempo de amostragem determinado

a = ponto onde a reta cruza o eixo da ordenada

b = pendente da reta

t = tempo.

$$k_T = \frac{\sqrt{(2n-4)}}{(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2} \left[\sqrt{(2n-4)^*} u_{1-\gamma} + u_{1-\alpha} W_n \right]$$

$$W_n = \sqrt{u_{1-\gamma}^2 + [(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2] \left[\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right]}$$

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2$$

Os respectivos valores estatísticos da distribuição normal padronizada são:

- Para $1-\alpha = u_{1-\alpha} = 1.6449$

- Para $1-\gamma = u_{1-\gamma} = 1.6449$

$S_{y,x}$ = erro residual, $()^* = (2n-5)$ segundo Graf et al.⁷.

A correção proposta por Graaf⁸, utilizando o termo $(2n-5)$ no lugar de $(2n-4)$, resulta em um limite do intervalo de tolerância levemente maior. Segundo Stange, a equação é válida para um valor de $n \approx 10$, enquanto Graf aumenta a validade do cálculo a um valor de $n \approx 20$.

Data de vigência

Maio de 2011

Frequência de revisão

5 anos

