

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT) EM ÁGUA PARA USO RADIOFARMACÊUTICO

Stella Benedetti, Érika Vieira de Almeida, Elisiane de Godoy Monteiro, Jair Mengatti, Neuza Taeko O. Fukumori e Margareth Mie N. Matsuda

Diretoria de Radiofarmácia - IPEN – CNEN/SP
Av. Professor Lineu Prestes 2242 - 05508-000 - São Paulo – SP – Brasil
E-mail: stellabenedetti@usp.br

Resumo: A água é um dos itens de maior importância na indústria farmacêutica. Na sua produção para uso farmacêutico podem ser utilizados vários sistemas de purificação, dependendo da qualidade desejada. Os contaminantes orgânicos podem ser provenientes da fonte, do sistema de purificação ou distribuição. A água deve satisfazer requisitos de qualidade definidos pelas farmacopéias, dentre os quais se inclui a análise de Carbono Orgânico Total (COT). O objetivo deste estudo foi realizar a validação do método para determinação de COT e as aplicações decorrentes deste método na indústria radiofarmacêutica. Foram utilizados equipamento analisador de carbono Vwp da Shimadzu, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0,5 mol L⁻¹ e H_3PO_4 3,0 mol L⁻¹, padrões em concentrações de 100-1000 ppb carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI). Os parâmetros avaliados na validação foram: robustez, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. As condições otimizadas de robustez foram: 2,0 mL de oxidante, 3,0% de solução ácida, 10 e 3 minutos para integração das áreas no cálculo de CT e CI, respectivamente. A linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão atenderam aos limites estabelecidos pela ANVISA. Foi feito o monitoramento da água produzida em três sistemas de purificação.

Palavras chave: Validação, água, COT, foto-oxidação.

1. INTRODUÇÃO

A água é um item amplamente utilizado na indústria farmacêutica, seja como produto de utilidade, insumo para a fabricação de diversas formas farmacêuticas (sólidas e líquidas), principal insumo de formas farmacêuticas líquidas (orais e parenterais) e base para a manipulação de soluções e reagentes utilizados na produção e controle de qualidade [1-3].

A água utilizada na indústria farmacêutica deve atender requisitos de qualidade definidos pelas farmacopéias e normas vigentes, dependente dos quesitos de utilização. Cada processo ou produto em uma indústria farmacêutica requer diferentes requisitos de qualidade para a água. Para a limpeza de laboratórios, por exemplo, a água utilizada pode ser potável, na produção de formas farmacêuticas sólidas e orais líquidas e na produção de soluções e reagentes, bem

como a limpeza de vidrarias requer-se o uso de água purificada (*Purified Water* ou *PW*), e para a fabricação de formas farmacêuticas de uso parenteral e no processo de produção e limpeza de equipamentos envolvidos e produtos médicos invasivos, requer-se o uso de água para injeção (*Water for Injection* ou *WFI*) [4].

De um modo geral as tecnologias de tratamento de água têm evoluído muito, *PW* e *WFI* podem ser obtidas pelos métodos de filtração, ultrafiltração, destilação, bidestilação, deionização, eletrodeionização, osmose reversa e osmose reversa de duplo passo que podem estar associados a processos de pré-tratamento como cloração, descarbonatação, abrandamento e clarificação. O armazenamento deve ser adequado, para evitar contaminação interna e externa que provém principalmente da fonte da água, do processo de purificação sem montagem e a manutenção adequada e do sistema de distribuição da água [3, 5, 6].

O melhor meio de se assegurar que o sistema de purificação de água é adequado ao seu objetivo consiste em analisar e monitorar a qualidade da água. As especificações básicas para qualidade de água são definidas pelas Farmacopéias Brasileira, Americana (USP) e Européia (PEur) [7].

Os ensaios relacionados ao controle de qualidade da água são específicos ao tipo de água a ser monitorada e a aplicação desta água. Os ensaios devem prever também os pontos de amostragem na água de abastecimento e pontos de água purificada de acordo com o tipo de sistema de purificação [4].

Até recentemente a água purificada era monitorada basicamente pelos seus aspectos inorgânicos, através da determinação de sais dissolvidos e parâmetros qualitativos de substâncias oxidáveis e microbiológicos. A partir da 23ª edição da Farmacopéia Americana um novo requisito foi estabelecido, a determinação de carbono orgânico total (COT) tanto para água purificada como água para injeção limitando a presença do material em 500 [3].

O carbono orgânico total é uma expressão para designar vários tipos de carbono orgânicos que podem estar presentes na água, o carbono orgânico bioquímico, carbono orgânico assimilado, e carbono ligado ao oxigênio [1].

O carbono como um todo presente na água é expresso como carbono total (CT) e possui uma variedade de frações que podem ser divididas em duas frentes principais: COT que é todo átomo de carbono ligado covalentemente a uma molécula e Carbono Inorgânico (CI) que é todo carbonato, bicarbonato e CO₂ dissolvido em água [1].

A determinação de COT pode ser feita de duas maneiras, indireta e direta. Os dois métodos utilizam a conversão das diferentes formas de carbono orgânico presentes na água em CO₂ de fácil determinação, e o método independe do estado de oxidação do carbono [1,3, 8].

No método indireto determina-se a concentração de CT e CI e o COT é calculado mediante a uma equação matemática simples descrita na Eq. 1 [8, 9].

$$\text{COT} = \text{CT} - \text{CI} \quad (1)$$

No método direto, o COT presente é determinado diretamente pela eliminação primária do CI por meio da acidificação do meio e logo depois determinando a concentração do carbono orgânico também conhecido como determinação do NPOC [8].

Para ambos os métodos, pode-se utilizar diferentes tecnologias, simultâneas ou não, demonstradas na Tabela 1 [18]:

Tabela 1. Tecnologias empregadas para a determinação de COT [1,8]

Método Principal	Sub-método
	Oxidação com cromato
Oxidação química	Oxidação com persulfato
	Oxidação com luz UV
	Combustão a seco
Combustão	Combustão úmida

A metodologia para a determinação de COT deve, como todo método analítico, ser validado segundo as diretrizes preconizadas pela resolução RE 899 da ANVISA. A validação de uma metodologia constitui na avaliação de diversos parâmetros do método de análise empregado para que se comprove a segurança, precisão e a confiabilidade estatística do método. As figuras de mérito para a realização da validação de acordo com normas nacionais e internacionais são: linearidade, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão e robustez [10, 11].

Radiofármaco é um medicamento ou produto que contém um radioisótopo em sua constituição e é utilizado em seres humanos para o diagnóstico e tratamento de enfermidades principalmente na área oncológica, mas também sendo amplamente utilizado em outras especialidades médicas constituindo um ramo da medicina conhecido como

Medicina Nuclear. A radiofarmácia pode ser subdividida em: radiofarmácia industrial, radiofarmácia hospitalar e radiofarmácia centralizada [12-14].

As Boas Práticas de Fabricação em Radiofarmácia ou Boas Práticas Radiofarmacêuticas são recomendações ou conjunto de normas e atividades preconizadas pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA) que conjugam os princípios das BPF e as normas de Proteção Radiológica. As Boas Práticas Radiofarmacêuticas destinam-se a garantir que os produtos terminados de uso radiofarmacêutico tenham e mantenham as características necessárias para a utilização segura e correta a serem administrados nos seres humanos no âmbito dos serviços de Medicina Nuclear [15].

As diretrizes para as Boas Práticas em Medicina Nuclear são regulamentadas pela RDC 210 de 4 de agosto de 2003, RDC 38 de 04 de junho de 2008 e RDC 63 e RDC 64 ambas de 23 de dezembro de 2009 da ANVISA [16, 17].

2. MÉTODOS

Todos os ensaios foram realizados utilizando-se analisador de carbono modelo TOC-Vwp e amostrador automático modelo ASI-V (Shimadzu), controlados por software TOC Control-V. Reagentes oxidante (Na₂S₂O₈ 0,5 mol L⁻¹) e acidificante (H₃PO₄ 3,0 mol L⁻¹); soluções padrão de 1000 ppm foram preparadas a partir de ftalato de potássio (C₈H₅O₄K) para COT/CT e carbonato de sódio (Na₂CO₃) e bicarbonato de sódio (NaHCO₃) para CI, com reagentes PA (Merck).

A água utilizada para preparo de soluções foi obtida de purificador Elix-10 ligado a reservatório de armazenamento de capacidade de 30 L, com sistema sanitização por luz UV e pastilhas de hipoclorito (Millipore).

2.1. Validação de método

2.1.1. Robustez

Foram avaliados quatro parâmetros que podem influenciar no resultado de COT: volumes de solução oxidante (mL) e acidificante (%) e tempo de integração das áreas para cálculo de CT e CI. Foi avaliada a variação do resultado em relação aos padrões de CT e CI de 250 ppb.

Os volumes de solução oxidante e solução acidificante foram avaliados nas faixas de 0,5 a 2,5 mL, para CT e 1,0 a 5,0%, para CI, respectivamente, utilizando-se soluções padrão de zero, 100, 250, 500 e 1000 ppb. O tempo de integração de área para cálculo de CT e CI foi avaliado separadamente entre 2-10 minutos, utilizando-se padrões de zero, 250 e 1000 ppb. Foram calculados o coeficiente de variação (CV) entre as triplicatas de cada padrão e o coeficiente de correlação (r²) para cada curva obtida com a alteração dos parâmetros avaliados no estudo de robustez.

2.1.2. Linearidade

Foram obtidas as curvas analíticas de CT e CI na faixa de zero a 1000 ppb (5 padrões), para obtenção da equação da reta (y = a + bx), coeficiente linear (a), angular (b) e coeficiente de correlação (r²), calculados pelo software TOC Control-V.

2.1.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

LD e LQ foram calculados a partir das equações de reta, utilizando-se as Eq. 2 e 3 [11].

$$LD = \frac{(DP_a \times 3)}{b} \quad (2)$$

$$LQ = \frac{(DP_a \times 10)}{b} \quad (3)$$

Onde DP_a é o desvio padrão de intercepto em y, e b é o coeficiente angular da reta.

2.1.4. Precisão e exatidão

Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) foram calculados a partir das Eq. 4 e 5, em análises em triplicata intradia e interdia, respectivamente. Foram obtidos a partir dos resultados de CT e CI nas concentrações 300, 500 e 1000 ppb e 250, 500 e 1000 ppb, respectivamente.

$$DPR (\%) = \frac{(DP \times 100)}{CMD} \quad (4)$$

$$\text{Exatidão } (\%) = \frac{(CMD \times 100)}{\text{Conc. Teórica}} \quad (5)$$

Onde DPR é o desvio padrão relativo e CMD é a concentração média determinada.

2.2. Monitoramento da qualidade da água produzida na DIRF

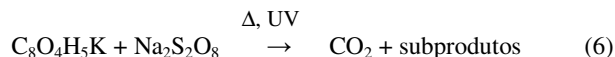
Durante um período de 28 dias foi feito o monitoramento da concentração de COT na água em quatro pontos de amostragem:

- Um purificador de água (PW) com sistema de osmose reversa e eletrodeionização com reservatório de 30 L e iluminação por luz UV, com coleta após o reservatório;
- Dois purificadores de água (PW) com sistema de osmose reversa e eletrodeionização com reservatório de 100 L, iluminação por luz UV e sistema de agitação, com coleta após o reservatório;
- Um purificador de água (WFI) com sistema de osmose reversa duplo-passo e coluna de troca iônica com coleta logo após a saída do sistema de purificação e
- Equipamento descrito no item C com coleta após reservatório de 100 L.

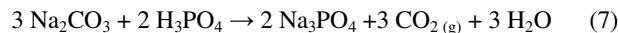
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No equipamento utilizado, o resultado de COT é obtido em análise segundo o método indireto, em duas etapas:

A. Oxidação química do CT com persulfato combinado com luz UV em um reator úmido aquecido a $80,0 \pm 0,5$ °C gerando CO₂, segundo a reação descrita na Eq. 6.



B. Decomposição dos sais inorgânicos de carbonato em CO₂ por acidificação do meio em um reator a frio, para a determinação de CI, segundo as reações descritas nas Eq. 7 e 8.



Uma vez determinada a concentração de CT e CI o COT é calculado segundo a Eq. 1.

3.1. Validação de método

3.1.1. Robustez

Cada parâmetro analisado em robustez foi avaliado separadamente e os resultados foram expressos em gráficos.

3.1.1.1. Volume de solução oxidante

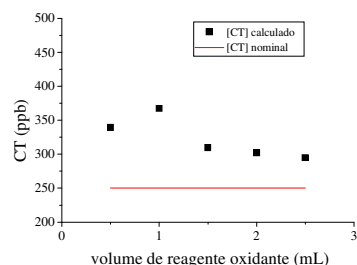


Fig. 1. Efeito da variação do volume de oxidante em um padrão de CT de 250 ppb

Podemos observar que os resultados mais próximos do valor do padrão foram aqueles com os volumes 1,5, 2,0 e 2,5 mL.

A curva de calibração de CT obtida com cada volume de oxidante está representada na Fig. 2.

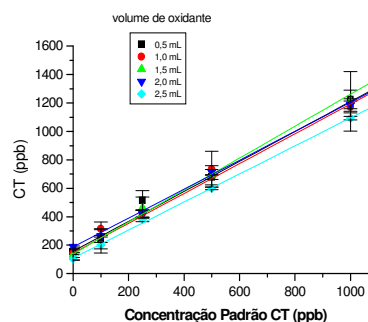


Fig. 2. Efeito da variação do volume de solução oxidante na obtenção da curva de calibração de CT

Os resultados obtidos mostraram um maior CV (17,1%) com volume de oxidante de 0,5 mL e um menor CV (0,5%) com 2,0 mL.

Para todas as variações o r^2 obtido foi maior que 0,99. O volume de oxidante que obteve os melhores resultados, escolhido para compor o método de análise foi 2,0 mL.

3.1.1.2. Volume de solução acidificante

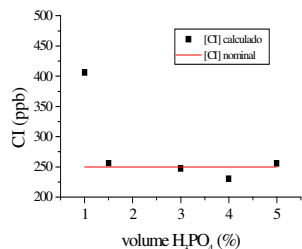


Fig. 3. Efeito da variação do volume de solução acidificante em um padrão de CI de 250 ppb

Os resultados mais próximos do valor nominal do padrão foram aqueles obtidos com volumes 1,5, 3,0 e 5,0%.

A curva de calibração de CI obtida com cada volume de acidificante está representada na Fig. 4.

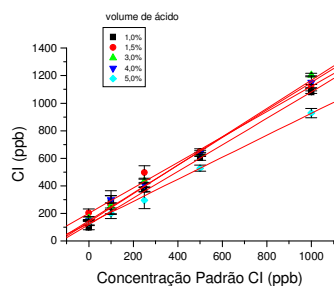


Fig. 4. Efeito da variação do volume de solução acidificante na obtenção da curva de calibração de CI

O maior CV (30,8%) foi observado com volume de acidificante de 1,0% e o menor CV (0,9%) com 3,0%.

O r^2 para todas as curvas foi maior que 0,99. O volume de acidificante escolhido para compor o método de análise foi o volume de 3,0%.

3.1.1.3. Tempo de integração da área da curva para o cálculo de CT

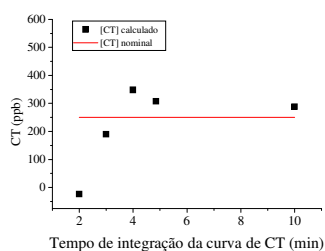


Fig. 5. Efeito da variação do tempo de integração da curva para o cálculo de CT em um padrão de 250 ppb

Os valores calculados de CT mais próximos do valor nominal do padrão foram obtidos nos tempos de integração de área de 5 e 10 minutos.

A curva de calibração obtida com a variação de tempo de integração da área da curva para o cálculo de CT é demonstrado na Fig. 6.

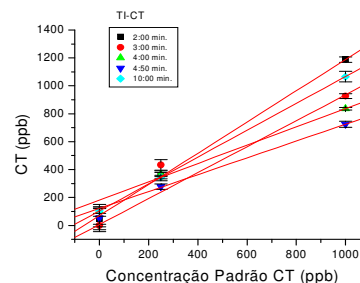


Fig. 6. Efeito da variação do tempo de integração da área da curva para o cálculo de CT na obtenção da curva de calibração

O maior CV foi observado com tempo de integração de 3 minutos e o menor CV (3,5%) com 10 minutos.

O r^2 obtido em todos os ensaios foi maior que 0,99. O tempo de integração de CT em que se obteve os melhores resultados foi de 10 minutos.

3.1.1.4. Tempo de integração da área da curva para o cálculo de CI

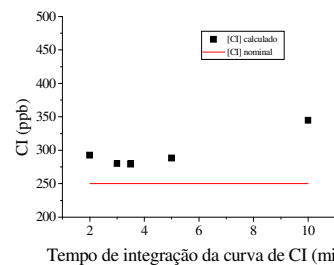


Fig. 7. Efeito da variação do tempo de integração da curva para o cálculo de CI com um padrão de 250 ppb

Podemos observar que os resultados mais próximos do valor do padrão foram aqueles com utilização dos tempos de integração da área da curva de CI de 3 e 3,5 minutos.

A curva de calibração obtida com cada variação de tempo de integração da área da curva para o cálculo de CI está representada na Fig. 8.

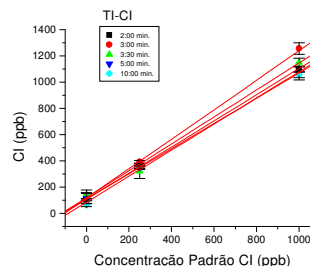


Fig. 8. Efeito da variação do tempo de integração da área da curva para o cálculo de CI na obtenção da curva de calibração

O maior CV foi observado com tempo de integração de 5 minutos e o menor CV (2,6%) quando o tempo de integração foi de 3 minutos.

O r^2 obtido foi maior que 0,99. O tempo de integração de CI escolhido para o método de análise foi de 3 minutos.

3.1.2. Linearidade

As condições otimizadas de robustez foram: 2,0 mL de oxidante, 3,0% de solução ácida, 10 e 3 minutos para integração das áreas no cálculo de CT e CI, respectivamente. Nestas condições as curvas de calibração para CT e CI obtiveram valores de coeficiente de correlação (r^2) acima de 0,99.

3.1.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e qualificação para CT são 99,61 ppb e 332,03 ppb respectivamente. Para CI, os valores encontrados foram 59,16 ppb para LD e 197,22 ppb para LQ.

3.1.4. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intradia para CT estão expressos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Precisão e exatidão intradia de CT no 1º dia de análise

CT (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)	Exatidão (%)
300	302,38 ± 2,12	0,70	100,79
500	481,46 ± 3,37	0,70	96,29
1000	1009,79 ± 3,73	0,37	100,97

Tabela 3. Precisão e exatidão intradia de CT no 2º dia de análise

CT (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)	Exatidão (%)
300	299,09 ± 6,72	2,24	99,69
500	511,21 ± 5,72	1,11	102,24
1000	1012,91 ± 12,71	1,25	101,29

A repetibilidade está dentro dos limites aceitáveis (DPR ≤ 5%) e a exatidão em um intervalo de 96,29 a 102,24%.

Os cálculos de DPR interdia apresentam os seguintes resultados:

Tabela 4. Precisão interdia de CT

CT (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)
300	300,73 ± 2,32	0,77
500	496,33 ± 21,03	4,23
1000	1019,22 ± 8,93	0,87

Os resultados apresentam reprodutibilidade dentro dos limites especificados (DPR ≤ 5%).

A precisão e exatidão intradia para CI estão expressos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Precisão e exatidão intradia de CI no 1º dia de análise

CI (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)	Exatidão (%)
250	283,24 ± 2,36	0,83	113,29
500	550,95 ± 1,78	0,32	110,19
1000	998,31 ± 3,83	0,38	99,83

Tabela 6. Precisão e exatidão intradia de CI no 2º dia de análise

CI (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)	Exatidão (%)
250	286,26 ± 3,43	1,19	114,50
500	563,43 ± 5,14	0,91	112,68
1000	1011,82 ± 2,84	0,28	101,18

A repetibilidade apresenta-se dentro dos limites aceitáveis (DPR ≤ 5%) e a exatidão em um intervalo de 99,83 a 114,50%.

Os cálculos de DPR interdia apresentam os seguintes resultados:

Tabela 7. Precisão e Exatidão interdia de CI

CI (ppb)	CMD ± DP (ppb)	DPR (%)
250	286,26 ± 3,43	1,19
500	557,19 ± 8,82	1,58
1000	1005,06 ± 9,55	0,95

Os padrões de CT apresentaram reprodutibilidade dentro dos limites especificados ($DPR \leq 5\%$).

3.2. Monitoramento da qualidade da água produzida na DIRF

Os resultados de COT durante o monitoramento da qualidade da água produzida pelos purificadores com análise da água em quatro pontos de coleta, utilizando-se metodologia validada estão representados nas Fig. 9, 10, 11 e 12.

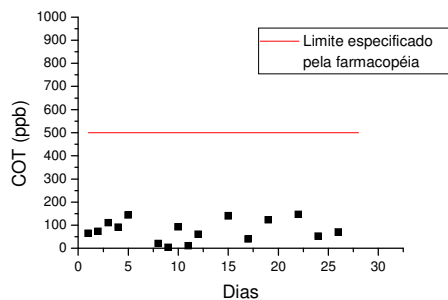


Fig. 9. Monitoramento de COT para o ponto A

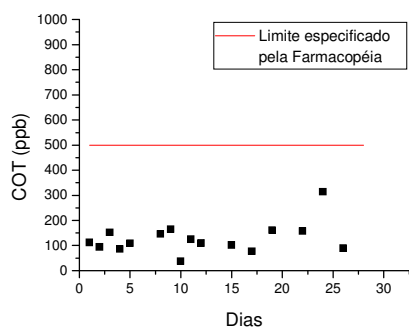


Fig. 10. Monitoramento de COT para o ponto B

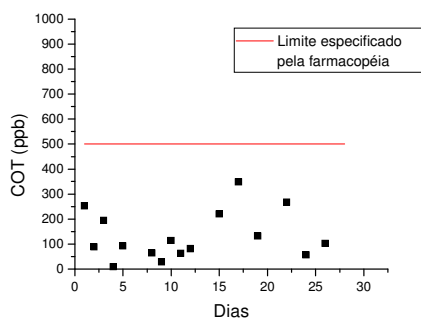


Fig. 11. Monitoramento de COT para o ponto C

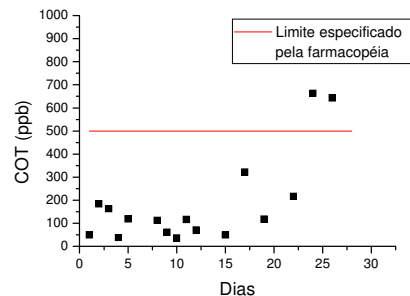


Fig. 12. Monitoramento de COT para o ponto D

Os pontos analisados mantiveram seus valores de COT dentro do limite estabelecido pelas farmacopéias para água purificada e para água para injeção. Em dois dias, no ponto D, o valor de COT ultrapassou o limite de 500 ppb devido a necessidade de sanitização com periodicidade menor por se tratar de ponto de amostragem após reservatório sem sistema de agitação ou iluminação por luz UV.

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de metodologia para a determinação de COT em água purificada e água para injetável e utilização como método rotineiro de avaliação de qualidade de água foram realizados com sucesso sendo de fácil utilização.

Todos os ensaios realizados na validação foram planejados de modo a cumprir os itens preconizados pela norma RE 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Os resultados destes ensaios atenderam as especificações determinadas pela norma e a metodologia para determinação de COT em água para uso radiofarmacêutico foi validada.

Os purificadores demonstraram constância adequada da qualidade da água produzida e os pontos que não atenderam a especificação da farmacopéia ($COT < 500$ ppb) foram justificados e a causa detectada.

O monitoramento de COT pela metodologia desenvolvida demonstrou ser um indicador de performance dos purificadores, e da periodicidade de sanitização dos reservatórios.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Diretoria de Radiofarmácia pelo apoio e infraestrutura, e aos colaboradores do IPEN/CNEN-SP pelo auxílio na realização dos ensaios.

REFERÊNCIAS

- [1] A.D. Eaton, L.S. Clesceri, E.W. Rice, A.E. Greenberg, "Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. 21. ed.", Port City Press, Maryland pp. 1-6, 5-19 - 5-26, 2005.
- [2] R. Dabbah, "USP Pharmaceutical Waters, part 3: General Information Chapters", *BioProcess Int.*, vol. 5(5), pp.18-23, 2006.
- [3] M.R.A. Clementino, P.J.R. Neto, J.R.B. Alencar, "Carbono Orgânico Total: Metodologia Analítica e Aplicações Para Indústria Farmacêutica", *Rev. Bras. Farm.*, vol. 89(1), pp. 74-80, 2008.

- [4] M.B. Neto, S. Rossito, “Validação de Sistemas de Água Purificada (PW e WFI)” *Controle da Contaminação*, vol. 103, 2007.
- [5] [WEBROOTS] “TOC – Carbono Orgânico Total.”, 2008. Disponível em: <http://labcontrol.com.br/webroot/produtos/toc.htm>. Acesso em: 14 abr. de 2008.
- [6] R.M. Couto, “TOC Analysis in Pharmaceutical Industry”, *SBCC*, vol. 19, pp. 24-25, 2005.
- [7] G.J. Farquharson, “Validação do Sistema de Água para injetáveis, Uma Estratégia Para Controle da Contaminação”, *SBCC*, vol. 2, pp. 30-34, 2001.
- [8] I. Bissuti, I. Hllke, M. Raessler, “Determination of Total Organic Carbon – an Overview of Current Methods”, *Trends in Anal. Chem.*, vol. 23(10-11), pp. 716-726, 2004.
- [9] Shimadzu Corporation “TOC-V Control Software Manual”, Tokio, Japan, 2006.
- [10] F.AL. Ribeiro, M.M.C. Ferreira, S.C. Morano, L.R. Silva, R.P. Schneider, “Planilha de validação: uma ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos”, *Quim. Nova*, vol. 31(1), pp. 164-171, 2008.
- [11] [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Resolução RE 899”, 2003, disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>> Acesso em: 19 abr. 2010.
- [12] “Manual de Protocolos de Calidad de Radiofármacos”, *ARCAL XV*, São Paulo, pp. 10, 1999.
- [13] G.B. Saha “Fundamentals of Nuclear Pharmacy 5. ed.”, *Springer*, New York, pp. 46-171, 2004.
- [14] A. Owunwanne, M Pattel, S. Sadek, “The Handbook of Radiopharmaceuticals. 1. Ed.”, *Chapman & Hall Medical*, London, pp. 16-19, 92-130, 1995.
- [15] “Manual de Buenas Praticas Radiofarmaceuticas” *ARCAL XV*, São Paulo, 1988.
- [16] [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Resolução da diretoria colegiada RDC 210”, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/210_03rdc.pdf> Acesso em: 19 abr. 2010.
- [17] [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Resoluções radiofarmacos RDC 63 e RDC 64”, 2009. Disponível em: <http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/leg_norma_pesq_consulta.cfm> Acesso em: 15 abr. 2010.