



SOFIA MENDES ALBUQUERQUE

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validações De Limpeza Em Equipamentos Utilizados
Na Produção De Medicamentos e Dermocosméticos
No Setor De Formas Líquidas E Pastosas

MESTRADO EM QUÍMICA E BIOQUÍMICA

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2023

Validações De Limpeza Em Equipamentos Utilizados Na Produção De Medicamentos E Dermocosméticos No Setor De Formas Líquidas e Pastosas

SOFIA MENDES ALBUQUERQUE

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Doutora Ana Margarida Cepêda,
Garantia da Qualidade, Laboratórios Atral, S. A.

Coorientadores: Professor Doutor Mário Eusébio,
Professor Auxiliar, FCT-NOVA

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria Rôla Coelho,
Professora Associada em Agregação, FCT-NOVA

Vogais: Doutora Sílvia Teresa Santos da Silva Rosa,
Consultora Sénior, Stepscience
Doutora Ana Margarida Cepêda,
Garantia da Qualidade, Laboratórios Atral, S. A.

Validações De Limpeza Em Equipamentos Utilizados Na Produção De Medicamentos E Dermocosméticos No Setor De Formas Líquidas e Pastosas

Copyright © Sofia Mendes Albuquerque, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais.

Aos meus avós.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desta dissertação marca o final de uma etapa muito importante na minha vida e carreira profissional. Este percurso desafiante não teria sido tão recompensador sem o carinho e apoio das pessoas que estiveram ao meu lado.

Antes de mais gostaria de agradecer ao Engenheiro Ricardo Grilo por esta oportunidade incrível que foi a realização do estágio nos Laboratórios Atral, mas também por toda a simpatia, boa disposição e preocupação demonstrada ao longo destes últimos meses.

À minha orientadora, Doutora Margarida Cepeda, pela orientação, tempo disponibilizado e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Mário Eusébio e co-orientador, por todo o apoio e pelo acompanhamento nesta fase.

Às fantásticas pessoas dos Laboratórios Atral com as quais tive a oportunidade de trabalhar e conviver, um obrigado à Doutora Helena Nunes, à Engenheira Nádia Rodrigues, à Sofia Marques, à Carla Paulino, à Doutora Cristina Oliveira, à Doutora Sofia Ferreira e à Dona Manuela Ferreira por toda a disponibilidade e ajuda durante este estágio. Obrigado, também a todos os restantes colaboradores da garantia da qualidade que apesar de não diretamente mencionados partilharam os seus dias comigo, ao João, à Sheila, à Rita, à Beatriz e as restantes pessoas do controlo de qualidade que muito me ajudaram e apoiaram, a todas as colaboradoras da microbiologia pelo tempo disponibilizado e às do setor FLP por toda a paciência e colaboração. E, como não podia deixar de ser, um agradecimento especial à Patrícia Simões pela boa disposição e alegria, pela paciência, orientação e muita disponibilidade que tanto me marcaram.

Um obrigado a todos aqueles que partilharam o seu percurso académico comigo e aos que levarei comigo para a vida, ao João e à Margarida pelos momentos bons e divertidos, mas também por lá terem estado para mim nos momentos difíceis e stressantes, à Mykaella e à Margarida por fazerem os infinitos trabalhos de grupo combinarem com boa disposição.

Um agradecimento especial à Filipa Jorge por todas as horas dispensadas da sua vida dedicadas às infinitas sessões de estudo e de jogo comigo, estes últimos 5 anos não teriam nunca acabado se não tivesses sido tu, a tua paciência e toda a paz e coragem que sempre me transmitiste. Passei os últimos anos a preparar a melhor forma de te agradecer, mas agora que chegou o momento nenhuma palavra escrita será capaz de descrever a gratidão que sinto por este curso te ter introduzido na minha vida.

Um obrigado gigante aos meus amigos do coração, à Sara, à Catarina, ao Zé, ao Pedro e ao Nogueira por todo o apoio e paciência para comigo, mas também por todas as vezes que me obrigaram a parar e a aproveitar a vida.

À minha família, a razão de todo o meu esforço, mas também a razão pela qual definitivamente não vou chegar ao fim dos agradecimentos sem verter umas lágrimas. Obrigada aos meus tios e à minha prima por todo o apoio e palavras encorajadoras. Obrigada aos meus avós, pelos conselhos e lições de vida partilhados.

E, por fim, mas definitivamente mais importante, um grande agradecimento aos meus pais, não só pelo financiamento deste sonho, mas também pelo incondicional apoio e carinho, por todas as palavras apaziguadoras, por sempre terem acreditado em mim. Tudo o que fiz e faço é por vocês.

“We are all in the gutter, but some of us
are looking at the stars.” (Oscar Wild).

RESUMO

O principal foco da indústria farmacêutica é garantir a qualidade dos produtos assegurando a segurança do consumidor. Desta forma, é preciso assegurar a limpeza dos equipamentos entre produções de diferentes produtos, de modo a evitar contaminação cruzada que ponha em causa a composição dos produtos ou a saúde do consumidor através da validação da limpeza do equipamento.

A recente aquisição da marca Barral e de novos equipamentos para produção dos dermocosméticos da marca levou à necessidade de realização de novas validações de limpeza no setor de Formas Líquidas e Pastosas dos Laboratórios Atral tanto dos equipamentos utilizados para a produção de medicamentos como de dermocosméticos.

De modo a definir a quantidade de substância ativa do primeiro produto que pode ser encontrada no segundo recorre-se ao cálculo do PDE. Nesta dissertação foram revistos e calculados os valores de PDE de diversas substâncias ativas utilizadas nos medicamentos produzidos nos diversos setores.

Por forma a garantir que a limpeza dos equipamentos é adequada foram determinados os locais críticos para amostragem, os diferentes testes a efetuar aos equipamentos para a validação de limpeza e a posterior amostragem dos mesmos. As análises efetuadas aos equipamentos são TOC, condutividade, análise em HPLC e análise microbiológica recolhidas em Agitadores, Máquinas de Enchimento de Líquidos, Homogeneizadores, Reservatórios, Reatores e Bombas de Tráfego de Líquidos do setor FLP.

Adicionalmente, foi também validado o método analítico de determinação de Cloridrato de Oximetazolina por TOC.

Em suma, os resultados obtidos apresentam grande valor para a empresa na medida em que os valores dos PDE calculados permitem a melhor avaliação dos produtos-pior caso em cada equipamento, as amostragens efetuadas proporcionaram o ajustamento das instruções de limpeza tornando a higienização dos equipamentos mais robusta e a validação do método analítico de deteção de substância ativa por TOC permitiu a sua utilização como método de análise para prevenir contaminações cruzadas.

Palavras-Chave: validação de limpeza, medicamentos, dermocosméticos, TOC, SA, PDE

ABSTRACT

The focus of the pharmaceutical industry is to guarantee the quality of products while ensuring consumer safety. Therefore, it is necessary to ensure the cleanliness of equipment between productions of different products by validating the cleanliness of the equipment, in order to avoid cross-contamination that could jeopardize the composition of the products or the health of the consumer.

The recent acquisition of the Barral brand and new equipment to produce the brand's dermocosmetics led to the need to carry out new cleaning validations in the Liquid and Pasty Forms sector of Atral Laboratories for both the equipment used for the production of medicines as well as dermocosmetics.

To define the amount of active pharmaceutical ingredient from the first product that can be found in the second, the PDE is calculated. In this dissertation, the PDE values of several active pharmaceutical ingredients used in medicines produced in different sectors were reviewed and calculated.

In order to ensure that the equipment is adequately cleaned, the critical locations for sampling were determined, as well as the different tests to be carried out on the equipment for cleaning validation and subsequent sampling. The analyzes carried out on the equipment are TOC, conductivity, HPLC analysis and microbiological analysis collected from Agitators, Liquid Filling Machines, Homogenizers, Reservoirs, Reactors and Liquid Transfer Pumps in the FLP sector.

Additionally, the analytical method for determining Oxymetazoline Hydrochloride by TOC was also validated.

In short, the results obtained are of great value to the company as the calculated PDE values allow for a better assessment of the worst-case products in each equipment, the sampling carried out allowed for the adjustment of cleaning instructions, making the hygiene of equipment the more robust and the validation of the analytical method for detecting the active pharmaceutical ingredient by TOC allowed its use as an analysis method to assess cross-contamination.

Keywords: cleaning validation, medicines, dermocosmetics, TOC, API, PDE

ÍNDICE

1	ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS.....	1
1.1	Laboratórios Atral S.A.	1
1.2	Contexto e Motivação	2
1.3	Objetivos	4
2	ESTADO DA ARTE	5
2.1	Validação de Limpeza	5
2.2	Instrução de Limpeza	6
2.3	Pior-Caso	9
2.3.1	Produto Pior-Caso	9
2.3.2	Equipamento Pior-Caso.....	12
2.3.3	Local de Amostragem.....	12
2.4	Análises de Risco	12
2.5	Limites de Aceitação	13
2.5.1	Inspeção Visual	13
2.5.2	Substância Ativa.....	14
2.5.3	Microbiologia	20
2.6	Monografia HBEL.....	21
2.7	Plano Mestre de Validação	22
2.8	Protocolos de Validação	22
2.9	Métodos de Amostragem.....	22
2.10	Métodos Analíticos e Validação de Método.....	25
2.10.1	TOC.....	26
2.10.2	Validação de Método	30

3	METODOLOGIA.....	33
3.1	Cálculo do PDE.....	34
3.2	Instruções de Limpeza e Equipamentos a Validar.....	35
3.3	Cálculos Auxiliares ao Limite Analítico.....	46
3.4	Testes Para Validação de Limpeza.....	47
3.4.1	Inspeção Visual.....	47
3.4.2	Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos.....	48
3.4.3	Análise de Resíduos de Substâncias Iônicas.....	49
3.4.4	Análise de Resíduos de Substância Ativa em HPLC.....	51
3.4.5	Determinação da Atividade Microbiana.....	54
3.5	Validação do Método Analítico TOC para a Detecção de Cloridrato de Oximetazolina.....	57
3.6	Testes Para Validação de Limpeza por TOC para Detecção de Resíduos de Cloridrato de Oximetazolina.....	67
3.6.1	Análise de Resíduos de Cloridrato de Oximetazolina por TOC.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	Resultados do Cálculo do PDE.....	71
4.2	Resultados da Validação do Método de Quantificação de Cloridrato de Oximetazolina por TOC.....	78
4.2.1	Conclusões da Validação do Método Analítico.....	94
4.3	Validações de Limpeza.....	95
4.3.1	Apresentação dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos.....	97
4.3.2	Apresentação dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos.....	126
5	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO.....	143
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Diagrama do Encadeamento das Diferentes Etapas Descritas Neste Trabalho.	33
Figura 3.2. Agitador Duplo Cone.....	37
Figura 3.3. Agitador em Hélice.....	37
Figura 3.4. Bomba de Tráfega.....	38
Figura 3.5. Câmara de Pesagem.....	38
Figura 3.6. Homogeneizador 200 L Herba.....	39
Figura 3.7. Homogeneizador 300 L Turbomek.....	39
Figura 3.8. Homogeneizador Melter	40
Figura 3.9. Homogeneizador Tubofix.....	40
Figura 3.10. Máquina de Enchimento Axomatic	41
Figura 3.11. Máquina de Enchimento Axoblock	41
Figura 3.12. Máquina de Enchimento Comadis.....	41
Figura 3.13. Máquina de Enchimento Jolly	41
Figura 3.14. Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini	43
Figura 3.15. Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck.....	43
Figura 3.16. Reator 150 L	44
Figura 3.17. Reservatório 100 L	44

Figura 3.18. Reservatório 150 L – Barral	44
Figura 3.19. Reator 2 000 L	45
Figura 3.20. Reservatório 250 L	46
Figura 3.21. Reservatório 250 L	46
Figura 3.22. Reservatório 350 L – Barral	46
Figura 3.23. Amostragem com Zaragatoas	52
Figura 3.24. Distribuição de Soluções nas Placas de Recuperação.....	60
Figura 3.25. Estrutura Química da Molécula de Cloridrato de Oximetazolina (Fonte [64]).	64
Figura 4.1. Gráfico da Curva de Calibração na Gama 50% a 200% LA.....	80
Figura 4.2. Gráfico da Curva de Calibração na Gama 40% a 120% LA.....	81
Figura 4.3. Gráfico dos Resíduos.....	82
Figura 4.4. Gráfico de Probabilidade Normal.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1. Fatores de Conversão para a Via de Administração (Fonte: [21]).	11
Tabela 2.2. Comparação entre os efeitos adversos e o critério de 0,001 da dosagem em três substâncias ativas (adaptado de [27]).	16
Tabela 2.3. Comparação dos Métodos de Amostragem (Fonte: [11]).	24
Tabela 2.4. Comparação entre os parâmetros recomendados para validação de métodos analíticos das entidades ICH, FDA e os utilizados neste trabalho (Fonte: [56, 60, 61]).	32
Tabela 3.1. Fatores de Ajuste para o cálculo do PDE (Fonte: [62]).	34
Tabela 3.2. Lista de Equipamentos do Setor FLP a Validar.	35
Tabela 3.3. Lista de Equipamentos onde a SA Cloridrato de Oximetazolina é o Produto Pior-Caso A.	57
Tabela 3.4. Materiais Utilizados na Validação do Método Analítico por TOC	57
Tabela 4.1. Cálculo do PDE – Metocarbamol (Fonte: [67])	72
Tabela 4.2. Cálculo do PDE – Minociclina (Fonte: [68])	72
Tabela 4.3. Cálculo do PDE – Ceftriaxona (Fonte: [69])	73
Tabela 4.4. Cálculo do PDE – Penicilina G Benzatínica	73
Tabela 4.5. Cálculo do PDE – Cloridrato de Glucosamina (Fonte: [70])	74
Tabela 4.6. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 1	74
Tabela 4.7. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 2	75
Tabela 4.8. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 3	75
Tabela 4.9. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 4	76

Tabela 4.10. Cálculo do PDE – Cetoconazol (Fonte: [72])	76
Tabela 4.11. Cálculo do PDE – Penicilina G Sódica (Fonte: [74]).....	77
Tabela 4.12. Cálculo do PDE – Penicilina G Procráinica	77
Tabela 4.13. Cálculo do PDE – Cefadroxil.....	78
Tabela 4.14. Cálculos para Determinação do Limite Analítico Pior-Caso.	79
Tabela 4.15. Dados da Curva de Linearidade entre 50% a 200% LA.....	80
Tabela 4.16. Dados da Curva de Linearidade entre 40% a 120% LA.....	81
Tabela 4.17. Intervalos de Confiança a 95% para a Ordenada na Origem e Declive da Regressão Linear.	83
Tabela 4.18. Resultados dos Ensaio Relativos a $\frac{1}{2}$ Limite de Detecção, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	84
Tabela 4.19. %FTOC para as Substâncias em Estudo.	84
Tabela 4.20. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro da Seletividade.....	85
Tabela 4.21. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro da Precisão.	87
Tabela 4.22. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Repetibilidade da Recuperação com Swab.	87
Tabela 4.23. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Repetibilidade da Recuperação com Solvente (água).....	88
Tabela 4.24. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Swab aos níveis 40%, 100% e 120% LA.	89
Tabela 4.25. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Swab aos níveis 40%, 60% e 100% LA.	90
Tabela 4.26. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Solvente.....	91
Tabela 4.27. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade das Soluções de Recuperação com Swab.....	92
Tabela 4.28. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade das Soluções de Recuperação com Solvente.	92

Tabela 4.29. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade no Equipamento de Recuperação com Swab.....	93
Tabela 4.30. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade no Equipamento de Recuperação com Solvente.	93
Tabela 4.31. Testes a Efetuar por Equipamento para as Validações de Limpeza.	96
Tabela 4.32. Dados para o Cálculo do Limite Analítico para os Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos.....	99
Tabela 4.33. Pontos de Amostragem do Agitador Duplo Cone.	102
Tabela 4.34. Pontos de Amostragem do Agitador em Hélice.	103
Tabela 4.35. Pontos de Amostragem da Câmara de Pesagem.....	104
Tabela 4.36. Pontos de Amostragem do Homogeneizador 200 L.....	105
Tabela 4.37. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis.	106
Tabela 4.38. Pontos de Amostragem do Reator 150 L.....	107
Tabela 4.39. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 100 L.....	108
Tabela 4.40. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 250 L.....	109
Tabela 4.41. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 350 L.....	110
Tabela 4.42. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Agitador Duplo Cone.	113
Tabela 4.43. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Agitador em Hélice.....	114
Tabela 4.44. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Bomba de Trasfega de Líquidos SB1.....	115
Tabela 4.45. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Câmara de Pesagem.	116
Tabela 4.46. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador 200 L Herba.	117
Tabela 4.47. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini.	118

Tabela 4.48. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck.....	119
Tabela 4.49. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis.....	120
Tabela 4.50. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Reator 150 L.	121
Tabela 4.51. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Reservatório 250 L.	122
Tabela 4.52. Resumo dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos.....	123
Tabela 4.53. Dados para o Cálculo do Limite Analítico para os Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos.	127
Tabela 4.54. Pontos de Amostragem do Homogeneizador 300 L Tubomek.	129
Tabela 4.55. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Bisnagas Axomatic.....	130
Tabela 4.56. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock.....	131
Tabela 4.57. Pontos de Amostragem da Máquina Doseadora Jolly.....	132
Tabela 4.58. Pontos de Amostragem dos Reservatório 150 L.	133
Tabela 4.59. Pontos de Amostragem dos Reservatório 350 L.	134
Tabela 4.60. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock.	135
Tabela 4.61. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina Doseadora Jolly.	136
Tabela 4.62. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador Melter.	137
Tabela 4.63. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador Turbofix.....	138
Tabela 4.64. Resumo dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos.	139

LISTA DE SIGLAS E ACRÓNIMOS

ASA	– Área de Superfície Amostrada
ASL	– Área de Superfície Lavada
C	– Conforme
CIP	– do inglês <i>Clean in Place</i>
COP	– do inglês <i>Clean Out of Place</i>
CQ	– Controlo de Qualidade
CV	– Coeficiente de Variação
DFA	– do inglês <i>Direct Fluorescent Antibody</i>
DL	– Dimensão de Lote
DP	– Desvio Padrão
EMA	– <i>European Medicines Agency</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FLP	– Fórmulas Líquidas e Pastosas
FR	– Fator de Recuperação
FS	– Fator de Segurança
FSO1	– Setor de Formas Sólidas Orais
FSO2	– Setor de Formas Sólidas Orais Penicilínicas
FSO3	– Setor de Formas Sólidas Orais Cefalosporínicas
FTOC	– Percentagem de Carbono na Molécula
GC	– Garantia da Qualidade
GMP	– Boas Práticas de Fabrico, do inglês <i>Good Manufacturing Practices</i>
HBEL	– Limites de Exposição Baseados na Saúde, do inglês <i>Health-based Exposure Limit</i>
HPLC	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>

ICH – *International Council for Harmonisation*

INJ2 – Setor de Injetáveis Penicílicos

INJ3 – Setor de Injetáveis Cefalosporínicos

LA – Limite Analítico

LD – Limite de detecção

LD50 – Dose Letal para 50% da população em estudo, do inglês *Median Lethal Dose*

LOAEL – Nível Mínimo com Efeitos Adversos Observáveis, do inglês *Lowest Observed Adverse Effect Level*

LQ – Limite de Quantificação

LRA – Limite de Resíduo Aceitável

LRS – Limite Residual de Superfície

MACO – Massa Máxima de Substância Ativa que pode transitar, do inglês *Maximum Allowable Carryover*

MDd – Máxima Dose Diária de Substância B

mDdA – Mínima Dose Diária de Substância A

NC – Não Conforme

NOAEL – Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis, do inglês *No Observed Adverse Effect Level*

PAA – Ácido Peracético

PC – Placa de Contacto

PDE – Limite de Exposição Diária Permitida, do inglês *Permitted Daily Exposure Limit*

r – Coeficiente de Correlação

R² – Coeficiente de Determinação

R2A – do inglês *Reasoner's 2A Agar*

RSE – Desvio Padrão dos Erros Aleatórios

SA – Substância Ativa

SCEP – Superfície de Contacto do Equipamento com o Produto

TOC – Análise do Carbono Orgânico Total, do inglês *Total Organic Carbon*

TSA – Agar de Soja Trypticase, do inglês *Trypticase Soy Agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colónia

VS – Volume de Solvente

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

1.1 Laboratórios Atral S.A.

Os Laboratórios Atral foram fundados em 1947, tendo estado na origem da produção de antibióticos em Portugal [1]. Atualmente, comercializam os seus produtos e serviços não só em Portugal como em diversos mercados internacionais contando presença em mais de 50 países espalhados por todo o mundo, fazendo deles uma das principais companhias exportadoras do setor farmacêutico [2].

Em setembro de 2016, os Laboratórios Atral foram adquiridos pela P.I.P – *Pharmaceutical Investments Portugal Unipessoal, Lda*, passando a integrar o Grupo Medifarma [1, 3].

Mais recentemente, em 2021, os Laboratórios Atral compraram a marca Barral, passando os produtos da marca a ser produzidos, comercializados e distribuídos pelos Laboratórios Atral, adicionando dermocosméticos ao seu vasto portefólio de produtos [4].

Atualmente, para além da produção de antibióticos, a empresa dedica-se também a outras áreas terapêuticas como a produção de medicamentos sujeitos e não sujeitos a receita médica, suplementos alimentares, dermocosméticos e medicamentos de uso veterinário [1].

A produção encontra-se dividida em três unidades industriais, sendo estas Penicilinas, Cefalosporinas e Produção Geral, distribuídas por três edifícios, 10, 25 e 40.

A Produção Geral está localizada no Edifício 10 e é dedicada à produção de princípios ativos que não carecem de segregação específica. A produção diferencia-se em Formas Sólidas Orais (setor FSO1) onde são produzidos comprimidos, comprimidos revestidos e cápsulas de gelatina dura; e em Formas Líquidas e Pastosas (setor FLP) no qual se produzem soluções orais, supositórios, óvulos, cremes e pomadas. [5]

No Edifício 10 pode ainda encontrar-se a oficina de manutenção, o setor da Garantia da Qualidade (GC), o setor de Controlo de Qualidade (CQ) que engloba os laboratórios de controlo de qualidade, de investigação e desenvolvimento e da microbiologia.

No Edifício 25 encontra-se a unidade segregada dedicada unicamente à produção de medicamentos antibióticos da família das Penicilinas. Neste edifício existem dois setores de produção: as Formas Sólidas Orais Penicilínicas (FSO2) dedicadas à produção de comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina dura, saquetas com pó para soluções orais e pó para soluções e suspensões orais; e a unidade Injetáveis Penicilínicos (INJ2) onde é produzido pó para preparação de soluções ou suspensões de administração injetável intravenosa e intramusculares. [6]

Por fim, o Edifício 40 engloba a unidade segregada dedicada exclusivamente à produção de medicamentos antibióticos da família das Cefalosporinas estando repartido nos setores de Formas Sólidas Orais Cefalosporínicas (FSO3) onde são produzidos comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina dura e pó para soluções e suspensões orais e no setor de Injetáveis Cefalosporínicos (INJ3) responsável pela produção de pó para preparação de injetáveis [7].

A produção dos novos produtos dermocosméticos da marca Barral será assegurada pelo setor das Formas Líquidas e Pastosas da unidade de Produção Geral, no Edifício 10.

1.2 Contexto e Motivação

A principal preocupação da indústria farmacêutica é a saúde do consumidor, razão pela qual é regida por normas e diretrizes a nível europeu e mundial. As boas práticas de fabrico (GMP) são um sistema de gestão de qualidade descritos sob a forma de um conjunto de regulações para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar com o propósito de minimizar os riscos envolvidos na produção dos produtos. As GMPs cobrem todos os aspetos envolvidos na produção desde as matérias-primas ao treino dos colaboradores. Assim, certos países e regiões têm entidades que asseguram a implementação e harmonização destas leis, como é o exemplo da *European Medicines Agency* (EMA) e da *US Food and Drug Administration* (FDA). [8]

A nível europeu, a EMA obriga a que qualquer fabricante de medicamentos destinados ao mercado na união europeia tenha de seguir as GMP, qualquer que seja a sua localização geográfica.

Para a indústria farmacêutica, as GMP permitem assegurar que os medicamentos apresentam consistente alta qualidade, são apropriados para o uso pretendido e que cumprir com os requisitos de autorização para introdução no mercado ou autorização de ensaios clínicos. [9]

Na indústria farmacêutica, se os produtos não possuem a qualidade adequada podem infringir efeitos adversos não desejáveis nos consumidores ou até mesmo resultar na sua morte. Assim, o departamento da garantia da qualidade (GQ) e do controlo de qualidade (CQ) de uma fábrica são importantes responsáveis pelo cumprimento das leis em vigor de modo a assegurar a manutenção da qualidade e a segurança dos produtos. [10]

Neste sentido, uma das preocupações da garantia da qualidade é contaminação cruzada entre produtos. Muitas vezes o mesmo equipamento é utilizado na produção de diversos produtos, podendo este contactar com várias substâncias ativas (SA) diferentes. Nestes casos, o risco de contaminação cruzada é acrescido, sendo, por isso, de extrema importância minimizá-lo, garantindo a correta limpeza dos equipamentos, por forma a evitar que o produto seguinte contenha quantidades residuais do produto anterior, que comprometam a sua integridade ou sejam prejudiciais à saúde.

Por forma a avaliar a limpeza efetuada entre o fabrico de produtos distintos num mesmo equipamento são realizadas validações de limpeza através da realização de diversos testes químicos e microbiológicos.

Especializados no fabrico e comercialização de medicamentos com diversificadas substâncias ativas, os Laboratórios Atral não tinham ainda experiência no que toca à produção de dermocosméticos.

A aquisição da marca Barral e a sua inserção no setor FLP originou novos desafios nomeadamente relativos às validações de limpeza. Foram adquiridos novos equipamentos dedicados à produção de dermocosméticos a juntar ao equipamento já existente no setor, utilizado para produção de fármacos o que levou à necessidade de reestruturação do setor para acomodar as exigências associadas ao fabrico de novas fórmulas, o que afetou também os restantes produtos comercializados previamente.

Por forma a avaliar a limpeza dos equipamentos entre a produção de diferentes formulações químicas, era de extrema importância determinar a existência de resíduos de substância ativa, no entanto, os novos produtos não necessitam deste tipo de testes, pois não se enquadram na categoria de medicamentos uma vez que não possuem substâncias ativas.

Assim, o objetivo da presente dissertação é assegurar e desenvolver metodologias de limpeza eficazes e robustas para os novos equipamentos destinados à produção exclusiva dos produtos da marca Barral e efetuar as respetivas validações de limpeza bem como rever, atualizar e reavaliar os processos de limpeza dos equipamentos previamente existentes no setor dedicados ao fabrico de medicamentos.

1.3 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- Rever e calcular os valores de PDE das seguintes substâncias ativas: Metocarbamol, Minociclina, Ceftriaxona, Penicilina G Benzatínica, Cloridrato de Glucosamina, Cefotaxima, Cetoconazol, Penicilina G Sódica, Penicilina G Procaínica e Cefadroxil.
- Rever e atualizar os protocolos de validação de limpeza dos equipamentos do setor FLP destinados à produção de medicamentos:
 - Desenvolvimento do método analítico para detecção da substância ativa Cloridrato de Oximetazolina em TOC;
 - Efetuar a validação de limpeza dos equipamentos.
- Elaborar os protocolos de validação de limpeza dos equipamentos do setor FLP destinados à produção de dermocosméticos e efetuar a respetiva validação de limpeza.

ESTADO DA ARTE

2.1 Validação de Limpeza

As validações de limpeza têm como objetivo assegurar que o processo de limpeza utilizado na mudança de produto num determinado equipamento, consistentemente conduz a uma superfície de contacto com os produtos limpa, ou seja, cujos resíduos presentes do produto anterior se encontrem dentro de limites pré-estabelecidos, que não representem perigo para a saúde do paciente ou ponha em causa a qualidade do produto [11].

Segundo a *Guideline on process validation for finished products – information and data to be provided in regulatory submissions* da EMA de 10 de novembro de 2016, existem várias abordagens à validação de processos, sendo elas tradicionais, verificação contínua ou um modelo híbrido. Esta diretriz visa encorajar o uso da verificação contínua do processo em adição ou ao invés do processo tradicional.

A abordagem tradicional consiste na validação de um processo após a conclusão do seu desenvolvimento. Já a verificação contínua envolve a monitorização e avaliação continua ao longo do processo de desenvolvimento. O modelo híbrido engloba a combinação de ambas as abordagens podendo cada uma ser empregue em etapas diferentes do processo a validar. [12]

Relativamente a validações de limpeza, a abordagem tradicional normalmente consiste em demonstrar que uma certa instrução de limpeza proporciona a obtenção de resultados dentro dos limites pretendidos. Esta metodologia seguia uma abordagem rígida dos passos a completar para finalizar a validação. No entanto, atualmente, considera-se que estes processos têm o objetivo de desenvolver e continuamente melhorar e verificar o processo de limpeza enquanto este for utilizado. [11]

Esta abordagem apresenta 3 etapas fundamentais:

- 1ª Etapa

Engloba a criação de um plano de validação, selecionar agentes de limpeza, determinar limites de exposição baseados na saúde (HBEL), definir parâmetros críticos, selecionar métodos analíticos validados, averiguar a sua recuperação, ter em atenção o *design* do equipamento, agrupar equipamentos, definir limites e critérios de aceitação [11].

- 2ª Etapa

Qualificação do processo de limpeza, no qual se inclui a seleção dos pontos de amostragem, a criação de um protocolo de validação de limpeza, proceder à execução do mesmo e realizar o relatório final de validação.

Estas etapas permitem flexibilidade na medida em que o conhecimento e informação recolhida no decorrer da segunda etapa pode requerer voltar à primeira etapa, caso seja necessário maior desenvolvimento. [11]

- 3ª Etapa

Nesta etapa deve-se assegurar a verificação contínua da limpeza através do estabelecimento de revisões periódicas, determinar possíveis alterações dos prazos de amostragem, análise e *cleaning holding times*, rever desvios e alterações.

As informações recolhidas nesta fase podem requerer voltar a qualquer uma das anteriores e efetuar mudanças. [11]

2.2 Instrução de Limpeza

Para elaborar uma instrução de limpeza é preciso ter em consideração as possíveis substâncias deixadas no equipamento e que se pretendem limpar, estas substâncias podem ser substâncias ativas excipientes, agentes de limpeza, etc. Para estes potenciais resíduos deveriam ser considerados dados como solubilidade, concentração, dificuldade de limpeza e as condições de degradação ou desativação.

Uma parte importante da metodologia de limpeza é a seleção de um agente de limpeza adequado à remoção dos resíduos em questão, pois este deve ter a capacidade de dissolver, soltar ou degradar a substância que se pretende remover. A seleção do agente e as condições de limpeza como a concentração ou a temperatura devem ser avaliadas para o tipo de resíduo usado e justificadas com estudos laboratoriais. É de notar que os próprios agentes de limpeza podem deixar resíduos na superfície do equipamento e têm de ser removidos abaixo do limite estabelecido. [11]

Parâmetros do processo de limpeza que devem ser avaliados são: a concentração de reagente, a sequência de reagentes, se mais do que um for utilizado, o volume a usar, a temperatura, o tempo de ação, o número de ciclos de limpeza, a necessidade de efetuar pré-lavagens, duração do tempo de secagem.

Qualquer método de limpeza deve assegurar a eficácia da limpeza diminuindo o risco de contaminação cruzada em equipamentos multiproduto, assim como ser seguro para o paciente e resultando ainda num equipamento visualmente limpo.

Existem diversos métodos de limpeza que podem ser empregues. Os três grandes grupos são a limpeza manual, *Clean in Place* (CIP) e *Clean out of Place* (COP). [11]

- Limpeza Manual

Muitas vezes utilizada para a limpeza de partes de equipamentos desmontáveis ou frágeis é relativamente simples, mas trabalhosa para os operadores. Envolve a limpeza dos equipamentos com o auxílio de uma esponja ou toalhete, banhos de imersão ou ultrassônicos.

No entanto, por ser manual, dependerá de operador para operador pelo que poderá ser inconsistente. Desta forma, é recomendado a formação contínua dos operadores, uma vez que é necessário que estejam familiarizados com as partes do equipamento e o processo de desmontagem e montagem.

Durante o processo de validação de limpeza deve-se realizar as amostragens após a limpeza de diferentes operadores de modo a mitigar a variabilidade. [11]

- *Clean in Place* (CIP)

Este tipo de método envolve equipamentos com sistemas automáticos para a remoção de resíduos sendo, normalmente, utilizado em situações em que não seja necessário desmontar o equipamento. Estes sistemas são muito utilizados especialmente na indústria farmacêutica e na indústria alimentar e, na maioria dos casos, é utilizada uma solução aquosa de detergente que é dispersa no equipamento.

Uma unidade normal CIP contém reservatórios, filtros e centrifugadoras. [11]

Um ciclo de lavagem com CIP usualmente contempla as seguintes fases:

- Pré CIP

Após finalização da produção, o excesso de compostos ainda restante no equipamento deve ser removido o máximo possível. [11]

- Primeiro Enxaguamento

Primeiramente, o CIP transfere água para o equipamento a ser limpo, nesta fase a maioria dos componentes ainda no equipamento são removidos. O tempo desta fase deve ser definido de forma que assegure a remoção de resíduos facilmente removíveis, mas tendo em atenção o consumo de água. Esta água deve ser completamente removida do equipamento antes da próxima fase. [11]

- Lavagem com Soluções Alcalinas

Esta etapa pode ser de uma simples passagem ou pode haver recirculação da solução de lavagem, onde o agente de limpeza é diluído na água do reservatório e inserido no equipamento através do CIP, a solução é drenada ou recirculada de volta para o sistema de recirculação do CIP [11].

O agente de limpeza é uma solução aquosa alcalina que pode conter agentes umectantes ou aditivos. A substância mais comumente presente nestas soluções de lavagem é o hidróxido de sódio, NaOH, em concentrações entre os 0,5 a 2%. Concentrações superiores a 4% apenas são utilizadas quando os resíduos se encontram incrustados no equipamento [13].

O uso de soluções alcalinas nesta fase tem o propósito de hidrolisar e dissolver compostos orgânicos como gorduras e óleos permitindo a sua fácil remoção. Estas soluções podem atuar por saponificação, onde as gorduras e óleos são convertidos em compostos solúveis em água, emulsificação, onde as partículas dos resíduos ficam em suspensão e podem ser facilmente enxaguadas, por destruição das ligações dos óleos na superfície de metais, e quando em conjunto com agentes umectantes, diminuem a tensão na superfície oleosa e promovem o seu descolamento da superfície metálica. [14]

Adicionalmente, o uso de pHs elevados inibe o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas por inativação da síntese de ATP e indução de stress oxidativo [15].

Seguidamente, o sistema efetua uma purga de gás onde é utilizado ar comprimido ou nitrogénio para limpar o CIP e os tubos do processo de resíduos da solução de lavagem anterior permitindo também que a pressão dentro do equipamento se dissipe e que a solução seja escoada [11].

- Enxaguamento Intermédio

Este enxaguamento é utilizado para remover resíduos deixados no equipamento pela solução de lavagem alcalina [11].

- Lavagem com Soluções Ácidas

É considerado como uma etapa opcional sendo realizada com uma solução aquosa ácida cujo objetivo é neutralizar resíduos alcalinos anteriores e remover compostos inorgânicos como sais minerais calcificados e óxidos, tendo também o efeito de abrillantar aço inox descolorado.

Mais uma vez o sistema utiliza ar comprimido ou nitrogénio para limpar a canalização da solução anterior, aliviar a pressão dentro do equipamento e permitir o escoamento da solução. [11]

- Último Enxaguamento

O objetivo do enxaguamento final é a remoção de agentes químicos e de limpeza da superfície do equipamento. A duração desta etapa é definida para cumprir os limites de validação de limpeza estabelecidos para a última água de lavagem, normalmente pela medição da condutividade ou por TOC, efetuado diretamente pelo sistema CIP. [11]

- Sanitização ou Esterilização

É uma etapa utilizada com o propósito de eliminar microrganismos ou diminuir o seu número dentro dos limites aceitáveis antes do início da produção seguinte.

A substância mais comumente utilizada nesta etapa é o cloro em solução (lixívia), no entanto, a tendência tem sido a diminuição do uso de desinfetantes à base de lixívia e a sua substituição por ácido peracético (PAA), que contém uma combinação de peróxido de hidrogénio e ácido acético. [13]

A produção de líquidos, cremes e pomadas é particularmente suscetível à criação de microrganismos [16], pelo que uma etapa de sanitização antes da realização de uma nova produção pode contribuir para a manutenção dos níveis microbiológicos dentro dos limites aceitáveis.

- *Clean Out of Place (COP)*

Limpeza de um equipamento ou de partes do equipamento fora do seu local normal durante a produção. Este tipo de sistemas pode ser automático destinado a lavar partes do equipamento ou semi-automático como é o caso de lavagens ultrassónicas.

Entende-se por lavagem semiautomática uma lavagem automática que envolve a desmontagem do equipamento, o seu manuseamento ou transporte. [11]

2.3 Pior-Caso

2.3.1 Produto Pior-Caso

Na indústria farmacêutica, o processo de fabrico de produtos distintos pode passar por um mesmo equipamento. No caso da produção de medicamentos, várias substâncias ativas podem entrar em contacto com o mesmo equipamento, levando ao perigo de contaminação cruzada.

Esta problemática foi primeiramente identificada em 1988 quando uma farmacêutica se apercebeu que uma substância ativa utilizada na produção de um medicamento, a colestiramina USP, tinha sido contaminada com resíduos derivados da produção de pesticidas agrícolas, devido à falta de limpeza de equipamento partilhado na produção de ambos os compostos [17].

A mitigação deste risco é de extrema importância de modo a assegurar que uma dada substância ativa A, não contamine uma substância ativa B, de tal modo que comprometa a sua formulação ou constitua um risco para a saúde do doente.

Desta forma, durante o processo de validação são avaliados os produtos pior-caso. O produto pior-caso A é aquele no qual se pretende estudar a eficácia da limpeza e o produto pior-caso B aquele em que se admite poder encontrar resíduos do produto A. Segundo o Anexo 15 das GMP, a determinação da substância pior-caso deve ter em consideração aspetos como a dificuldade de limpeza de acordo com a experiência de produção, a solubilidade no solvente usado (normalmente água), a sua potência e toxicidade [18]. Para avaliar a severidade de cada parâmetro considerado são usadas ferramentas de análise de risco como a FMEA que permite a atribuição de valores de severidade a cada parâmetro permitindo a sua comparação.

A determinação do produto pior-caso A, até 2015, poderia ser realizada de diversas formas, podendo ser utilizados dados toxicológicos como LD₅₀ ou PDE [19].

Desde junho de 2015 que a validação de limpeza de fármacos em equipamentos onde são produzidos diversos produtos é efetuada tendo por base o valor do PDE da substância ativa, derivado da entrada em vigor da diretriz “*Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities*” da EMA (European Medicine Agency).

Segundo esta diretriz, o cálculo do PDE permite justificar os limites de aceitação utilizados em validações de limpeza bem como ser utilizado como método de identificação de riscos.

Assim, atualmente, a identificação e escolha de piores-casos pode ser efetuada pelo cálculo e avaliação do valor do PDE de uma substância. O PDE representa a dose de uma substância que não se prevê causar efeitos adversos num indivíduo caso administrada todos os dias durante a sua vida. É expresso em massa por dia (mg/dia), tendo por base uma massa corporal de 50 kg que deve ser usada quando o cálculo é efetuado para medicamentos humanos. Se o medicamento for para uso veterinário, uma massa de 1 kg deve ser considerada por ser assumida como massa mínima corporal de qualquer animal. [20]

A determinação do PDE envolve a identificação de perigos e efeitos críticos da substância em questão, a determinação do NOAEL (nível de efeito adverso não observado) ou LOAEL (nível mínimo com efeitos adversos observáveis) e ainda a determinação de fatores de ajuste relativos a fontes de incerteza.

A maioria dos estudos toxicológicos utiliza a administração por via oral, no entanto o intencionado para esse produto poderá ser outra via como parenteral, inalação ou tópica. Desta maneira, na ausência de dados sobre a via de administração parenteral ou por inalação para o cálculo do PDE são aplicados fatores de modificação baseados na biodisponibilidade oral (vide Tabela 2.1.) [21].

Tabela 2.1. Fatores de Conversão para a Via de Administração (Fonte: [21]).

Biodisponibilidade Oral	FC via adm.
<1%	100
≥1% e <50%	10
≥50% e <90%	2
≥90%	1

No caso de a via de administração intencionada do produto ser tópica ou transdérmica o recomendado é multiplicar um valor de 10 pelo valor do PDE para a via parenteral. Esta abordagem assume que a biodisponibilidade parenteral é de 100% e a cutânea ≤1%. Caso estes valores sejam conhecidos e diferentes o cálculo é feito segundo a seguinte equação (adaptado de [21]):

$$FC \text{ via admin.} = \frac{\%Biodisp. \text{ cutânea} \times 10}{\%Biodisp. \text{ parenteral}} \quad \text{Equação 2.1}$$

FC via admin.: Fator de Correção aplicável quando a via de administração do estudo não corresponde ao intencionado.

%Biodisp. cutânea: Biodisponibilidade por via de administração tópica ou transdérmica, assumir 1% quando indisponível

%Biodisp. parenteral: Biodisponibilidade por via de administração parenteral, assumir 100% quando indisponível

Assim, o cálculo do PDE é efetuado da seguinte maneira (adaptado de [20]):

$$PDE = \frac{NOAEL(\text{ou LOAEL}) \times \text{Peso}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5 \times FC \text{ via admin.}} \quad \text{Equação 2.2}$$

PDE: Exposição Diária Permitida

NOAEL: Nível de efeito adverso não observado

Peso: Considera-se como peso mínimo de um adulto 50 kg

F1: Extrapolação entre espécies

F2: Variabilidade entre indivíduos

F3: Tempo de exposição para os testes de toxicidade

F4: Conforme estudos de toxicidade reprodutiva ou toxicidade severa

F5: Fator aplicável se não tiver sido estabelecido NOAEL

FC via admin.: Fator de Correção aplicável quando a via de administração do estudo não corresponde ao intencionado.

2.3.2 Equipamento Pior-Caso

É bastante comum na indústria a existência de diversos equipamentos iguais, cuja limpeza se efetua da mesma forma ainda que por eles possam passar produtos distintos. Nestes casos, de modo a facilitar os processos de validação de limpeza, usam-se estratégias de agrupamento de equipamentos por forma a diminuir o número de amostragens necessárias ao processo de validação.

Assim, para o grupo de equipamentos com o mesmo *design*, dimensões e material de construção basta validar a limpeza para o equipamento no qual é produzido o produto pior-caso, assumindo-se que se o método de limpeza é adequado à remoção desse resíduo dentro dos limites de aceitação é também tão ou mais eficaz à remoção de outros resíduos. [11]

2.3.3 Local de Amostragem

A seleção dos locais de amostragem é um passo crítico do processo de validação de limpeza. A escolha deve ter em conta os locais pior-caso, ou seja, aqueles possivelmente contaminados por um produto durante o seu fabrico, as áreas de difícil limpeza e de fácil acumulação de produto, o material de construção do equipamento, etc, de modo que os locais escolhidos sejam fielmente representativos do estado de limpeza do equipamento. [22]

2.4 Análises de Risco

A fabricação de medicamentos inclui um certo risco, quer ao nível da qualidade do produto, quer no manuseamento dos componentes usados. Assim, é especialmente importante entender e quantificar os riscos associados ao processo de fabrico de medicamentos por forma a assegurar a qualidade do produto, a sua segurança e eficácia.

O risco é definido pela combinação de fatores como a probabilidade da ocorrência de danos e a severidade dos mesmos.

Deste modo, a indústria farmacêutica deve ser regida por uma gestão de risco de qualidade para que proactivamente sejam identificadas e controladas as causas e as consequências de potenciais riscos

para a qualidade do produto durante o desenvolvimento, fabrico e distribuição do mesmo, descritas na diretriz ICH Q9(R1). [23]

Por forma a conseguir tomar decisões justificadas pela análise dos riscos e a sua minimização, quando possível, são utilizadas ferramentas de análise de riscos das quais uma das mais utilizadas a FMEA (*Failure Mode Effects Analysis*).

A FMEA proporciona uma avaliação dos potenciais modos de falha de um processo, a sua probabilidade de ocorrência e de deteção e as consequências. É usada para dividir processos complexos em etapas mais simples e fáceis de gerir, podendo ser utilizada para priorizar riscos e monitorizar a eficácia do controlo de riscos. [24]

No entanto, existem muitas outras ferramentas de análise de risco como a *Failure Mode, Effects and Criticality Analysis* (FMECA), *Fault Tree Analysis* (FTA), *Hazard Analysis And Critical Control Points* (HACCP), *Hazard Operability Analysis* (HAZOP), *Preliminary Hazard Analysis* (PHA), entre outras [23, 24].

2.5 Limites de Aceitação

2.5.1 Inspeção Visual

A inspeção visual é um critério importante das validações de limpeza segundo o Anexo 15 das Boas Práticas de Fabrico (GMPs) [18] e caracteriza-se pela observação de todas as superfícies visíveis em contacto com o produto após cada limpeza. Se o equipamento contiver resíduos visíveis é automaticamente considerado como não limpo.

É possível determinar o limite de resíduos visíveis distribuindo certas quantidades de substância em placas que representem o material de construção do equipamento, deixar secar e posteriormente serem avaliadas por um grupo de pessoas [11]. Pelo menos 4 operadores com visão 20/20 ou visão corrigida 20/20 devem ser seleccionados para o estudo [19]. Visão 20/20 significa visão normal, ou seja, é um termo usado para classificar a acuidade visual considerada normal segundo a tabela de visão Snellen, assim, um indivíduo ter visão 20/20 significa que consegue ver com nitidez normal a 20 pés de distância (correspondente a 6 metros) [25].

A observação deve ser efetuada sob diferentes condições de luz, distância e ângulo. Se os resíduos forem consistentemente observados a um nível conhecido então esse é o limite da inspeção visual. Caso o limite seja muito inferior ao limite de aceitação de limpeza (menor que 20% da margem de segurança) então a inspeção visual pode ser utilizada como método de verificação da limpeza do equipamento, uma

larga margem entre o limite visual obtido e o limite de aceitação permite acomodar variações entre os operadores. No entanto, na maioria das vezes não é considerada adequada por si só, sendo complementada com métodos de amostragem diretos.

A inspeção visual deve ser efetuada por pessoal qualificado e verificado por outro operador.

Os parâmetros mais impactantes e que devem ser avaliados no estudo para a determinação do limite de resíduo visual são o material de construção do equipamento, a luz, a distância, o ângulo, a variabilidade da visualização de operador para operador e efeitos associados ao uso de solventes. [11]

Devem ser estudados pelo menos três ângulos de visualização, normalmente 30°, 45° e 90°, três distâncias e duas intensidades de luz diferentes [26].

Podem ainda existir áreas do equipamento onde é impossível realizar inspeção visual. Nestes casos, deve ser assegurado que essas partes sejam limpas de modo tão ou mais robusto que as visíveis e que as visíveis são tão ou mais difíceis de limpar para que se possa concluir que as não visíveis estejam tão limpas quanto as partes visíveis. Podem ainda ser utilizadas técnicas como a boroscopia que, através da utilização de uma câmara acoplada a um cabo permite a visualização de partes interiores do equipamento.

A remoção de odores e resíduos com coloração devem ser aspetos a ter em consideração durante a limpeza e devem ser inspecionados utilizando o olfato e inspeção visual. Para estes casos não existem limites de resíduos calculáveis. O teste deve ser efetuado por pessoal não envolvido no fabrico do produto uma vez que não estão dessensibilizados a possíveis odores. [11]

2.5.2 Substância Ativa

Em 1993 Fourman and Mullen publicaram um artigo intitulado de *Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations* onde sugeriam alguns métodos para definir limites de aceitação de limpeza [27].

Este artigo apresentava 3 abordagens que passaram a ser vastamente usadas na indústria farmacêutica.

- Critério de 0,001 da Dosagem

Nesta abordagem determina-se que não deverá existir resíduos de um produto superiores a 0,001 da sua máxima dose diária noutro produto [24].

Para efeitos de cálculo era tido em consideração 0,001 da menor dosagem de produto A produzida expressa em mg/dia e qual a quantidade de ingrediente ativo presente, a máxima dose diária de produto

B por dia, o tamanho do lote do produto B, a área do equipamento que entra em contacto simultaneamente com ambos os produtos A e B e a área amostrada [25].

O fator de 0,001 advém do uso de um fator de 10 uma vez que muitas vezes um fármaco é considerado não ativo quando a 1/10 da sua dose, outro fator de 10 de forma a assegurar uma limpeza robusta e ainda um fator de 10 para segurança [11].

Assim, a fórmula utilizada para o cálculo é (adaptado de [28]):

$$MACO = \frac{0,001 \times mDdA \times DL \times ASA}{MDdB \times SCEP} \quad \text{Equação 2.3}$$

MACO: Massa de substância ativa da substância A permitida no produto B por área de amostragem

mDdA: Mínima dose diária de substância A

DL: Dimensão de Lote do produto B

ASA: Área da superfície amostrada

MDdB: Máxima dose diária de produto B

SCEP: Área da superfície do equipamento que entra em contacto com ambas as substâncias A e B

- Critério 10 ppm

Indica que qualquer substância ativa poderá estar presente no produto consequente até um nível máximo de 10 ppm. Para efeitos de cálculo, é assumido que 10 mg de ingrediente ativo do produto A pode estar contido num quilograma do produto B, tendo em conta a dimensão do lote de produto B produzido, a área do equipamento que entra em contacto simultaneamente com ambos os produtos A e B e a área amostrada. [25]

Este critério era muitas vezes empregue quando o limite determinado pelo Critério de Dosagem era muito elevado, pelo que se usava o critério 10 ppm para manter o nível permitido de resíduos transferidos por contaminação cruzada inferiores [24].

Segundo este critério o limite permitido de substância A no produto B é dado por (adaptado de [28]):

$$MACO = \frac{R \times DL \times ASA}{SCEP} \quad \text{Equação 2.4}$$

MACO: Massa de substância ativa da substância A permitida no produto B por área de amostragem

R: 10 mg de substância ativa A em 1 kg de produto B

DL: Dimensão de Lote do produto B

ASA: Área da superfície amostrada

SCEP: Área da superfície do equipamento que entra em contacto com ambas as substâncias A e B

- Critério de Inspeção Visual

Determina que para se considerar um equipamento devidamente limpo, nenhum resíduo deveria ser visível após limpeza [25].

No entanto, nenhuma destas abordagens era baseada nos potenciais riscos para a saúde que resíduos do produto A encontrados no produto B pudessem causar.

O Critério de Dosagem apenas tem em consideração a dosagem de medicamento prescrita. Na Tabela 2.2. encontram-se três medicamentos diferentes, os seus efeitos adversos, a menor dose clínica e a definição dos limites de aceitação de limpeza para este método [24].

Tabela 2.2. Comparação entre os efeitos adversos e o critério de 0,001 da dosagem em três substâncias ativas (adaptado de [27]).

Substância Ativa	Efeitos Adversos	Dose (mg)	0,001 da Dosagem (mg)
Cloridrato de Cetirizina	Sem efeitos adversos sérios	5	0,005
Ribavirina	Embriocida e Teratogénico	800	0,8
Capecitabina	Cardiotoxicidade e toxicidade hematológica	4 000	4

Com esta comparação pretende-se enfatizar que este método ignora os efeitos adversos das diversas substâncias. O Cloridrato de Cetirizina é um anti-histamínico com poucos e leves efeitos adversos com uma dosagem mais pequena quando comparado ao anti-viral rabivirina e ao capecitabina um medicamento usado em quimioterapia que apresentam dosagens bastante superiores. Segundo este método, o limite residual permitido era bastante menor para o medicamento que apresenta o menor número e em menor severidade de efeitos adversos uma vez que apenas se baseia na sua dose máxima diária [27].

Adicionalmente, a utilização deste critério baseado somente na posologia do medicamento levanta também outras questões. Por exemplo, a mínima dose diária corresponde à menor dose administrada em adultos saudáveis ou deveria também incluir potenciais reduções de posologia necessárias para doentes potencialmente sensíveis; se a posologia for complexa, por exemplo, fármacos administrados intermitentemente como uma vez por semana ou por mês é adequado que se divida a dose tomada pelo número de dias compreendidos entre a dosagem; em substâncias que são administradas poucas vezes durante a vida mas que podem contaminar outras administradas diariamente, faz sentido utilizar essa posologia; Qual é a confiança associada ao valor de 0,001 em substâncias que causam efeitos adversos sérios numa única dose [29].

Este critério muitas vezes (85%) levava a limites menores do que se fosse tido em conta o risco para a saúde (PDE). No entanto, nos restantes 15% dos casos, quando o risco para a saúde é elevado, os limites utilizados estavam abaixo do requerido pelo critério do PDE, o que apresenta perigo para a saúde dos doentes.

Apesar de na maioria dos casos os limites estarem abaixo do determinado avaliando o risco para a saúde (PDE), a margem de segurança não estava devidamente avaliada pelo que era impossível prever os 15% dos casos em que o limite deveria ser inferior. [27]

Outro estudo que avaliou 140 substâncias produzidas pela Novartis concluiu algo semelhante. Na maioria das substâncias o limite determinado pelo Critério de Dosagem mostrou-se inferior ao obtido utilizando o PDE, mas em 10% das substâncias o valor estabelecido passou a ser inferior ao anteriormente calculado utilizando 0,001 da dosagem. [17, 29]

Quanto ao Critério 10 ppm, este servia apenas para diminuir o limite quando este era bastante elevado, baseado no limite utilizado pela indústria alimentar, no entanto, a sua imposição dificulta a averiguação da verdadeira margem de segurança usada.

Em ambos os critérios, quando se trata de medicamentos de baixa potência com pouco risco associado, a determinação de limites menores que o realmente necessário levava a complicações desnecessárias e cuidados extremos para cumprir o limite, incluindo alterações nos processos de fabrico e introdução de equipamentos dedicados ou até mesmo linhas de produção dedicadas quando na realidade o risco não é elevado como o limite artificialmente imposto leva a querer. [27]

Outro critério para a limitação da quantidade de produto que pode ficar como resíduo no produto seguinte tinha por base o valor de LD₅₀, um valor expresso em massa por massa corporal (mg/kg). Este parâmetro avalia a dose administrada oralmente em estudos com animais que provoca a morte a metade da população. Por apenas considerar a toxicidade em animais de uma dada substância é considerado pouco preciso na determinação de riscos para a saúde humana pelo que deixou de ser considerado apropriado para a determinação de limites. [17]

Continuar a utilizar estes limites sem averiguar dados pré-clínicos ou clínicos para cada composto pode desvalorizar o perigo real para a saúde derivado da contaminação cruzada ou, por levar a limites demasiado conservadores, aumentar o custo de produção para a empresa.

De modo a regulamentar e uniformizar a averiguação e identificação de riscos bem como justificar os limites utilizados nas validações de limpeza, a EMA lançou, em 2014, a diretriz “*Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities*”. Nela apresentam uma sugestão de avaliação do risco de contaminação

cruzada baseada em dados científicos de farmacologia e toxicidade. Estes limites são baseados na saúde (HBEL) tendo por base a exposição diária permitida (PDE). Esta nova abordagem entrou em vigor em 2015, pelo que, desde então, é a única forma de calcular os limites de transferência de uma substância A para o produto B em validações de limpeza. [20]

O objetivo da introdução desta nova abordagem baseada nos riscos para a saúde não é diminuir os limites usados para todos os compostos de forma que sejam os mais baixos possíveis, ao revés visa determinar limites reais e quantificáveis que tenham por base dados científicos de ensaios pré-clínicos e clínicos de forma a melhor estabelecer os riscos de cada substância.

Nas abordagens supramencionadas o limite de aceitação é calculado assumindo que o produto continua ativo após a limpeza. No entanto, sob condições extremas de limpeza como pH (<2 e >13) e a altas temperaturas (60°C-80°C) o ingrediente ativo pode tornar-se farmacologicamente inativo [27].

Assim, pode ser interessante definir limites de limpeza para o produto inativo, que serão superiores aos calculados para o ingrediente ativo. Esta abordagem pode mostrar-se vantajosa nos casos em que os limites de aceitação se encontram abaixo do limite de quantificação (LQ) do método analítico utilizado, como no caso do método não específico TOC, cujo LQ se encontra no intervalo de 0,05 a 0,2 ppm.

Adicionalmente, para o ingrediente inativo a sua atividade farmacológica assemelhar-se-á à de um excipiente, cujo limite de validação é apenas visual.

A avaliação da inatividade pode ser conduzida expondo o ingrediente ao pior-caso das condições de limpeza em escala laboratorial, uma vez que as condições de fragmentação e inativação são independentes da escala dependendo apenas do tempo, temperatura, concentração e razão entre a solução de limpeza e o produto a limpar.

A limpeza pior-caso é efetuada nas condições menos propensas de levar à inativação como a utilização de menor quantidade de detergente, temperatura e duração da limpeza. Além da utilização de condições mais leves de operação podem ainda ser eliminadas etapas do processo se estas apresentarem um cenário pior-caso à desativação do ingrediente simplificando os estudos conduzidos em escala laboratorial. No entanto, a alteração do processo pode também levar a efeitos inesperados como a agregação da substância ativa.

Após o tratamento dos resíduos com a limpeza pior-caso estes são titulados até pH neutro e arrefecidos até 4°C para evitar maior degradação.

O grau de fragmentação ou atividade biológica pode ser avaliado recorrendo a SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) e provas biológicas, respetivamente. SDS-PAGE solubiliza

proteínas agregadas e não agregadas e separa-as consoante o seu peso molecular, enquanto as provas biológicas medem a quantidade relativa de produto biologicamente ativo.

As amostras podem ainda ser analisadas no TOC para determinar se o método é adequado à recolha e análise destes resíduos, uma vez que, sendo um método não específico, é útil para a deteção de produtos degradados. [30]

Os critérios de aceitação são baseados na abordagem *Comparable Quality*. Esta abordagem indica que a quantidade de produto A inativo existente na máxima dose de produto B produzido posteriormente é menor ou igual à quantidade de produto A inativo num segundo lote de produto A. Esta abordagem assenta no facto de, se a qualidade do produto A foi estudada e é adequada sendo aceitável aos pacientes tomarem certa dose de produto A com produto A inativado, então também é aceitável que outros pacientes que tomem o produto B estejam expostos à mesma ou menor quantidade de produto A inativo. [31]

Para a definição dos limites de aceitação assume-se que a massa de substância inativa do produto A que se pode encontrar no produto B é a mesma de uma molécula referência ou classe de moléculas comparáveis ou piores do ponto de vista da segurança. [30]

A escolha da impureza referência é realizada com base na toxicidade e imunogenicidade, determinada pela resposta imunológica do organismo e a complexidade química. Quanto maior a complexidade maior o peso molecular da molécula e maior a tendência para causar uma reação imunológica. Para desencadear uma reação imunológica a molécula tem de ser reconhecida como estranha pelo organismo. Tipicamente, fragmentos com pesos moleculares inferiores a 10 kDa são fracos desencadeadores de reações imunológicas.

Desta forma, a molécula de referência selecionada deve representar o fragmento de substância inativa tanto na sua capacidade de fragmentação como na reação imunológica do sistema. [32]

Assim, tendo esse valor para a molécula referência, os cálculos para a determinação do limite de aceitação são os seguintes (adaptado de [30]):

$$MACO = \frac{M_r^{dose} \times DL \times ASA}{MDd \times SCEP} \quad \text{Equação 2.5}$$

MACO: Massa de substância ativa da substância A permitida no produto B por área de amostragem

M_r^{dose}: Massa da molécula de referência aceitável por dose

DL: Dimensão de Lote do produto B

ASA: Área da superfície amostrada

MDd: Máxima dose diária de produto B

SCEP: Área da superfície do equipamento que entra em contacto com ambas as substâncias A e B

Caso não seja detetada atividade da substância após a limpeza, então este tipo de abordagem e os limites desta forma calculados podem ser utilizados na validação de limpeza para as amostras recolhidas no equipamento. Se, no entanto, for detetada atividade parcial, pode-se calcular os limites segundo esta abordagem e os limites calculados para a substância ativa e utilizar o menor dos dois. No caso de a substância não sofrer inativação, então os limites determinados para a substância ativa devem ser usados. [30]

2.5.3 Microbiologia

Segundo o Anexo 9 das GMPs deve ser realizado o controlo microbiológico e de endotoxinas, especialmente quando se trata de líquidos, cremes e pomadas uma vez que são formulações particularmente suscetíveis a contaminação microbiológica durante o processo de produção. [16]

Estes contaminantes podem advir de diferentes fontes como o ambiente, matérias-primas e humanas. Ao contrário do que sucede com os resíduos de substância ativa e outros componentes presentes no medicamento e/ou agentes de limpeza, a contaminação microbiológica que é recolhida durante a amostragem do equipamento pode não se relacionar diretamente com a contaminação do equipamento uma vez que os microrganismos podem morrer, ser inibidos ou multiplicar-se. Deste modo, a recuperação microbiológica não segue regras tão estritas e os critérios de aceitação são baseados em dados históricos e não dados fixos.

Existem vários métodos de amostragem, os quais se encontram divididos em dois grupos: os métodos diretos onde estão incluídas as zaragatoas e placas de contacto e métodos indiretos como a passagem de água.

É preciso ter em consideração, principalmente no método indireto, o impacto de resíduos de agente de limpeza ou outros componentes do produto produzido que possam afetar os resultados inibindo o crescimento microbiológico. [11]

Tipicamente na indústria farmacêutica, o limite de aceitação encontra-se entre os 25 ou 50 UFC por placa de contacto de 25 cm² para sólidos de administração oral [11]. Estes valores têm pouca base científica tendo sido propostos como uma diminuição do limite de aceitação, uma vez que o uso de fórmulas de cálculo muitas vezes conduz a limites por placa bastante superiores ao contável [33].

Uma proposta alternativa à utilização destes valores como limites de aceitação microbiológicos é a determinação do valor da capacidade do processo, Ppk, através da análise de dados recolhidos em várias validações de limpeza. Este valor permitirá inferir sobre se o limite utilizado é ou não adequado

e, deste modo, proporcionará a definição de um limite de aceitação baseado nos riscos identificados. [34]

No entanto, para produtos aquosos não estéreis como preparações aquosas para administração oral, inalação e uso vaginal, o limite é de 100 UFC/mL para microrganismos aeróbicos e 10 UFC/mL para o total de fungos e bolores [11, 35, 36].

É possível calcular o limite de aceitação microbiológica utilizando a seguinte fórmula (adaptado de [11]):

$$Limite = \frac{DL \times 100 \text{ UFC/mL} \times FS \times ASA}{SCEP} \quad \text{Equação 2.6}$$

Limite: Número de unidades formadoras de colónia aeróbicas por área amostrada (para fungos e bolores corresponde a 0,1 do limite obtido)

DL: Dimensão de Lote do produto B

FS: Fator de segurança 0,01 para produtos não estéreis

ASA: Área da superfície amostrada

SCEP: Área da superfície do equipamento que entra em contacto com ambas as substâncias A e B

É recomendado que se opte pelo valor mais pequeno entre 25/50 UFC/25cm² ou o obtido segundo a fórmula acima descrita [11].

2.6 Monografia HBEL

Como já referido, a definição dos limites de aceitação em validações de limpeza deve considerar dados científicos concretos, tendo por base o valor do PDE.

Esta abordagem deve ser efetuada para todas as substâncias produzidas na fábrica e deverá ser compilada numa monografia resumo. Esta monografia deverá conter informação relevante sobre a farmacologia e toxicologia da substância, incluindo dados clínicos e não clínicos. Nela deve estar identificado o composto químico em questão, o seu mecanismo de ação, qualquer perigo para a saúde encontrado em ensaios pré-clínicos, a farmacocinética e farmacodinâmica da substância ativa e possíveis vias de exposição que não a originalmente intencionada. Nesta monografia deverá estar também descrito o processo de cálculo do PDE para cada substância e quais os fatores de ajuste usados. [17]

Deste modo, a pesquisa dos PDE das SA presentes nas fórmulas comercializadas pelos Laboratórios é essencial para assegurar o cumprimento das normas europeias estabelecidas, avaliar produtos pior-caso e definir limites de aceitação a ser usados em validações de limpeza.

2.7 Plano Mestre de Validação

Este plano visa documentar a gestão de riscos associados às validações de limpeza, mantendo o controlo dos perigos e reduzindo os riscos, pelo que deve incluir o processo de avaliação de risco nas fases iniciais do desenvolvimento de um programa de limpeza.

Incluídos no plano mestre de validação devem estar a matriz dos compostos produzidos nos diversos equipamentos no caso de fábricas multiproduto e o processo e definição dos produtos e substâncias ativas pior-caso, o plano de recolha de amostras, como os métodos de amostragem utilizados, e a seleção dos métodos analíticos como HPLC, TOC e amostragem microbiológica.

Assim, um plano mestre de validação deve conter as intenções e as abordagens utilizadas, a organização, execução e as atividades de validação e qualificação. [11]

2.8 Protocolos de Validação

A correta execução dos protocolos de validação é fulcral para a obtenção dos dados necessários para validar o processo de limpeza, sendo escritos após este ter sido desenvolvido. Deve incluir o procedimento de limpeza a ser validado, os produtos compreendidos no protocolo, a descrição do equipamento e da sua área de superfície, os resíduos a serem removidos, os materiais de limpeza utilizados, os métodos analíticos e os métodos microbiológicos utilizados, os métodos e técnica de recolha de amostras, os limites de aceitação e o seu cálculo e o tempo máximo de intervalo entre o uso e a limpeza e entre a limpeza e o uso.

É recomendado a amostragem teste antes da execução do protocolo em sistemas novos ou complexos, de modo a verificar se todos os elementos do processo de limpeza foram corretamente implementados. [11]

2.9 Métodos de Amostragem

No processo de validação de limpeza a amostragem dos equipamentos após higienização é imprescindível.

Existem dois métodos de recolha de amostras considerados aceitáveis, estes são amostras obtidas diretamente da superfície do equipamento, método direto, e com passagem de solvente, método indireto [37].

- Método Direto

Este método é o mais comum, envolvendo, normalmente, a utilização de zaragatoas constituídas por uma ponta de material inerte como algodão para que o impacto nos resultados seja o menor possível. A utilização de zaragatoas envolve um esfregaço da mesma repetidamente na área de amostragem. Os fatores a ter em consideração são a área amostrada e o número de zaragatoas realizadas bem como a técnica de amostragem e deverão estar especificados no protocolo de validação.

A amostragem deverá ser feita com base nos locais pior-caso do equipamento, de mais difícil acesso, que deverão estar especificados no protocolo de validação. [37]

Este método permite a remoção física de resíduos, a escolha de solventes nos quais os resíduos são solúveis, pouco volume de extração resultando na capacidade de medir resíduos menores. No entanto, possui também algumas desvantagens como a reduzida área amostrada, pouca acessibilidade a alguns locais como tubos e evasivo em equipamentos fechados como reservatórios.

A área a amostrar recomendada é 25 cm² mas áreas como 100 cm² podem ser usadas, permitindo aumentar a sensibilidade do método. A técnica de amostragem a ser utilizada deve ser em ziguezague pressionando firmemente a zaragatoa de forma que haja um contacto total entre a ponta da zaragatoa e a superfície ao longo de toda a superfície amostrada, a zaragatoa deve ser virada para que o outro lado também contacte com a superfície de amostragem em ziguezague perpendicularmente à efetuada para a outra face.

Se a área do equipamento não permitir que a amostragem seja realizada num quadrado então deve ser efetuada numa área e padrão semelhante. [11]

- Método Indireto

A passagem de solventes permite a amostragem de maiores áreas do equipamento e locais de difícil acesso permitindo obter uma ideia mais completa do estado de limpeza geral do equipamento. Este tipo de amostragem pode ser especialmente útil quando averiguando a existência de resíduos provenientes de agentes de limpeza e detergentes. Este método deve ser usado em combinação com outros métodos como diretos.

Quando utilizando este método é necessário averiguar a percentagem de recuperação conseguida. Uma recuperação menor que 50% é considerada como pouco fiável, enquanto acima de 50% é considerada razoável e acima de 80% boa. [37]

- Método Placebo

Consiste na preparação de um lote placebo no equipamento que é posteriormente analisado em busca de resíduos da substância produzida anteriormente. É um método dispendioso e de difícil

realização uma vez que deve ser realizado durante o processo de produção. Deveria ser acompanhado por outro dos métodos supramencionados uma vez que não garante a transferência uniforme e total dos resíduos do equipamento especialmente se as partículas do contaminante forem demasiado grandes. [37]

Em suma, na Tabela 2.3., encontram-se um resumo das vantagens e desvantagens associadas aos métodos de amostragem por zaragatoas, passagem de solvente e placebo.

Tabela 2.3. Comparação dos Métodos de Amostragem (Fonte: [11]).

Tipo de Amostragem	Vantagens	Desvantagens
Placebo	- Permite simular o processo de preparação do produto seguinte.	- De difícil execução; - O resíduo pode não ser dispersado no placebo uniformemente; - Desencorajado quando usado por si mesmo.
Zaragatoa (Swab)	- Permite a remoção física de resíduos; - Permite a escolha de um solvente em cujo produto de interesse seja solúvel; - As amostras podem ser recolhidas do local pior-caso; - Volumes de extração pequenos o que permite a medição de baixas quantidades de resíduo.	- Pequena área de amostragem; - Impossível utilização em áreas de acesso difícil ou constringido; - Invasivo em equipamentos fechado como é o caso de reservatórios.
Passagem de Solvente	- Permite manter o equipamento fechado; - Simples execução e menor número de amostras recolhidas; - Fornece informação sobre o estado completo do equipamento; - Amostra locais de difícil acesso ou que não podem ser desmontados; - O volume de solvente usado é ajustável;	- O produto de interesse pode não ser solúvel; - O equipamento/processo tem poder ser molhado pelo solvente; - Pode não chegar a partes mais fisicamente recônditas do equipamento; - Não permite obter informação sobre o local dos resíduos, caso sejam detetados; - Difícil controlo sobre as áreas amostradas; - Menor poder físico de remoção de resíduos.

2.10 Métodos Analíticos e Validação de Método

Para a análise das amostras recolhidas durante a validação de limpeza é necessária a utilização de métodos analíticos. Estes métodos enquadram-se em duas grandes categorias, métodos específicos e não específicos.

- Métodos específicos

Um método específico é aquele que consegue quantificar o resíduo em estudo excluindo qualquer outras interferências, sendo específico para a deteção de apenas a molécula de interesse. Normalmente, estes métodos envolvem separações cromatográficas, para a separação do composto em estudo e a sua quantificação. [38]

O método mais usado em validações de limpeza é o HPLC, consistindo numa coluna cromatográfica, que separa o composto de interesse do resto dos componentes da amostra incluindo detergentes, excipientes, etc. A análise utilizando este método pode ser extensa uma vez que cada injeção demora cerca de 30 a 40 minutos. [11] Outras fontes reportam tempos de análise mais baixos, cerca de 10 a 15 minutos [39, 40, 41, 42, 43, 44]. No entanto, os tempos de análise podem ser tão extensos quanto 60 minutos como mencionam outros artigos [45, 46, 47, 48].

No entanto, existem outros métodos como é o caso da absorção atómica (AA), específica para a deteção de iões metálicos como sódio ou potássio.

Cromatografia iónica, específica para a análise de aniões e catiões presentes em detergentes.

Espetroscopia ultravioleta utilizada para casos em que os surfactantes possuem um cromóforo.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) usado para a análise de proteínas para a determinação de ativos. [38]

Mas existem também outros métodos como Cromatografia Gasosa (GC), Espetrometria de Massa (MS) e Espetroscopia de Infravermelho (IR) [11].

- Métodos Não Específicos

Esta classe de métodos mede uma determinada propriedade resultante da contribuição de todos os componentes com essa propriedade na amostra, não fornecendo informação sobre a natureza química da substância com essa propriedade. Normalmente, quando utilizando um método não específico assume-se que a propriedade medida advém exclusivamente do resíduo em estudo.

Exemplos de métodos não específicos são titulações, medições de pH, condutividade e TOC.

As titulações são utilizadas para averiguar a presença de agentes de limpeza.

As medições de pH, ainda que úteis para a monitorização de soluções com pH extremos, são pouco fiáveis em torno de pH neutros.

A condutividade mede a quantidade de iões presentes numa solução, podendo ser utilizada para a averiguação de alcalinidade ou acidez de agentes de limpeza.

Mas o método não específico mais comum é o TOC. Este método envolve a oxidação dos carbonos presentes na amostra e consequente deteção do dióxido de carbono produzido. Contabiliza todo o carbono orgânico presente na amostra, pelo que quando aplicado em validações de limpeza para a deteção de substâncias ativas, todo o resíduo deve ser admitido como sendo o resíduo de interesse. [11]

2.10.1 TOC

Todas as tecnologias utilizadas num equipamento TOC devem diferenciar entre carbono inorgânico, presente na água como dióxido de carbono dissolvido ou bicarbonato e do CO_2 proveniente da oxidação de moléculas orgânicas na amostra. O valor de TOC expresso como concentração de carbonos na amostra é dado pela diferença entre o total de carbonos contabilizados na amostra e o carbono inorgânico presente.

Existem diferentes tecnologias utilizadas num equipamento de análise TOC. Relativamente à tecnologia de oxidação pode ser utilizado combustão ou através de luz ultravioleta com oxidante persulfato.

A técnica de combustão utiliza temperaturas de pelo menos 600°C e, para ajudar no passo da oxidação, pode ser utilizado um catalisador, normalmente óxido cúprico, platina ou óxido de cobalto.

Já o método da oxidação por persulfato ultravioleta utiliza a luz UV para dissolver os compostos orgânicos e oxidá-los completamente a CO_2 . A amostra é exposta à luz UV através de uma lâmpada no interior do equipamento que converte os compostos orgânicos a dióxido de carbono gasoso. No caso de existir compostos orgânicos em quantidade superior a 1 ppm, o persulfato, um forte agente oxidante, é adicionado de modo a garantir a completa oxidação.

Relativamente ao método de deteção utilizado no equipamento para deteção da concentração de CO_2 existem dois métodos: Infravermelho não dispersivo (NDIR) e medição de condutividade.

Na tecnologia NDIR, a medição do gás é feita devido à absorção de energia de cada gás na região do infravermelho do espectro. Enquanto que pela medição da condutividade, existem dois sensores pelos quais a solução aquosa passa e que medem a concentração total de carbono e a concentração total de carbono inorgânico. Ambos os métodos, apesar de sensíveis a poucas concentrações de TOC, podem

estar sujeitos a interferência iónica pelo que o uso de uma membrana semipermeável seletiva apenas a CO₂ é muitas vezes utilizada. [49]

Esta membrana presente nos equipamentos *Sievers* M9 TOC Analyzers* da Veolia previne a interferência de ácidos, bases e compostos halogenados na medição da amostra [50].

Uma característica muito interessante no âmbito das validações de limpeza é a possibilidade de seleção de autoreagente existente na série 900 do *TOC Sievers Analyzers* que assegura a completa oxidação da amostra através da otimização automática dos fluxos de ácido e oxidante [49].

Este equipamento *Sievers M9* utiliza a oxidação por persulfato UV e o método de deteção realiza-se por membrana condutimétrica possuindo deteção no intervalo de 0,03 ppb a 50 ppm, exatidão de +/- 2% e precisão de 1% RDS. O tempo de análise de uma amostra é cerca de 2 a 3 minutos, podendo ainda ser reduzido a 4 segundos quando em modo Turbo. A calibração deve ser feita anualmente. [49, 50]

A utilização deste método, por não ser específico, não fornece informação sobre o nível exato do resíduo em estudo presente na amostra, mas determina se o resíduo está dentro do critério de aceitação. Assim, apesar de medir todas as contribuições de carbono orgânico presentes, como provenientes de excipientes e detergentes de limpeza, se todas essas contribuições se encontram abaixo do limite de aceitação, então com certeza a substância em estudo também estará. No entanto, o contrário não se verifica, ou seja, se o valor determinado estiver acima do limite de aceitação não é possível determinar qual a contribuição da substância em estudo e se esse resíduo estaria dentro do limite. [38]

Este método tem sido cada vez mais utilizado no âmbito das validações de limpeza devido às vantagens que apresenta em comparação com HPLC. Uma das desvantagens dos métodos não específicos, como o TOC, prende-se com o facto de não determinar os carbonos provenientes apenas do resíduo em estudo, no entanto, a utilização de um método específico como HPLC pode levar à necessidade da realização de diferentes testes analíticos para analisar diferentes substâncias como outros contaminantes ou agentes de limpeza podendo levar ao aparecimento de picos desconhecidos se estes estiverem presentes na amostra juntamente com o composto em estudo. [49]

No entanto, o facto de a fonte dos carbonos presentes na amostra não poder ser determinada apresenta vantagens na medida, em que mesmo que o composto em estudo se encontre degradado, o método detetará na mesma a sua presença uma vez que o número de carbonos não varia [51].

Outra vantagem do TOC em relação ao HPLC é o tempo de análise que é substancialmente mais reduzido. Muitas vezes o tempo longo de análise em HPLC, o aparecimento de picos desconhecidos e o custo elevado da análise e manutenção fazem com que seja uma técnica a ser substituída pelo TOC. Também o investimento e o tempo de formação de operadores são bastante maiores quando se trata de

HPLC, sendo a formação insuficiente a maior causa de mensagens de alerta enviadas pela FDA após inspeções.

Foram comparados os métodos HPLC e TOC do ponto de vista dos custos inerentes à sua utilização e concluiu-se que o custo total de um analisador TOC é cerca de 30 a 40% mais barato que um HPLC, o custo de operação diminui entre 40 a 80% e o tempo do desenvolvimento do método também é reduzido entre 60 a 70% quando optando pelo TOC. [49]

Num outro estudo realizado para comparação entre os custos associados à utilização de uma unidade HPLC e outra de TOC, foram analisadas 2 500 amostragens com 3 repetições cada, num ano. Este estudo concluiu que a nível de custos do equipamento, ambos são bastante semelhantes, já nos custos de manutenção o TOC mostra-se 25% mais económico. O TOC é mais rápido em 125 horas de trabalho, o que se traduz em 20% menos custos de mão de obra e também a nível de consumíveis fica mais em conta em 19% em relação ao HPLC. Assim, o investimento num equipamento TOC para a realização das análises das amostras de validação de limpeza em detrimento de uma unidade de HPLC leva a uma economia de 12% em custos anuais. [52]

Num estudo realizado nos Laboratórios Atral, ambos os equipamentos foram utilizados no contexto das validações de limpeza para análise das amostras, tendo sido efetuada a comparação entre o tempo de análise de cada um. Os dados recolhidos demonstram que em cada análise efetuada em HPLC a amostra é injetada duas vezes, demorando 15 minutos a análise de cada injeção sendo ainda necessário a análise de uma solução padrão como forma de comparação para o cálculo do resultado, já no equipamento TOC, cada análise é lida apenas uma vez demorando cerca de 12 minutos. Assim, foi comparado o tempo despendido em cada equipamento para a análise de 4 amostras. O equipamento TOC levou 48 minutos no total a efetuar a análise, enquanto que, para as mesmas 4 amostras, em HPLC o tempo necessário foi de 180 minutos. Desta maneira, concluiu-se que o HPLC demora cerca de 3 vezes mais tempo do que o método TOC. Adicionalmente, o método HPLC implica ainda o tempo de preparação da fase móvel e da solução padrão, não contabilizados nesta comparação, mas que aumentam o tempo de análise em comparação com o método TOC, onde não é necessária a preparação adicional de soluções.

Adicionalmente, neste estudo foram também efetuadas as validações dos métodos de amostragem por zaragatoa ('swab') para análise de uma mesma substância ativa em ambos os equipamentos HPLC e TOC. O limite analítico desta substância ativa é 2 ppm. Em TOC, o limite de quantificação do método (LQ) foi de 73,57 ppb. No entanto, para a mesma SA, mas em HPLC, o limite de quantificação foi de 4,33 ppm, valor superior ao limite analítico em estudo. Desta forma, concluiu-se que a análise das amostras em HPLC não seria possível para esta SA uma vez que o limite analítico para a SA é inferior ao

limite de quantificação calculado. Estes valores demonstram outra grande vantagem do TOC comparativamente ao HPLC uma vez que a sua gama de trabalho permite a análise de substâncias com baixos limites analíticos. [53]

Existem também desvantagens associadas ao TOC, uma vez que as amostras são extremamente suscetíveis de serem contaminadas através de contacto físico ou devido à presença de compostos voláteis no ar, pelo que o processo de amostragem deve ser cuidadoso. Mesmo com todas as precauções existirá sempre valores de TOC presentes ainda que muito baixos, estas contribuições podem ser estudadas pela análise de brancos, como zaragatoas e água branco que não estiveram em contacto com o produto e são analisadas ao mesmo tempo que as restantes amostras. Os resultados dos brancos poderão ser subtraídos aos resultados obtidos nas amostras de modo a tentar eliminar as contribuições de fatores externos à amostra em estudo. [51]

O solvente utilizado não pode ser orgânico, uma vez que isso aumentaria drasticamente a quantidade de carbonos presentes na amostra, pelo que a água é o único solvente utilizado [51]. Assim, a solubilidade dos compostos costumava apresentar uma preocupação na medida em que se pensava que, para utilizar este método, as substâncias a amostrar teriam de ser solúveis em água, sendo excluídas todas as consideradas como insolúveis [54]. A *Eurofins BioPharma Product Testing* desenvolveu métodos utilizando TOC para a análise de compostos pouco solúveis em água. Este desenvolvimento levou à conclusão de que os compostos só precisam de ser ligeiramente mais solúveis em água que o limite a controlar, ou seja, se o limite máximo de contaminação for 10 ppm, o composto apenas tem de ser solúvel em 11 ppm de água [51].

No artigo *The Right Analytical Method for the Right Application: TOC Analysis for Cleaning Validation* a questão da solubilidade e da escolha do TOC para a análise de compostos considerados como pouco solúveis também foi abordada. Neste artigo é apresentada uma tabela onde se compara a recuperação obtida utilizando o HPLC e o TOC para três compostos poucos solúveis. Conclui-se que, as recuperações utilizando o TOC são bastante boas (>78%) para os três compostos, apresentando o TOC uma maior recuperação em relação ao HPLC para os dois compostos menos solúveis. [49]

Adicionalmente, o uso de água como solvente pode ser uma grande vantagem, uma vez que, a utilização de outros solventes poderá deixar resíduos no equipamento e ser necessária validação adicional para garantir que esses resíduos se encontram em níveis aceitáveis antes da produção do próximo produto no equipamento.

2.10.2 Validação de Método

De maneira a assegurar a correta análise de uma determinada amostra através da utilização de métodos analíticos é necessário que esse método se encontre validado. Para a validação do método devem ser avaliados uma série de parâmetros.

O TOC é um método aceite segundo o Anexo 15 das Boas Práticas de Fabrico (GMPs) [18] pelo que, mediante validação, pode ser utilizado no âmbito das validações de limpeza. A sua validação é semelhante ao que é realizado para os restantes métodos analíticos como o HPLC. Segundo a diretriz ICH Q2(R2), para este tipo de métodos é necessário estudar os seguintes parâmetros: exatidão e precisão, seletividade, linearidade e percentagem de recuperação, e averiguação dos limites de deteção e quantificação assim como o intervalo de concentrações [55, 56]. Apesar da robustez não constar da lista esta deveria ser também considerada [56].

A exatidão é demonstrada através da comparação entre os resultados medidos e os esperados [55, 56]. É expressa como a percentagem de diferença entre uma concentração medida no TOC e da concentração esperada.

A precisão é medida como o desvio padrão ou coeficiente de variação (CV) e fornece informação sobre o quão parecidas as várias análises da mesma amostra estão umas das outras. Durante o processo de validação estes parâmetros podem ser avaliados, analisando amostras com uma concentração conhecida do composto de interesse e avaliando a percentagem de diferença e o coeficiente de variação [55]. Recomenda-se o uso de no mínimo 9 determinações em pelo menos 3 níveis diferentes de concentrações com 3 réplicas cada ou avaliando um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração em teste. Os dados a retirar deste estudo devem ser o desvio padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança [56].

A seletividade deve ser avaliada ainda que nem sempre seja possível demonstrar que o método analítico seja específico para um analito em particular.

Para o parâmetro da linearidade deve ser observado uma relação linear entre a resposta dada pelo equipamento e a concentração do analito de interesse através do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados deste parâmetro devem apresentar a representação gráfica obtida, a equação da regressão e o coeficiente de correlação ou o coeficiente de determinação. O impacto de qualquer padrão não aleatório no gráfico de resíduos da regressão deve ser avaliado. [56]

A avaliação da relação linear entre duas variáveis contínuas pode ser definida pelo coeficiente de correlação (r) que toma valores entre -1 e 1. Caso o valor obtido seja negativo, as variáveis apresentam proporcionalidade inversa, caso seja positivo apresentam proporcionalidade direta e se o valor obtido

for 0 então não existe relação de linearidade entre ambas as variáveis. Quanto maior a correlação entre as variáveis em estudo, mais perto o valor estará de -1 ou 1, dependendo do tipo de proporcionalidade apresentada. [57, 58]

Outro indicador de linearidade comumente usado é o coeficiente de determinação (R^2). Ao contrário do coeficiente de correlação que define o tipo de correlação entre duas variáveis, o coeficiente de determinação permite averiguar qual a variação da variável dependente que é explicada pela variável independente. Este coeficiente é dado pelo quadrado do coeficiente de correlação pelo que varia de 0 a 1. Quanto mais perto o valor obtido para este coeficiente for de 0 pior é o modelo uma vez que a variação de uma variável não é explicada pela outra e quanto mais perto de 1 melhor é o modelo uma vez que esta variação da variável dependente é fortemente devida à variável independente. [59]

A regressão linear obtida deve apresentar um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,97 [55]. Noutra literatura é aconselhado que o coeficiente de correlação seja ser superior a 0,995 [58]. Para a avaliação da linearidade um mínimo de 5 concentrações, obtidas pela diluição de uma solução mãe, devem ser estudadas.

Para determinar se o método é adequado é importante avaliar o nível de recuperação conseguido. Para este parâmetro são avaliadas diferentes concentrações amostradas utilizando água com baixo TOC e, no caso de amostragem com zaragatoas, zaragatoas de baixo TOC [55].

O limite de deteção (LD) avalia se a resposta obtida é proveniente de ruído do instrumento ou do composto em estudo, pelo que corresponde à concentração mínima detetável pelo instrumento, mas não necessariamente quantificável com um valor exato. Já o limite de quantificação (LQ) é o valor mínimo de concentração que pode ser quantificado com precisão e exatidão.

A avaliação destes limites pode ser efetuada de várias formas diferentes, como baseada em avaliação visual normalmente utilizada em métodos sem o uso de um instrumento, sinal-ruído para procedimentos analíticos que contenham ruído de fundo, podendo ser averiguado através da comparação entre amostragens de branco e amostragens com baixas concentrações do analito em estudo (para LD é recomendado uma razão de sinal ruído de 3 ou 2:1 e para LQ uma razão de 10:1) e ainda através do desvio padrão da resposta e do declive obtido que pode ainda ser efetuado a partir do desvio padrão do branco ou da curva de calibração e é dado pela seguinte fórmula (adaptado de [56]):

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad \text{Equação 2.7}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad \text{Equação 2.8}$$

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

σ : Desvio padrão das amostras branco ou desvio padrão residual da regressão ou desvio padrão da interseção em y

S: Declive da curva de calibração

O intervalo de concentrações a analisar, no qual o método se deve apresentar linear, normalmente deve ir de 80 a 120% da concentração em estudo.

A robustez mede a capacidade de o procedimento analítico não ser afetado por pequenas variações, fornecendo informação sobre a confiabilidade do método em uso normal. Pode ser averiguada através do estudo da estabilidade das soluções analíticas. [56]

Na Tabela 2.4. encontra-se uma comparação entre os parâmetros recomendados avaliar numa validação de um método analítico segundo a ICH e FDA bem como os parâmetros utilizados neste trabalho.

Tabela 2.4. Comparação entre os parâmetros recomendados para validação de métodos analíticos das entidades ICH, FDA e os utilizados neste trabalho (Fonte: [56, 60, 61]).

Parâmetros	ICH	FDA	Utilizado Neste Trabalho
Seletividade	+	+	+
Sensibilidade	-	+	-
Linearidade	+	-	+
Exatidão	+	+	+
Precisão	+	-	+
Recuperação	-	+	+
Reprodutibilidade	-	+	-
Gama de Trabalho	+	-	+
LD e LQ	+	-	+
Robustez	+	-	-
Estabilidade	-	+	+

‘+’: Parâmetro recomendado

‘-’: Parâmetro não mencionado

METODOLOGIA

Neste capítulo serão abordadas as metodologias utilizadas para a realização deste trabalho e obtenção de resultados. Na Figura 3.1. encontra-se um esquema resumo dos temas abordados neste capítulo respeitando a ordem pela qual vão ser apresentados.

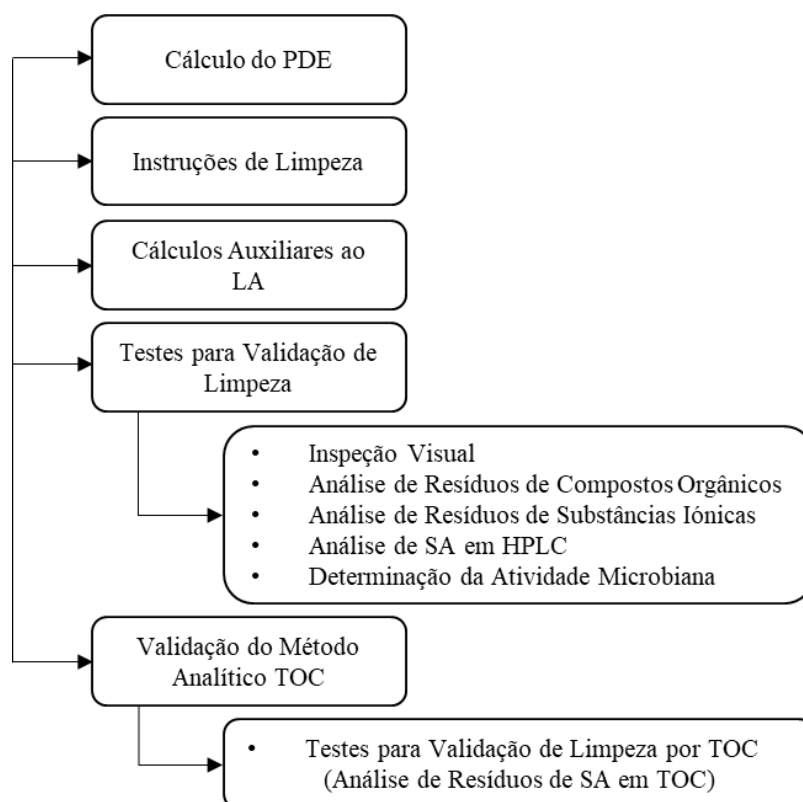


Figura 3.1. Diagrama do Encadeamento das Diferentes Etapas Descritas Neste Trabalho.

3.1 Cálculo do PDE

O cálculo do PDE, Limite de Exposição Diária Permitida, é realizado segundo a Equação 2.2. O valor do NOAEL ou do LOAEL é retirado de estudos toxicológicos e, em função das características do estudo, são definidos os fatores de ajuste F1 a F5 de acordo com os dados apresentados na Tabela 3.1..

Tabela 3.1. Fatores de Ajuste para o cálculo do PDE (Fonte: [62]). (Parte 1/2)

F1 – Fator a ter em conta para a extrapolação entre espécies	
1	Valor usado quando se usa LOEL, por ser dose terapêutica em humanos não existe extrapolação
2	Extrapolação de cães para humanos
3	Extrapolação de macacos para humanos
2,5	Extrapolação de coelhos para humanos
5	Extrapolação de ratazanas para humanos
10	Extrapolação de outros animais para humanos
12	Extrapolação de ratos para humanos
F2 – Fator a ter em conta para a variabilidade entre indivíduos	
10	Extrapolação para variabilidade entre indivíduos
F3 – Fator a ter em conta para os estudos de toxicidade num curto tempo e exposição	
1	Estudos que durem pelo menos “meia vida” (1 ano para roedores ou coelhos e 7 anos para gatos, cães e macacos)
1	Estudos de reprodução que englobam o período embrionário (organogénese)
2	Estudos de 6 meses para roedores ou de 3 anos e meio para não roedores
5	Estudos de 3 meses para roedores ou estudos com de 2 anos para não roedores
10	Estudos de curta duração (menos de 4 semanas) para roedores ou menos de 1 ano para não roedores ou sem informação.
F4 – Fator que pode ser aplicado em casos de toxicidade severa como carcinogenicidade não genotóxica, neurotoxicidade e teratogenicidade	
1	Efeitos tóxicos leves: diarreia causada por antibiótico, <i>stress</i> , aumento peso em órgãos s/ patologia de tecidos correlacionada
5	Efeitos tóxicos não letais: inibição do ciclo celular, hipertrofia, elevada pressão arterial
10	Efeitos com potencial letal: doenças degenerativas e necrosadas de órgãos, tumores e órgão deixa de funcionar

Tabela 3.1. Fatores de Ajuste para o cálculo do PDE (Fonte: [62]). (Parte 2/2)

Ou em estudos de toxicidade reprodutiva	
1	Toxicidade fetal associada com toxicidade materna
1	Não foi encontrada toxicidade severa
5	Toxicidade fetal sem toxicidade materna
5	Efeito teratogénico com toxicidade materna
10	Efeito teratogénico sem toxicidade materna
F5 – Fator que pode ser usado caso NOAEL não esteja disponível	
1	NOAEL foi estabelecido
10	NOAEL não foi estabelecido

Adicionalmente, a vida de administração em estudo pode não corresponder à via de administração intencionada para a substância de interesse pelo que é necessário afetar o cálculo do PDE por um fator de correção da via de administração. Caso a conversão seja entre via oral e parenteral o FC via adm. a utilizar será definido segundo a Tabela 2.1. e, caso se pretenda uma conversão entre via parenteral e via tópica ou transdérmica será de acordo com a Equação 2.1.

Vários estudos podem fornecer informação diferente ou serem realizados de forma diferente pelo que podem ser determinados vários valores de PDE para a mesma substância. O valor que se assume será o mais pequeno de todos os calculados.

3.2 Instruções de Limpeza e Equipamentos a Validar

Na Tabela 3.2. apresentada em seguida encontram-se todos os equipamentos do setor FLP cuja validação de limpeza deve ser efetuada.

Tabela 3.2. Lista de Equipamentos do Setor FLP a Validar. (Parte 1/2)

Equipamentos do Setor FLP
Aagitador Duplo Cone
Aagitador em Hélice
Bomba de Trsfega de Líquidos SB1
Bomba de Trsfega de Líquidos SB2
Câmara de Pesagem
Homogeneizador 200 L Herba

Tabela 3.2. Lista de Equipamentos do Setor FLP a Validar. (Parte 2/2)

Equipamentos do Setor FLP
Homogeneizador 300 L Turbomek – Barral
Homogeneizador Melter – Barral
Homogeneizador Turbofix – Barral
Máquina de Enchimento de Bisnagas Axomatic – Barral
Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock – Barral
Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck
Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis
Máquina Doseadora Jolly – Barral
Reator 150 L
Reator 2000 L
Reservatórios 100 L
Reservatórios 150 L – Barral
Reservatórios 250 L
Reservatórios 350 L
Reservatórios 350 L – Barral

O objetivo é proceder à validação da limpeza de cada um dos equipamentos supramencionados. Desta forma, as instruções de limpeza, correspondentes à mudança de produto, a serem validadas encontram-se especificadas em seguida. Da Figura 3.2. à Figura 3.22. encontram-se as fotografias dos vários equipamentos.

- Agitador Duplo Cone e Agitador em Hélice

O equipamento foi transportado para a sala de lavagem onde é preparada uma solução de detergente diluindo detergente “Joel” em água quente. As peças do equipamento foram desmontadas e todo equipamento, incluindo as peças, foram passados com a solução detergente preparada e um pano adequado.

O equipamento e as peças foram passados por água quente por forma a retirar o excesso de detergente e em seguida passados com água purificada.



Figura 3.2. Agitador Duplo Cone



Figura 3.3. Agitador em Hélice

- Bombas de Trasfega de Líquidos

Num recipiente adequado, foi preparada a solução detergente diluindo detergente “Joel” em cerca de 100 L de água quente fazendo passar esta solução pela bomba de trasfega e respectivas mangueiras. Em seguida, 100 L de água quente foram passados pela bomba e respectivas mangueiras até ao desaparecimento total da espuma do detergente.

Num recipiente adequado, foi preparada uma solução com água potável e lixívia (Hipoclorito de Sódio 0,4%). 50 L desta solução foram passados pela bomba e respectivas mangueiras e rejeitados. 100 L da solução ficam a recircular pela bomba e mangueiras durante 20 minutos.

Após o tempo decorrido foram transferidos 50 L de água purificada pela bomba e mangueiras e, em seguida, desmontadas as mangueiras de trasfega. Após secagem, deve ser colocado um saco de polietileno nas extremidades das mangueiras.

- Câmara de Pesagem

A câmara de pesagem foi primeiramente aspirada.

Num recipiente adequado, foi preparada a solução detergente diluindo detergente “Joel” em água quente.

O teto da câmara de pesagem e a sala foram passado com um pano adequado, embebido na solução detergente e um utensílio próprio e extensível. Em seguida, o teto da sala foi passado com água quente.

Um pano embebido na solução detergente foi passado nas paredes e lamelas da câmara de pesagem e sala. Outro pano igualmente embebido na solução detergente foi passado nas mesas de apoio. Em seguida, todas as superfícies descritas foram passadas por água.

A balança foi limpa com um pano adequado embebido em água quente.

O chão foi lavado com a solução detergente com o auxílio de um utensílio próprio para o efeito.

Caso seja necessário, para remoção de resíduos de maior aderência, preparar na sala de lavagem uma solução de detergente e lixívia diluindo detergente “Joel” e lixívia em água quente.

O chão foi passado com água quente e, finalmente, todas as superfícies passadas com água purificada e secas com um pano seco.



Figura 3.4. Bomba de Trasfega



Figura 3.5. Câmara de Pesagem

- Homogeneizador 200 L Herba e Homogeneizador 300 L Turbomek

Foi transferida água quente para o homogeneizador, diluindo de seguida detergente “Joel” e o homogeneizador foi colocado em funcionamento durante cerca de 30 minutos.

Em seguida procedeu-se à lavagem do homogeneizador com o auxílio de um pano adequado.

Retirou-se a solução de lavagem pela torneira de escoamento e, pela abertura do depósito, foi passada água purificada para retirar todo o detergente.

Fechou-se a torneira de escoamento do homogeneizador e introduziu-se cerca de 50 L de água purificada e o equipamento foi colocado em funcionamento durante 15 minutos retirando de seguida a água pela torneira de escoamento.

Com o depósito do homogeneizador aberto removeu-se toda a água possível com um pano adequado. Num recipiente adequado preparou-se uma solução detergente, diluindo detergente “Joel” em de água quente utilizada para lavar a estrutura do homogeneizador. Por forma a eliminar todo o detergente, a estrutura foi passada por água quente e de seguida por água purificada.



Figura 3.6. Homogeneizador 200 L Herba



Figura 3.7. Homogeneizador 300 L Turbomek

- Homogeneizador Melter e Turbofix

Retirou-se o excesso de produto utilizando a pressão da mangueira de água potável e o interior do homogeneizador foi esfregado com a ajuda de um cabo extensível e uma esponja com detergente.

Utilizou-se água potável para remover a espuma e resíduos de creme.

Em seguida, encheu-se o reservatório com água potável até que esta cobrisse na totalidade as pás no seu interior e adicionou-se 2 L de detergente “Joel”. A temperatura foi programada para 70°C e o misturador para 15 rpm. Quando aplicável, a turbina foi ligada.

Após atingir os 70°C, a água ficou em agitação durante 30 minutos. Em seguida a água foi despejada e todo o interior do reservatório foi passado com água purificada e o exterior passado com água purificada e álcool etílico a 96%.



Figura 3.8. Homogeneizador Melter



Figura 3.9. Homogeneizador Tubofix

- Máquina de Enchimento Axomatic, Axoblock, Comadis e Jolly

Todos os componentes da máquina foram desmontados e as peças transportadas para a zona de lavagem.

Preparou-se a solução detergente diluindo detergente “Joel” em água quente.

Lavou-se o resto da máquina com a solução de detergente e um pano adequado.

As partes da máquina lavadas com a solução de detergente foram passadas por água quente de forma a eliminar todo o detergente e em seguida passadas por água purificada.

Na zona de lavagem preparou-se, num recipiente adequado, uma solução de detergente, diluindo detergente “Joel” em água quente e todas as peças da máquina foram lavadas com a solução de detergente e um pano adequado;

Todas as peças foram enxaguadas com água quente de forma a eliminar todo o detergente e em seguida passadas por água purificada e por álcool etílico a 96%.

Por fim, as peças foram secas com um pano seco adequado e guardadas num recipiente adequado junto à máquina.



Figura 3.10. Máquina de Enchimento Axomatic



Figura 3.11. Máquina de Enchimento Axoblock



Figura 3.12. Máquina de Enchimento Comadis



Figura 3.13. Máquina de Enchimento Jolly

- Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini

Foi preparada uma solução de detergente diluindo detergente “Joel” em água quente.

Passou-se a referida solução por todo o circuito de enchimento com a máquina em funcionamento.

Preparou-se, num recipiente adequado, uma solução com água potável e lixívia (hipoclorito de sódio a 0,4%).

Passou-se 30 L da solução com água e lixívia por todo o circuito de enchimento da máquina com a máquina em funcionamento durante 20 min com velocidade de 15 m/s.

Desmontou-se os tubos de borracha, as seringas doseadoras (êmbolos e vedantes), válvulas e agulhas de enchimento. Sempre que ocorra mudança de formato, desmontar também o prato e as guias e transportar todas as peças para a zona de lavagem onde devem ser passadas por água purificada e por álcool etílico 96%.

Na zona de lavagem preparou-se, num recipiente adequado, uma solução de detergente, diluindo detergente “Joel” em água potável quente para lavar todas as peças da máquina com a solução de detergente e um pano adequado e enxaguou-se todas as peças com água quente para eliminar vestígios de detergente.

Colocar as peças da máquina num recipiente com a solução de água e lixívia (hipoclorito de sódio) a 0,4% preparada anteriormente.

Todas as peças foram passadas com água purificada e por álcool etílico 96% e deixadas a secar.

As peças foram guardadas num saco adequado, junto à máquina.

- Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck

Foi preparada uma solução de detergente diluindo detergente “Joel” em água quente.

Passou-se a referida solução por todo o circuito de enchimento com a máquina em funcionamento.

Desmontou-se os componentes do equipamento e transportá-los para a zona de lavagem.

Preparou-se outra solução detergente com as mesmas especificações para passar no exterior da máquina e em seguida passou-se por água quente de forma a eliminar o detergente.

Na zona de lavagem preparou-se outra solução de detergente diluindo novamente detergente “Joel” em água quente potável para lavar todas as peças desmontadas da máquina com o auxílio de um pano adequado e montaram-se as peças no equipamento.

Preparou-se, num recipiente adequado, uma solução com água potável e lixívia (hipoclorito de sódio a 0,4%). Passou-se a solução com o equipamento em funcionamento durante 20 min.

Passou-se todo o circuito com água purificada e desmontaram-se as peças para que sejam passadas com álcool etílico a 96%.

Deixou-se as peças a secar e em seguida foram guardadas num saco adequado, junto à máquina.



Figura 3.14. Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini Figura 3.15. Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck

- Reator 150 L, Reservatório de 100 L, Reservatório de 150 L

Primeiramente passou-se o equipamento com água quente;

Transferiu-se água quente para o equipamento, diluindo de seguida cerca detergente “Joel” e procedeu-se à lavagem com o auxílio de um pano adequado.

Passou-se o equipamento por água quente de forma a eliminar todo o detergente e em seguida por água purificada.

O equipamento foi seco com um pano adequado e, depois de seco, foi acondicionado num saco de polietileno.



Figura 3.16. Reator 150 L



Figura 3.17. Reservatório 100 L



Figura 3.18. Reservatório 150 L – Barral

- Reator 2 000 L

Introduziu-se a mangueira de lavagem na boca do reator e fez-se passar água quente mantendo a torneira de saída do reator aberta.

Foi preparada uma solução de detergente diluindo detergente “Joel” em água quente.

Fechou-se a torneira do reator e transferiu-se a solução de detergente para o reator com a bomba de trasfega ligando o agitador durante 5 minutos e procedendo à lavagem com o auxílio de um pano e de um cabo extensível.

Transferiu-se para um recipiente adequado cerca de 100 L de água quente e o reator foi passado com a água quente até ao desaparecimento total da espuma do detergente, utilizado a bomba de trasfega e mantendo a torneira de saída do reator aberta.

Preparou-se uma solução de água com lixívia (hipoclorito de sódio a 0,4%). Introduziu-se a solução, com o auxílio da bomba, para dentro do reator e deixou-se a agitar durante 20 minutos.

Após a agitação passou-se com água purificada para remover todos os vestígios de lixívia visíveis utilizando a bomba de alta pressão e mantendo a torneira de saída do reator aberta.

Desmontou-se a torneira e o tubo de saída do reator e as peças foram transportadas para a zona de lavagem.

Preparou-se, num recipiente adequado, uma solução de detergente, diluindo detergente “Joel” em água quente para lavar as peças com um escovilhão previamente desinfetado com uma solução preparada com água e lixívia.

As peças foram enxaguadas com água quente de forma a eliminar todo o detergente e em seguida foram passadas por água purificada e álcool etílico a 96%.

Secou-se as peças (torneira e tubo) e procedeu-se à sua montagem no reator.



Figura 3.19. Reator 2 000 L

- Reservatório de 250 L, Reservatório de 350 L

O reservatório foi passado com água quente mantendo a torneira de saída do reservatório aberta.

Com a torneira fechada transferiu-se água quente para o reservatório, diluindo detergente “Joel” e procedeu-se à lavagem do mesmo com o auxílio de um pano adequado e de um cabo extensível.

O reservatório foi passado por água quente de forma a eliminar todo o detergente mantendo a torneira de saída do reservatório aberta e, seguindo o mesmo procedimento, repetiu-se com água purificada.

Passou-se o reservatório com água purificada utilizando bomba de alta pressão mantendo a torneira de saída do reservatório aberta.

Desmontou-se a torneira de saída do reservatório e as peças foram transportadas para a zona de lavagem onde, num recipiente adequado se preparou uma solução de detergente, diluindo detergente “Joel” em água quente de modo a lavar as peças com o auxílio de um pano adequado.

Enxaguou-se as peças com água quente de forma a eliminar todo o detergente e em seguida foram passadas por água purificada e álcool etílico a 96%.

Procedeu-se à secagem das peças com um pano seco adequado e à montagem da torneira no reservatório.



Figura 3.20. Reservatório 250 L



Figura 3.21. Reservatório 350 L



Figura 3.22. Reservatório 350 L – Barral

3.3 Cálculos Auxiliares ao Limite Analítico

Para proceder ao cálculo do limite analítico ou limite de aceitação da concentração de produto A que poderá estar presente num produto B fabricado consequentemente recorrem-se a algumas fórmulas descritas em seguida.

- Determinação da Superfície de Contacto do Equipamento com o Produto (SCEP)

Primeiramente calcula-se a área superficial do equipamento em estudo comum à produção do produto A e B.

- Determinação do Limite Resíduo Aceitável (LRA)

$$LRA = \frac{PDE}{MDd} \quad \text{Equação 3.1}$$

LRA: Limite de Resíduo Aceitável (ppm ou µg/g)

PDE: Limite de Exposição Diário Permitido da Substância Ativa do Produto A (mg/dia)

MDd: Dose Diária Máxima do Pior-Caso Produto B (mg/dia)

- Determinação do Limite Residual de Superfície (LRS)

$$LRS = \frac{LRA \times DL}{SCEP} \quad \text{Equação 3.2}$$

LRS: Limite Residual de Superfície (µg/cm²)

LRA: Limite de Resíduo Aceitável (ppm) ou (µg/g)

DL: Dimensão de Lote do Pior-Caso Produto B (g)

SCEP: Superfície de Contacto do Equipamento com o Produto (cm²)

- Determinação da Área de Superfície Lavada (ASL)

A área de superfície lavada corresponde à área que entra em contacto com a água transferida para o equipamento para efeitos de amostragem.

3.4 Testes Para Validação de Limpeza

3.4.1 Inspeção Visual

A inspeção visual deverá ser o primeiro teste a ser efetuado, uma vez que, se não for considerado conforme, o equipamento é considerado como não limpo e impede a continuidade do processo de validação pelo que os restantes testes não serão efetuados até nova higienização.

Materiais

- Caso necessário pode ser utilizada uma lanterna

Execução do Teste

Este teste deve assegurar que, visualmente, o aspeto do equipamento se encontra segundo os seguintes parâmetros:

- Componentes desmontados, lavados e secos;
- Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;

- Ausência de manchas;
- Ausência de odores;
- Área de trabalho limpa e arrumada;
- Ausência de escoriações mecânicas;
- Ausência de fibras, borracha ou tecidos;
- Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.

Critério de Aceitação

Se todos os parâmetros se encontrarem conformes então o teste encontra-se conforme. A não conformidade de um dos aspetos anteriores resulta da não conformidade da inspeção visual.

3.4.2 Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos

Este teste tem o objetivo de verificar que após a limpeza do equipamento este não possui vestígios de compostos orgânicos quer sejam estes provenientes de componentes dos produtos ou agentes de limpeza que ponham em causa a qualidade e integridade do próximo produto produzido. A análise destes resíduos é efetuada por passagem de solvente, neste caso água purificada, e a análise das amostras é efetuada por TOC. Normalmente este teste deverá ser realizado em segundo lugar e antes do teste de Microbiologia.

Materiais

- 3 frascos para análise de TOC
- Máscara e luvas
- Recipiente de recolha
- Equipamento de TOC

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra: Branco, A e B;
2. Use máscara e luvas para realização do procedimento, usando sempre água corrente e nunca mergulhando os frascos das amostras nos recipientes de recolha;
3. Encha o frasco destinado ao Branco duas vezes com água purificada (baixo teor de TOC), descartando as águas. Recolha a 3ª água e rolhe o frasco;
4. Passar 5 L de água purificada de baixo teor de TOC pelas partes do equipamento a amostrar;

5. Encha o frasco, destinado às Amostras A e B, 2 vezes consecutivas, recolhendo, com cuidado, a água que se encontra em contacto com o equipamento, descartando as águas de seguida. Recolha a 3ª água e rolhe os frascos;
6. As amostras serão analisadas no equipamento de TOC no Controlo da Qualidade.

Critério de Aceitação

$$T \leq LA$$

T: Diferença entre o valor de TOC da amostra e do branco (ppm)

- Limite Analítico (LA)

Este limite é dado por:

$$LA = LRS \times ASL \times \frac{FR}{VL} \times FTOC \quad \text{Equação 3.3}$$

LA: Limite Analítico (ppm ou µg/mL)

LRS: Limite de Residual de Superfície (µg/cm²)

ASL: Área de Superfície Lavada (cm²)

FR: Fator de Recuperação

VL: Volume de Água Utilizada (mL)

FTOC: % de carbono no detergente utilizado

3.4.3 Análise de Resíduos de Substâncias Iónicas

A medição da condutividade é um procedimento muito sensível para a medição de concentrações iónicas. A condutividade de uma solução eletrolítica a qualquer temperatura depende apenas dos iões nela presentes e das suas respetivas concentrações. Deste modo, mesmo a menor quantidade de iões presentes aumentará o valor da condutividade.

A pureza da água purificada é comumente verificada por medições da sua condutividade, sendo o valor de referência 4,3 µS/cm a 20°C. [35] Assim, este valor será utilizado como limite analítico para o critério de aceitação.

Em suma, este método pode ser empregue para avaliar a contaminação da água purificada de enxaguamento (água que é passada pelo equipamento depois deste estar devidamente limpo) por substâncias iónicas provenientes dos produtos (excipientes), detergentes, solventes, etc.

Normalmente este teste deverá ser realizado antes do teste de Microbiologia.

Materiais

- 3 frascos de 250 mL para análise de Condutividade
- Máscara e luvas
- Recipiente de recolha
- Condutivímetro

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra: Branco, A e B;
2. Use máscara e luvas para realização do procedimento, usando sempre água corrente e nunca mergulhando os frascos das amostras nos recipientes de recolha;
3. Encha o frasco destinado ao Branco duas vezes com água purificada, descartando as águas. Recolha a 3ª água e rolhe o frasco;
4. Passar 5 L de água purificada pelas partes do equipamento a amostrar;
5. Encha o frasco, destinado às Amostras A e B, 2 vezes consecutivas vertendo, com cuidado, a água que se encontra em contacto com o equipamento, descartando as águas de seguida. Recolha a 3ª água e rolhe os frascos;
6. As amostras serão analisadas no Condutivímetro no Controlo da Qualidade.

Execução da Análise

1. Ligar o equipamento no botão;
2. Limpar a célula com água purificada e secá-la;
3. Colocar a célula de condutividade na solução a monitorizar;
4. Carregar no botão de leitura;
5. Aguardar que o equipamento estabilize e fixe o resultado;
6. Lavar a célula com água purificada;
7. Caso não proceda a uma leitura de seguida, deixar a célula mergulhada em água.

Critério de Aceitação

$$T \leq LA$$

T: Diferença entre o valor de valor de condutividade da amostra e do branco (µS/cm)

- Limite Analítico (LA)

O limite analítico (LA) é 4,3 µS/cm.

3.4.4 Análise de Resíduos de Substância Ativa em HPLC

O âmbito desta análise é verificar que, após a limpeza do equipamento, este não contém resíduos de substância ativa capazes de pôr em causa a qualidade do produto produzido a seguir. A amostragem é efetuada por zaragatoas ou passagem de solvente e a análise feita em HPLC. Se utilizando amostragem com zaragatoa, este teste deverá ser realizado antes da análise Microbiológica, caso contrário, se envolver a passagem de solvente, deverá ser realizado em último lugar.

3.4.4.1 Amostragem com Zaragatoas

Materiais

- Frascos de vidro escuro de 150 mL com tampa de rosca
- “Large Alpha Swabs” – Tx7144A_Texwipe
- Micropipeta de 100 µL a 1000 µL e respetivas pontas descartáveis
- Máscara e luvas
- Balança analítica
- Banho de ultra-sons
- Cromatógrafo de HPLC com detetor de UV
- Janela de silicone de 100 cm²

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra;
2. Adicione com a micropipeta 0,4 mL de solvente a um swab (0,2 mL em cada face);
3. Numa área do equipamento correspondente a 100 cm² (10x10 cm), esfregue horizontalmente, com uma das faces do swab, efetuando cerca de 10 movimentos em ziguezague (vide Figura 3.23.). O swab deve ser pressionado firmemente de encontro à superfície por forma a assegurar-se o contacto contínuo;
4. Na mesma área, esfregue verticalmente, com a outra face do swab, efetuando cerca de 10 movimentos em ziguezague (Figura 3.23.). O swab deve ser pressionado firmemente de encontro à superfície por forma a assegurar-se o contacto contínuo;
5. Coloque o swab num frasco de amostra;
6. Repita os pontos 1. a 5. para cada ponto crítico de amostragem;

7. As amostras, depois de preparadas, serão analisadas no equipamento HPLC no Controlo da Qualidade, com o método adequado e validado.

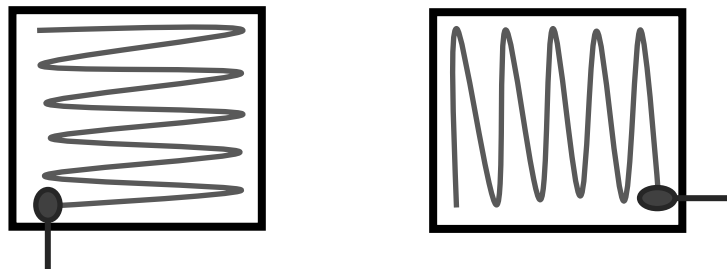


Figura 3.23. Amostragem com Zaragatoas

CrITÉrio de Aceitação

$$T \leq LA$$

Onde:

$$T = \frac{Tp \times P \times Aa}{Vp \times Ap} \times 1000 \quad \text{Equação 3.4}$$

T: Teor de Substância Ativa (µg/mL)

Tp: Toma de ensaio do padrão expresso (mg)

P: Atividade do padrão expressa em Substância Ativa (em proporção de 1 para 100)

Aa: Área do pico correspondente à Substância Ativa na solução amostra

Ap: Área do pico correspondente à Substância Ativa na solução padrão

Vp: Volume de diluição do padrão em mL

- Limite Analítico (LA)

É expresso em:

$$LA = LRS \times ASA \times \frac{FR}{VL} \quad \text{Equação 3.5}$$

LA: Limite Analítico (ppm ou µg/mL)

LRS: Limite de Residual de Superfície (µg/cm²)

ASA: Área de Superfície Amostrada (100 cm²)

FR: Fator de Recuperação do aço inox calculado durante a validação do método analítico

VL: Volume de Solvente Usado na Preparação da Amostra (mL)

3.4.4.2 Amostragem com Passagem de Solvente

Materiais

- 3 frascos de vidro escuro de 150 mL com tampa de rosca

- Reagente
- Recipiente de recolha
- Máscara e luvas
- Balança analítica
- Banho de ultra-sons
- Cromatógrafo de HPLC com detetor de UV

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra: Branco, A e B;
2. Use máscara e luvas para realização do procedimento, usando sempre água corrente e nunca mergulhando os frascos das amostras nos recipientes de recolha;
3. Coloque o equipamento a funcionar com 1 L de reagente;
4. Recolha os primeiros e os segundos 150 mL bombeados, correspondendo às amostras A e B, respetivamente;
5. Encha o frasco com o solvente utilizado na lavagem, rolhando-o e identificando-o;
6. O branco corresponde ao reagente não utilizado;
7. Recolha o restante reagente e de seguida lave a zona amostrada do equipamento com abundante água Purificada;
8. Analise as amostras em menos de 24h no equipamento HPLC no Controlo de Qualidade, com o método adequado e validado.

Critério de Aceitação

$$T \leq LA$$

Onde T corresponde ao já descrito na Equação 3.4.

- Limite Analítico (LA)

É expresso em:

$$LA = LRS \times ASL \times \frac{FR}{VL} \quad \text{Equação 3.6}$$

LA : Limite Analítico (ppm ou $\mu\text{g/mL}$)

LRS : Limite de Residual de Superfície ($\mu\text{g/cm}^2$)

ASL : Área de Superfície Lavada (cm^2)

FR : Fator de Recuperação do aço inox calculado durante a validação do método analítico

VL : Volume de Solvente Usado na Preparação da Amostra (mL)

3.4.5 Determinação da Atividade Microbiana

Este teste tem como objetivo a contagem total dos agentes microbiológicos no local de amostragem, por forma a verificar que estes se encontram dentro do critério de aceitação. A execução da amostragem e do teste varia de acordo com o método de amostragem escolhido.

3.4.5.1 Amostragem com Placas de Contacto

Materiais

- Placas de contacto de área de 25 cm², contendo meio de cultura TSA, esterilizadas e individualizadas
- Pano estéril
- Álcool etílico a 70%
- Máscara e luvas
- Estufa de incubação

Execução da Amostragem

1. Identifique as placas de contacto;
2. Use máscara e luvas para realização da amostragem com placas de contacto (PC):
 - Abra a embalagem da placa de contacto, colocando o meio de cultura em contacto com a área do equipamento a amostrar;
 - Pressione cerca de 10 segundos contra o equipamento, fechando a placa logo de seguida;
 - Limpe o local de recolha da amostra com um pano estéril, embebido com álcool etílico a 70%.

Execução do Teste

1. A placa é colocada na estufa de 20°C-25°C a incubar durante 7 dias;
2. Após o tempo decorrido, a placa é colocada na estufa de 30°C-35°C a incubar durante 7 dias;
3. Ao fim dos 14 dias, contam-se as UFC's por placa;
4. Registar os resultados.

Critério de Aceitação

O resultado da contagem por placa de contacto deve ser ≤ 50 UFC.

3.4.5.2 Amostragem com Zaragatoas

Método de amostragem utilizado quando a geometria do equipamento não permite a amostragem com placas de contacto.

Materiais

- Tubos previamente preparados contendo 5 mL de tampão fosfato pH 7,0 estéril e zaragatoas estéreis para os locais de amostragem + 1 tubo com 1 zaragatoa para branco
- Pano estéril
- Álcool etílico a 70%
- Máscara e luvas
- Estufa de incubação

Execução da Amostragem

1. Identifique os tubos com zaragatoas;
2. Use máscara e luvas para realização da amostragem com zaragatoa (Z):
 - Retirar a zaragatoa microbiológica do tubo contendo tampão fosfato a pH 7,0 e esfregar uma área de 25 cm² (cerca de 5cm x 5cm);
 - Colocar a zaragatoa no tubo e fechá-lo;
 - Agitar o tubo suavemente;
 - Após terem sido feitas as amostragens, limpa-se o local de recolha da amostra com um pano limpo, embebido com álcool etílico a 70%.

Execução do Teste

1. Colocar na estufa durante cerca de 30 minutos a 35-37°C. Agitar no vortex pelo menos 2 minutos;
2. Na câmara de fluxo laminar:
 - Filtrar 5 mL da amostra, lavando-se em seguida o filtro com cerca de 2x100mL de DFA;
 - Colocar o filtro sobre uma placa contendo 15 mL de TSA;
 - Incubar entre 20-55°C durante 5-7 dias;
 - Após este período, a placa é colocada a incubar na estufa de 30-35°C durante 5-7 dias;
 - Ao fim de 10-14 dias, contam-se as UFC's por placa;
 - Devem preparar-se os seguintes brancos para análise: Tampão pH 7,0, DFA e TSA;
 - Registar os resultados obtidos.

Critério de Aceitação

O resultado da contagem deve ser ≤ 50 UFC.

3.4.5.3 Amostragem por Passagem com Água Desmineralizada Estéril

Método de amostragem utilizado quando a geometria do equipamento não permite a amostragem com placas de contacto ou zaragatoas. Por ser necessário passar o equipamento com água desmineralizada estéril, este teste deverá ser realizado antes da passagem de água purificada para TOC ou solvente para HPLC.

Materiais

- 2 Frascos de 250 mL previamente esterilizados para recolha de amostras
- 1 L de água desmineralizada estéril
- Álcool etílico a 70%
- Máscara e luvas
- Estufa de incubação

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos: Branco, A;
2. Use máscara e luvas para realização da amostragem com frascos de recolha:
 - Encha o frasco destinada à amostra do Branco com água desmineralizada estéril utilizada para amostragem do equipamento;
 - Coloque o equipamento a funcionar com 1 L de água desmineralizada estéril;
 - Recolha os primeiros 250 mL, correspondendo à amostra A.

Execução do Teste

1. Na câmara de ar laminar filtrar 20 mL da amostra;
2. Lavar o filtro com cerca de 2x100 mL de DFA;
3. Colocar o filtro sobre uma placa contendo 15 mL de R2A;
4. Repetir o procedimento 1 e 2 e colocar o filtro em TSA;
5. Repetindo o procedimento anterior, fazer um Branco com DFA;
6. Incubar a 30-35°C durante 5 dias;
7. Registrar os resultados.

Critério de Aceitação

O resultado da contagem deve ser ≤ 100 UFC.

3.5 Validação do Método Analítico TOC para a Detecção de Cloridrato de Oximetazolina

Equipamento Pior-Caso

Após revisão do Plano Mestre de Validação e respectivos produtos “piores-caso A”, concluiu-se que o produto pior-caso A dos equipamentos listados na Tabela 3.3. é o Rinerge, cuja SA é o Cloridrato de Oximetazolina, com um PDE de 0,05 mg/dia.

Tabela 3.3. Lista de Equipamentos onde a SA Cloridrato de Oximetazolina é o Produto Pior-Caso A.

Equipamento
Câmara de Pesagem
Agitador de Hélice
Bomba de Tráfego de Líquidos
Reservatório 250 L
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck

Primeiramente foi apurado o equipamento pior-caso, ou seja, qual o equipamento que origina um limite analítico menor dos listados acima.

O cálculo do limite analítico de cada equipamento segue as Equações 3.1, 3.2 e 3.5.

Materiais

Tabela 3.4. Materiais Utilizados na Validação do Método Analítico por TOC

Equipamentos Utilizados	
Balança	Mettler Toledo XPR105 N°402SW13
Banho de Ultra-sons	Bandelin Sonorex
TOC	TOC Sievers M9
Reagentes e Outros Materiais Utilizados	
Água Purificada	Água Ultrapura Elga Chorus
Detergente	“Joel” – Líquido Especial da Jodel
Oximetazolina Padrão	Cloridrato de Oximetazolina Lote: 0849R
Placas	Aço Inoxidável 304, polido, 10 cm x 10 cm
Rinerge	Rinerge Spray Nasal 0,05%
Zaragatoas	“Low TOC CleanTips Swabs”- Tx714K_Texwipe

Amostragem

Foram selecionadas duas metodologias de amostragem, com zaragatoa e com passagem de solvente, usadas para os passos de Seletividade, Repetibilidade do método, Exatidão e Estabilidade do Analito nas soluções analíticas e Estabilidade do Analito no equipamento.

a) Método de Amostragem com Zaragatoa (“Swab”)

Adicionou-se 0,4 mL de água purificada a um swab (“CleanTips Swabs”- Tx714K_Texwipe de baixo teor de TOC) (cerca de 0,2 mL em cada face). Numa placa de aço-inox correspondente a 100 cm² (10 cm x 10 cm), esfregou-se horizontalmente e verticalmente, com uma das faces do swab, efetuando cerca de 10 movimentos em ziguezague (tal como demonstrado na Figura 3.23,). O swab foi pressionado firmemente de encontro à superfície de forma a assegurar-se o contacto contínuo.

Para o frasco de análise de TOC de 40 mL cheio com água purificada parte-se o swab e fecha-se o frasco.

Colocou-se o frasco contendo o swab 45 minutos no ultrassons e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente antes de colocar no equipamento a analisar.

No equipamento TOC foi selecionado o modo Auto Reagent.

b) Método de Amostragem com Passagem de Solvente

Numa placa de aço-inox correspondente a 100 cm² (10 cm x 10 cm), verteu-se 40 mL de água purificada, de forma continua de modo que toda a superfície da placa entre em contacto com a água, para um frasco de análise TOC de 40 mL através de um funil.

No equipamento TOC foi selecionado o modo Auto Reagent.

Preparação das Soluções Utilizadas no Processo de Validação

Preparação da solução mãe: Pesou-se cerca de 20 mg de padrão de Oximetazolina para balão volumétrico de 200 mL e adicionou-se cerca de 200 mL de água Purificada para completar o volume, para obter uma concentração de 100 µg/mL.

Preparação da solução ao Limite analítico 40% (LA 40%): Transferiu-se 8 mL da solução mãe para balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água Purificada. (Concentração ao limite analítico 40% (LA 40%) cerca de 4 µg/mL).

Preparação da solução ao Limite analítico 60% (LA 60%): Transferiu-se 6 mL da solução mãe para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água Purificada. (Concentração ao limite analítico 60% (LA 60%) cerca de 6 µg/mL).

Preparação da solução ao Limite analítico 80 % (LA 80%): Transferiu-se 8 mL da solução mãe para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água Purificada. (Concentração ao limite analítico 80% (LA 80%) cerca de 8 µg/mL).

Preparação da solução ao Limite analítico (LA): Transferiu-se 25 mL da solução mãe para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com água Purificada. (Concentração ao limite analítico (LA) cerca de 10 µg/mL).

Preparação da solução ao Limite analítico 120 % (LA 120 %): Transferiu-se 24 mL da solução mãe para balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água Purificada. (Concentração ao limite analítico 120% (LA 120 %) cerca de 12 µg/mL).

Preparação da solução inicial para contaminação: Pesou-se 40 mg de padrão de Oximetazolina para um balão volumétrico de 100 mL e adicionou-se cerca de 100 mL de água purificada para completar o volume, de modo que a concentração da solução seja 400 µg/mL.

Preparação da solução para contaminação de detergente de limpeza: Pesou-se 40 mg de solução detergente “Joel” para balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se água purificada aos poucos de modo a não proporcionar espuma e sem agitação, para que a concentração da solução seja 400 µg/mL. Retirou-se 1 mL para a placa de inox por forma a que a concentração no frasco TOC seja 10 ppm.

Preparação da solução concentrada para confirmação do Limite de Detecção e Quantificação Estimados: Pesou-se 10 mg de padrão de Cloridrato de Oximetazolina para balão volumétrico de 200 mL e adicionou-se cerca de 200 mL de água Purificada, para obter uma solução de concentração 50 µg/mL.

Preparação da solução de concentração igual a metade do Limite de Detecção Estimado: Mediu-se 2 mL da solução concentrada para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água purificada de modo a obter uma solução de concentração igual a metade do Limite de Detecção estimado (0,5 µg/mL).

Preparação da solução de concentração ao Limite de Detecção Estimado: Mediu-se 4 mL da solução concentrada para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água purificada de modo a obter uma solução de concentração igual ao Limite de Detecção estimado (1 µg/mL).

Preparação da solução de concentração ao Limite de Quantificação Estimado: Mediu-se 12 mL da solução concentrada para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com água purificada de modo a obter uma solução de concentração igual ao Limite de Quantificação estimado (3 µg/mL).

Preparação da solução para contaminação com Rinerge 0,05% Spray Nasal com Oximetazolina: Mediu-se 0,8 mL de Rinerge 0,05% Spray Nasal para espalhar pela superfície de uma placa para posteriormente ser amostrado, para que na placa se encontre uma concentração de 10 µg/mL.

Preparação de Placas de Recuperação

Para a preparação de placas de recuperação foi distribuída uma determinada quantidade de solução em pequenos pontos da mesma de modo a cobrir toda a placa como exemplificado na Figura 3.24..

A amostragem foi realizada após secagem.

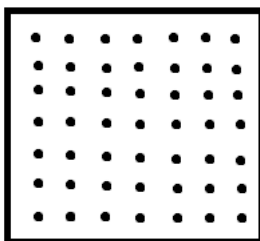


Figura 3.24. Distribuição de Soluções nas Placas de Recuperação.

A concentração a colocar nas placas para os diferentes níveis de concentração foi:

Placa 40%LA – 0,4 mL de solução para contaminação;

Placa 60%LA – 0,6 mL de solução para contaminação;

Placa 80%LA – 0,8 mL de solução para contaminação;

Placa 100%LA e placa “Joel” – 1 mL de solução para contaminação;

Placa 120%LA – 1,2 mL de solução para contaminação;

Parâmetros Avaliados na Validação do Método

De modo a proceder à validação do método analítico TOC para a detecção de Cloridrato de Oximetazolina foram avaliados diversos parâmetros.

Em cada análise efetuada no equipamento TOC foram analisados simultaneamente frascos contendo água purificada de baixo TOC (brancos). O valor do branco é retirado ao valor obtido nas restantes amostras de modo a eliminar a interferência do solvente nos resultados finais.

- Linearidade

Foram preparadas soluções padrão com concentrações correspondentes a cerca de 40% (LA 40%), 60% (LA 60%), 80% (LA 80%), 100% (LA) e 120% (LA 120%) da concentração do limite analítico, por diluição de uma solução-mãe. Estabeleceu-se a curva de calibração entre concentrações e o valor TOC. Determinou-se o declive e a ordenada na origem da reta obtida por regressão linear recorrendo à ferramenta excel, além do respetivo coeficiente de determinação e correlação que deverão ser maiores ou iguais a 0,97 e 0,995, respetivamente.

Tendo a equação da regressão linear que melhor se ajusta aos dados obtidos no laboratório foram determinados também os intervalos de confiança da do declive, da ordenada na origem e da média da resposta e as bandas de predição para valores individuais de Y.

Com o declive e a ordenada na origem obtidos do modelo de regressão e as concentrações utilizadas (x) é possível obter a média dos Y e o Y previsto pela regressão (adaptado de [63]):

$$\hat{\mu}_{Y|x_i} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x \quad \text{Equação 3.7}$$

$$\hat{Y}_i = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x \quad \text{Equação 3.8}$$

$\hat{\beta}_0$ e $\hat{\beta}_1$: Estimadores de mínimos quadrados

$\hat{\mu}_{Y|x_0}$: Estimador da resposta média de Y quando $x = x_0 (\mu_{Y|x_0})$

$\hat{Y}_i$: Estimador de Y_i ou valor previsto calculado segundo a equação do modelo de regressão

Assim, a estimativa do desvio padrão dos erros aleatórios (RSE) é dada por (adaptado de [63]):

$$RSE = \hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{Equação 3.9}$$

Pelo método dos mínimos quadrados a soma de quadrados para x é dada por (adaptado de [63]):

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Equação 3.10}$$

O intervalo de confiança para o declive é dado por (adaptado de [63]):

$$\left[\hat{\beta}_1 - t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{S_{xx}}}, \hat{\beta}_1 + t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{S_{xx}}} \right] \quad \text{Equação 3.11}$$

$t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)}$: Distribuição de *t-Student* com n-2 graus de liberdade para um grau de confiança de 100(1- α)%

$\hat{\sigma}^2$: Estimador da variância do erro, σ^2

n: Número de pontos

O intervalo de confiança para a ordenada na origem é dado por (adaptado de [63]):

$$\left[\hat{\beta}_0 - t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right)}, \hat{\beta}_0 + t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right)} \right] \quad \text{Equação 3. 12}$$

O intervalo de confiança para a média da resposta é (adaptado de [63]):

$$\left[\hat{\mu}_{Y|x_0} - t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)}, \hat{\mu}_{Y|x_0} + t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)} \right] \quad \text{Equação 3. 13}$$

O intervalo de predição para uma observação de Y é (adaptado de [63]):

$$\left[\hat{Y}_i - t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)}, \hat{Y}_i + t_{\frac{\alpha}{2}(n-2)} \times \sqrt{\hat{\sigma}^2 \left(1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \right)} \right] \quad \text{Equação 3. 14}$$

Paralelamente determinou-se também o fator-resposta associado a cada solução calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{Fator resposta} = \frac{\text{valor TOC}}{\text{Concentração Alvo}} \quad \text{Equação 3. 15}$$

O coeficiente de variação é obtido tendo o desvio padrão e a média do fator resposta (adaptado de [58]):

$$CV(\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 3. 16}$$

DP: Desvio padrão

$\bar{x}$: Média

E o desvio fator-resposta em relação à concentração alvo foi também determinado da seguinte maneira:

$$\text{Desvio}(\%) = \left| \frac{\text{Fator resposta}_i - \text{Fator resposta}_{LA}}{\text{Fator resposta}_{LA}} \right| \times 100 \quad \text{Equação 3. 17}$$

- Limite de Quantificação e Limite de Detecção

De modo a verificar os limites estimados através da linearidade, foram preparadas três soluções: uma a metade do limite de detecção, uma à concentração do limite de detecção e outra à concentração do limite de quantificação. Para cada uma destas soluções foram efetuadas 3 medições de TOC.

- Seletividade

Pretendeu-se verificar a capacidade do método para detetar o Cloridrato de Oximetazolina na presença de possíveis interferentes existentes na amostra.

Foram executadas análises, nos seguintes tipos de amostras:

- 1) Solvente utilizado na preparação das amostras e nos swabs (água Purificada);
- 2) “Branco de swab” - Um swab foi colocado num frasco contendo 40 mL de água Purificada;
- 3) “Branco de recuperação da placa com swab” – Uma placa, limpa com água Purificada e após sua secagem, foi amostrada conforme descrito no ponto **a)** da recolha das amostras;
- 4) “Branco de recuperação da placa com solvente” – Uma placa, limpa com água Purificada e após sua secagem, foi amostrada conforme descrito no ponto **b)** da recolha das amostras;
- 5) Substância ativa, preparada de acordo com o descrito para as soluções padrão LA 40%, LA 60%, LA 100% e LA 120%;
- 6) Detergente “Joel”;
- 7) “Branco de recuperação da placa de detergente com swab” – Duas placas em que se adicionou detergente “Joel” em cada uma delas. Após a secagem, foram amostradas conforme descrito no ponto **a)** da recolha das amostras;
- 8) “Branco de recuperação da placa de detergente com solvente” – Duas placas em que se adicionou detergente “Joel” em cada uma delas. Após a secagem, foram amostradas conforme descrito no ponto **b)** da recolha das amostras;
- 9) Amostra de recuperação da placa com swab – contaminou-se duas placas com solução de Oximetazolina para a contaminação das placas. Após sua secagem, foi amostrada conforme descrito no ponto **a)** da recolha das amostras – Amostra ao LA;
- 10) Amostra de recuperação da placa com solvente – contaminou-se duas placas com solução de Oximetazolina para a contaminação das placas. Após sua secagem, foi amostrada conforme descrito no ponto **b)** da recolha das amostras – Amostra ao LA;
- 11) Amostra de recuperação de placa e detergente com swab – A duas placas adicionou-se detergente “Joel” e Oximetazolina (solução padrão LA). Após a secagem, foram amostradas conforme descrito no ponto **a)** da recolha das amostras;

- 12) Amostra de recuperação de placa e detergente com solvente – A duas placas adicionou-se detergente “Joel” e Oximetazolina (solução padrão LA). Após a secagem, foram amostradas conforme descrito no ponto **b)** da recolha das amostras;
- 13) Amostra de recuperação de Rinerge Spray 0,05% com swab – contaminou-se duas placas com Spray Rinerge com Oximetazolina a 0,05% para a contaminação das placas. Foram amostradas conforme descrito no ponto **a)** da recolha das amostras;
- 14) Amostra de recuperação de Rinerge Spray 0,05% com solvente – contaminou-se duas placas com Spray Rinerge com Oximetazolina a 0,05% para a contaminação das placas. Foram amostradas conforme descrito no ponto **b)** da recolha das amostras;

Para os valores apresentados nos ensaios 5 e 6 foi subtraído o valor obtido o valor de TOC da água purificada. Já para os valores referentes aos ensaios 7 a 14 foram obtidos através da diferença entre o resultado proveniente do equipamento TOC e os brancos 3 e 4 dependendo do método de amostragem utilizado.

Os valores de TOC esperados foram calculados através do número de carbonos presentes nas substâncias de interesse em cada amostra. Neste estudo a substância ativa em estudo é o Cloridrato de Oximetazolina presente no Spray Rinerge. Outro componente presente neste produto que poderá interferir com a medição de TOC devido ao seu elevado número de carbonos é o Cloreto de Benzalcónio. Adicionalmente, o equipamento foi lavado com detergente “Joel” pelo que é necessário ter em conta a sua interferência na medição.

Na Figura 3.25. encontra-se a estrutura química do Cloridrato de Oximetazolina, componente principal do Spray Rinerge, cuja fórmula molecular é $C_{16}H_{25}ClN_2O$ [64].

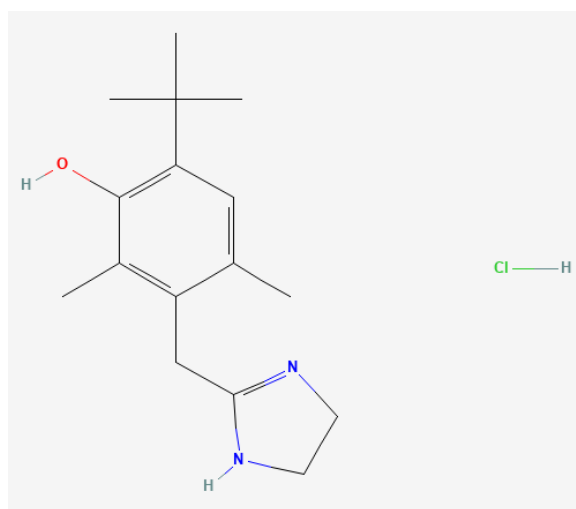


Figura 3.25. Estrutura Química da Molécula de Cloridrato de Oximetazolina (Fonte [64]).

O Cloridrato de Oximetazolina tem uma massa molecular de 296,83 g/mol. Como possui 16 carbonos, a massa molar em carbonos é de 192,16 g/mol. Assim, a percentagem de carbonos presentes na molécula é dada pela seguinte equação:

$$\%FTOC = \frac{M(C_{16}H_{25}ClN_2O)}{16 \times M(C)} \times 100 \quad \text{Equação 3.18}$$

Assim, como o TOC apenas fornecerá informação sobre o número de carbonos presentes na amostra, a concentração esperada de obter para cada concentração de Cloreto de Oximetazolina analisada será:

$$TOC \text{ esperado} = \frac{C \times \%FTOC}{100} \quad \text{Equação 3.19}$$

O Cloreto de Benzalcónio, de fórmula molecular $C_{21}H_{38}ClN$, possui uma massa molecular de 339,97 g/mol dos quais 252,21 g/mol em carbonos. [65] O seu %FTOC pode ser calculado de forma semelhante ao já descrito para o Cloridrato de Oximetazolina.

- Precisão

Para o parâmetro da precisão foi preparada a solução padrão tendo sido efetuadas 6 análises da solução ao limite analítico e cujo objetivo é determinar o coeficiente de variação dos valores obtidos, valor que deverá ser inferior ao limite máximo estipulado para este parâmetro de validação, < 10%. [66]

- Repetibilidade

A repetibilidade foi analisada para ambos os métodos de amostragem recorrendo a um conjunto de 6 determinações para cada método de amostragem.

– 6 Amostras de recuperação da placa sobrecarregada ao nível do LA – uma placa em que se adicionou 1 mL da solução de contaminação. Após a sua secagem, foi amostrada conforme descrito no ponto de recolha das amostras, nas mesmas 24 horas, mantendo todas as constantes variáveis experimentais do método. Calculou-se a percentagem de recuperação e foi determinado o coeficiente de variação dos valores obtidos. O valor máximo do coeficiente de variação para a recuperação das amostras analisadas deve ser inferior ao máximo admitido para este parâmetro, 20%. [66]

A percentagem de recuperação pode ser obtida utilizando a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor TOC obtido}}{\text{TOC esperado}} \times 100 \quad \text{Equação 3.20}$$

- Exatidão

Adicionou-se às placas em triplicado, certa quantidade de solução de Oximetazolina em água, correspondentes aos níveis LA 40%, 60%LA e LA. Após secagem procedeu-se de acordo com o ponto de recolha das amostras, para ambos os métodos. Foi então determinada a percentagem de recuperação desta substância ativa, calculada segundo já explicado.

O desvio de 50%LA relativamente ao LA e o desvio de 150%LA relativamente ao LA deverão ser ambos inferiores a 25%, como estipulado para este parâmetro de validação.

O desvio relativamente ao LA é dado por:

$$\text{Desvio do LA (\%)} = \frac{\text{Média de Recuperações para LA}}{\text{Média de Recuperações } x\% \text{LA}} \times 100 \quad \text{Equação 3.21}$$

Os valores individuais das recuperações obtidas deverão estar compreendidos entre os 50% e os 150%.

- Estabilidade

Foi estudada a estabilidade das soluções analíticas assim como a estabilidade da substância no equipamento.

- Estabilidade das Soluções Analíticas

Foram preparadas as soluções para recuperação da placa sobrecarregada ao nível do LA de acordo com o descrito no parâmetro da repetibilidade;

Determinou-se o teor das soluções obtidas imediatamente após a sua preparação e após 48h de conservação. Uma foi armazenada à temperatura ambiente e com exposição à luz (deixada na bancada no CQ) e outra armazenada no frigorífico $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e sem exposição à luz.

O desvio observado entre as amostras mantidas em diferentes condições durante 48h não deverá ser superior a 5%.

- Estabilidade da Substância no Equipamento

Foram preparadas placas com sobrecarga de Oximetazolina (correspondente a limite analítico) e armazenadas à temperatura ambiente e com exposição à luz. Efetuou-se o doseamento como descrito na Preparação de Placas de Recuperação.

O desvio obtido entre as amostras deverá ser igual ou inferior a 20%.

3.6 Testes Para Validação de Limpeza por TOC para Detecção de Resíduos de Cloridrato de Oximetazolina

Após validação do método analítico TOC para detecção de Cloridrato de Oximetazolina em amostras de validação de limpeza, foram implementados novos testes, com ambos os métodos de amostragem, na validação dos equipamentos cujo pior caso é esta substância ativa.

3.6.1 Análise de Resíduos de Cloridrato de Oximetazolina por TOC

3.6.1.1 Amostragem com Zaragatoas (“Swab”)

Materiais

- Frascos para análise de TOC
- “Cleaning Validation Series” – Tx714K_Texwipe
- Micropipeta de 100 µL a 1000 µL e respectivas pontas descartáveis
- Máscara e luvas
- Banho de ultra-sons
- Equipamento de TOC
- Janela de silicone de 100 cm²

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra;
2. Encha os frascos destinados ao Branco e às amostras 2 vezes consecutivas com água purificada descartando as águas de seguida. Recolha a 3ª água;
3. Adicione com a micropipeta 0,4 mL de água purificada a um swab (0,2 mL em cada face);
4. Numa área do equipamento correspondente a 100 cm² (10x10 cm), esfregue horizontalmente, com uma das faces do swab, efetuando cerca de 10 movimentos em ziguezague (ver Figura 3.23.). O swab deve ser pressionado firmemente de encontro à superfície por forma a assegurar-se o contacto contínuo;
5. Na mesma área, esfregue verticalmente, com a outra face do swab, efetuando cerca de 10 movimentos em ziguezague (ver Figura 3.23.). O swab deve ser pressionado firmemente de encontro à superfície por forma a assegurar-se o contacto contínuo;
6. Parta o swab para o interior do frasco de análise de TOC cheio com água purificada e rosque o frasco;

7. Repita os pontos 1. a 6. para cada ponto crítico de amostragem. As amostras devem ser analisadas dentro de 48h;
8. As amostras serão analisadas no equipamento TOC no Controlo da Qualidade.

Execução do Teste

1. Preparação:
 - Colocar as amostras em agitação no ultra-sons durante 45 minutos. No final deste tempo arrefecer à temperatura ambiente em banho de água antes de colocar no equipamento TOC para analisar.
2. Proceder por TOC:
 - Colocar as amostras no equipamento TOC para proceder à determinação do valor de TOC (carbonos orgânicos), selecionando o método de Autoreagent.

Critério de Aceitação

$$T \leq LA$$

Onde:

$$T = \frac{\text{Valor de TOC}}{\%FTOC} \times 100 \quad \text{Equação 3.22}$$

T: Teor de Cloridrato de Oximetazolina expresso em µg/mL

Valor de TOC: Diferença entre o valor de TOC da amostra e do branco (ppm)

%FTOC: Percentagem de carbonos na molécula de Cloridrato de Oximetazolina

- Limite Analítico (LA)

É expresso segundo a Equação 3.5.

3.6.1.2 Amostragem com Passagem de Solvente

Materiais

- 3 frascos para análise de TOC
- Máscara e luvas
- Banho de ultra-sons
- Equipamento de TOC

Execução da Amostragem

1. Identifique os frascos de amostra: Branco, A e B;
2. Use máscara e luvas para realização do procedimento, usando sempre água purificada corrente e nunca mergulhando os frascos das amostras nos recipientes de recolha;
3. Encha o frasco destinado ao Branco duas vezes com água purificada (baixo teor de TOC), descartando as águas. Recolha a 3ª água e rolhe o frasco;
4. Com o equipamento a funcionar, passe as mangueiras por água purificada;
5. Encha o frasco, destinado às Amostras A e B, 2 vezes consecutivas vertendo, com cuidado, a água que se encontra em contacto com o equipamento, descartando as águas de seguida. Recolha a 3ª água e rolhe os frascos;
6. As amostras serão analisadas no equipamento de TOC no Controlo da Qualidade.

Execução do Teste

1. Proceder por TOC:
 - Colocar as amostras no equipamento TOC para proceder à determinação do valor de TOC (carbonos orgânicos), seleccionando o método de Autoreagent.

Critério de Aceitação

$$T \leq LA$$

Onde T representa o teor de Cloridrato de Oximetazolina na amostra e é obtido pela Equação 3.22.

- Limite Analítico (LA)

É expresso segundo a Equação 3.6.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para o cálculo do PDE, Limite de Exposição Diária Permitida, assim como os resultados das amostragens para validação de limpeza dos diversos equipamentos. Os resultados das validações de limpeza encontram-se divididos por equipamentos utilizados na produção de medicamentos e equipamentos utilizados na produção de dermocosméticos.

4.1 Resultados do Cálculo do PDE

A monografia HBEL onde se encontram descritas as características e são determinados os Limites de Exposição Diária Permitida, PDE, de todas as substâncias ativas utilizadas nos Laboratórios Atral foi revista. Nesta revisão, foram efetuadas atualizações dos valores de PDE das substâncias ativas Metocarbamol, Minociclina, Ceftriaxona e Penicilina G Benzatínica assim como foram determinados os valores de PDE para o Cloridrato de Glucosamina, Cefotaxima, Cetoconazol, Penicilina G Sódica, Penicilina G Procráinica e Cefadroxil.

Para o cálculo do PDE é necessário obter informações sobre o NOAEL de cada substância ativa e definir os fatores de ajuste já especificados na Tabela 3.1.. A fórmula para o cálculo do valor do PDE segue a Equação 2.2.

Para as substâncias Metocarbamol e Minociclina, por serem produzidas em equipamentos onde são também fabricados produtos veterinários, foi calculado o PDE para humanos assim como o valor do PDE para animais.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados da Tabela 4.1. à Tabela 4.13..

- Metocarbamol

Tabela 4.1. Cálculo do PDE – Metocarbamol (Fonte: [67])

NOAEL (mg/kg/dia)		
1 600		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	5	13 semanas de estudo
F4	1	Sem efeitos adversos graves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE para Humanos (mg/dia)		PDE para Animais (mg/dia)
320		6,4

- Minociclina

Tabela 4.2. Cálculo do PDE – Minociclina (Fonte: [68])

NOAEL (mg/kg/dia)		
812		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	1	1 ano de estudo
F4	1	Sem efeitos adversos graves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE para Humanos (mg/dia)		PDE para Animais (mg/dia)
812		16,24

- Ceftriaxona

Tabela 4.3. Cálculo do PDE – Ceftriaxona (Fonte: [69])

NOAEL (mg/kg/dia)		
500		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	2	6 meses de estudo
F4	1	Sem efeitos adversos graves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administraço do estudo corresponde ao intencioado
PDE (mg/dia)		
2,5		

- Penicilina G Benzatínica

Tabela 4.4. Cálculo do PDE – Penicilina G Benzatínica

LOEL (mg/dia) ^(a)		
943,39 ⁽¹⁾		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	1	Dose terapêutica em humanos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	1	Dose terapêutica em humanos
F4	1*	Efeitos tóxicos leves
F5	10	NOAEL não foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administraço do estudo corresponde ao intencioado
PDE (mg/dia)		
9,43		

(a) Dose mínima em humanos não necessita da aplicação de 50 kg.

(1) O estudo de onde foram recolhidos estes dados não é público, sendo provenientes de *toxicology reports* efetuados por Azierta.

*A unidade de produção de Penicilinas é dedicada nos Laboratórios Atral pelo que não é necessário ter em conta o efeito alérgico.

- Cloridrato de Glucosamina

Tabela 4.5. Cálculo do PDE – Cloridrato de Glucosamina (Fonte: [70])

NOAEL (mg/kg/dia)		
2 130		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	1	52 semanas de estudo (1 ano)
F4	1	Sem efeitos adversos graves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
2 130		

- Cefotaxima

Vários estudos foram efetuados tendo resultado em diversos valores de NOAEL [71].

Tabela 4.6. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 1

NOAEL (mg/kg/dia)		
250		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	10	Não há informação da duração (pior caso)
F4	1	Efeitos tóxicos leves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
25		

Tabela 4.7. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 2

NOAEL (mg/kg/dia)		
2 000		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	12	O estudo foi efetuado em ratos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	10	Não há informação da duração (pior caso)
F4	1	Efeitos tóxicos leves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
83,33		

Tabela 4.8. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 3

NOAEL (mg/kg/dia)		
1 200		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	10	Não há informação da duração (pior caso)
F4	1	Efeitos tóxicos leves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
120		

Tabela 4.9. Cálculo do PDE – Cefotaxima Estudo 4

NOAEL (mg/kg/dia)		
1 200		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	12	O estudo foi efetuado em ratos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	10	Não há informação da duração (pior caso)
F4	1	Efeitos tóxicos leves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
50		

O valor do PDE a ser usado deverá ser o valor mais baixo de entre os obtidos, logo o PDE da Cefotaxima é de 25 mg/dia.

- Cetoconazol

Tabela 4.10. Cálculo do PDE – Cetoconazol (Fonte: [72])

NOAEL (mg/kg/dia)		
100		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	5	O estudo foi efetuado em ratas
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	10	28 dias de estudo
F4	1	Efeitos tóxicos leves
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	0,2	Entre oral e via tópica: Via oral → Via parenteral: 2 [73] Via parenteral → Via tópica: 0,1
PDE (mg/dia)		
50		

- Penincilina G Sódica

Tabela 4.11. Cálculo do PDE – Penincilina G Sódica (Fonte: [74])

NOAEL (mg/kg/dia)		
1 000		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	12	O estudo foi efetuado em ratos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	2	6 meses de estudo
F4	5	Efeitos tóxicos não letais
F5	1	NOAEL foi estabelecido
FC via adm.	100	Entre oral e via parenteral [75]
PDE (mg/dia)		
0,417		

- Penincilina G Procráinica

Tabela 4.12. Cálculo do PDE – Penincilina G Procráinica

LOEL (mg/kg/dia)		
47,62 ⁽¹⁾		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	1	Dose terapêutica em recém-nascidos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	1	Dose terapêutica em humanos
F4	1*	Efeitos tóxicos leves
F5	10	NOAEL não foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
23,81		

(1) O estudo de onde foram recolhidos estes dados não é público, sendo provenientes de *toxicology reports* efetuados por Azierta.

*A unidade de produção de Penincilinas é dedicada nos Laboratórios Atral pelo que não é necessário ter em conta o efeito alérgico.

- Cefadroxil

Tabela 4.13. Cálculo do PDE – Cefadroxil

LOEL (g/dia)		
1 ⁽¹⁾		
Fator de Ajuste	Valor	Justificação
F1	1	Dose terapêutica em humanos
F2	10	Extrapolção para variabilidade entre indivíduos
F3	2	Pode ser tomado por médio-longo prazo
F4	1*	Efeitos tóxicos leves
F5	10	NOAEL não foi estabelecido
FC via adm.	1	Via de administração do estudo corresponde ao intencionado
PDE (mg/dia)		
5		

(1) O estudo de onde foram recolhidos estes dados não é público, sendo provenientes de *toxicology reports* efetuados por ChemSafe.

*A unidade de produção de Penicilinas é dedicada nos Laboratórios Atral pelo que não é necessário ter em conta o efeito alergénico.

4.2 Resultados da Validação do Método de Quantificação de Cloridrato de Oximetazolina por TOC

Aquando da revisão da monografia HBEL e do plano mestre de validação detetou-se que a substância ativa Cloridrato de Oximetazolina era o produto pior-caso A em diversos equipamentos do setor FLP, mas que, no entanto, não possuía um método validado para a sua quantificação. Deste modo, procedeu-se à validação do método de quantificação de Cloridrato de Oximetazolina por TOC.

- Determinação do Limite Analítico

Na Tabela 4.14 encontram-se descritos os limites analíticos para todos os equipamentos onde o produto Rinerge, cuja SA é o Cloridrato de Oximetazolina, é o pior caso por apresentar o PDE mais baixo dos produtos produzidos nestes equipamentos, 0,05 mg/dia. O produto pior-caso B, em cada equipamento, é determinado avaliando qual o produto com dimensão de lote mais pequena do conjunto de produtos que passa pelo equipamento. Assume-se que, após a fabricação do produto pior-caso A, o

produto onde possivelmente se encontrarão resíduos mais concentrados e que, por isso, apresentará maiores riscos para a saúde humana, é o que apresenta dimensão de lote mais pequena.

O cálculo do limite analítico é realizado segundo descrito na secção 3.3 e 3.6.1.. Quando o cálculo do LRA é superior a 10 ppm, considera-se o valor como 10 ppm e no cálculo do LA, a área de superfície amostrada é de 100 cm², o fator de recuperação 100% e o volume de solvente 40 mL, a capacidade do frasco de TOC.

Tabela 4.14. Cálculos para Determinação do Limite Analítico Pior-Caso.

Equipamento	Produto Pior-Caso A	Produto Pior-Caso B	MDd (g/dia)	DL (kg)	SCEP (cm ²)	LA (µg/mL)
Câmara de Pesagem	Cloridrato de Oximetazolina PDE: 0,05 mg/dia	Aciclosina Creme 10 g	1	100	183 805	13,60
Agitador de Hélice		Lisomucin 2 mg/mL Gotas Oraís 15 mL	3	200	767,08	6 518,23
Bomba de Trasfega de Líquidos		Lisomucin 2 mg/mL Gotas Oraís 15 mL	3	200	3 648,33	33,33
Reservatório 250 L		Zotinar Loção Capilar 100 mL	15	1 000	25 844,31	322,44
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck		Lisomucin 2 mg/mL Gotas Oraís 15 mL	3	200	1 679,2	4 000

O equipamento que originou um limite analítico inferior foi a câmara de pesagem pelo que a validação será efetuada tendo por base o valor deste limite.

Para facilitar a preparação das soluções utilizadas para a validação, considerou-se um Limite Analítico (LA) de 10 µg/mL. Como se trata da validação de um método para deteção de resíduos de uma SA em amostras de validação de limpeza é possível a diminuição do limite utilizado uma vez que, se o método detetar um limite inferior detetará também quantidades superiores.

- Parâmetro de Linearidade

Segundo o procedimento de Validação de Métodos Analíticos usados em Validação de Limpeza em vigor nos Laboratórios Atral, a gama de linearidade a validar deve compreender 50% do LA ou o LQ e 200% do LA.

Tabela 4.15. Dados da Curva de Linearidade entre 50% a 200% LA

Nível	Concentração (µg/mL)	TOC (ppm)	Fator resposta	Desvio (%)
50% LA	5	5,8541	1,171	26,38
80% LA	8	7,7441	0,968	4,49
LA	10	9,2641	0,926	0
150% LA	15	11,941	0,796	14,07
200% LA	20	12,7741	0,639	31,06
		Média	0,900	15,2
		DP	0,199	-
		CV (%)	22,065	-

O coeficiente de variação obtido foi bastante elevado, cerca de 22%.

A curva de calibração obtida pode ser observada na Figura 4.1..

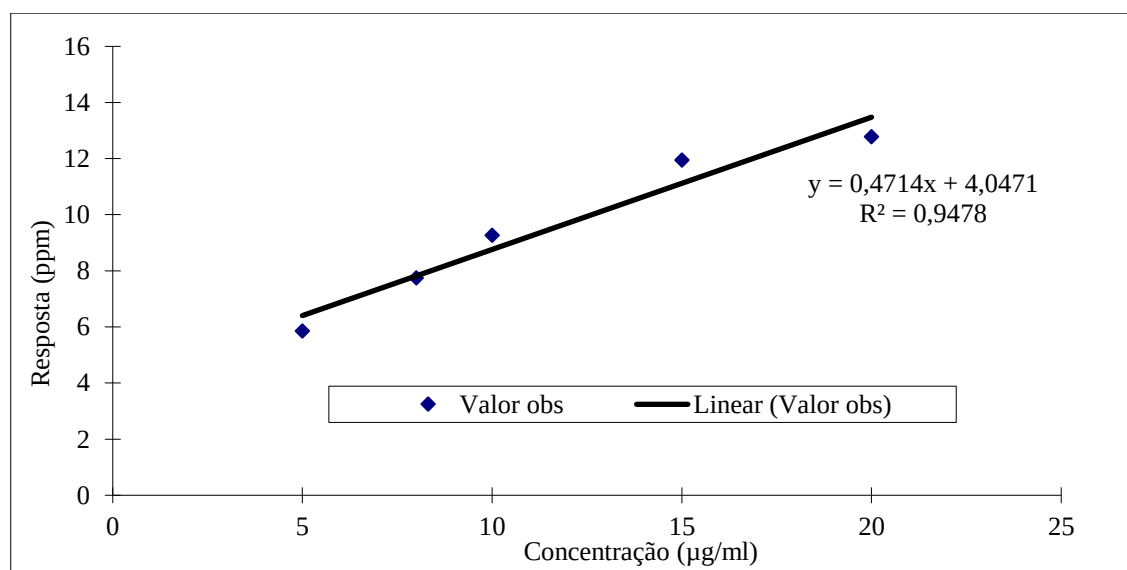


Figura 4.1. Gráfico da Curva de Calibração na Gama 50% a 200% LA.

Como se pode observar pela análise da Figura 4.1., os valores observados para 150% e 200% LA encontram-se afastados da curva de linearidade, tendo a reta um coeficiente de determinação, R^2 , de 0,948, o que é um valor baixo para o pretendido (0,97).

O coeficiente de correlação obtido para este conjunto de dados foi de 0,97, inferior ao estipulado para este parâmetro de validação, 0,995 pelo que o método não apresenta a linearidade desejada na gama utilizada.

Deste modo, a gama de linearidade para o estudo foi reduzida tendo sido usados intervalos entre 40% a 120% do LA.

Na Tabela 4.16. podem ser consultados os valores obtidos para a nova gama e na Figura 4.2. a respetiva curva de linearidade.

Tabela 4.16. Dados da Curva de Linearidade entre 40% a 120% LA.

Nível	Concentração (µg/mL)	TOC (ppm)	Fator resposta	Desvio (%)
40% LA	4	3,262	0,815	13,86
60% LA	6	4,172	0,695	2,917
80% LA	8	5,732	0,717	0,0405
LA	10	7,162	0,716	0
120% LA	12	8,162	0,680	5,031
		Média	0,725	4,369
		DP	0,053	-
		CV (%)	7,308	-

Para este conjunto de resultados o coeficiente de variação obtido foi bastante mais baixo, aproximadamente 7,3%.

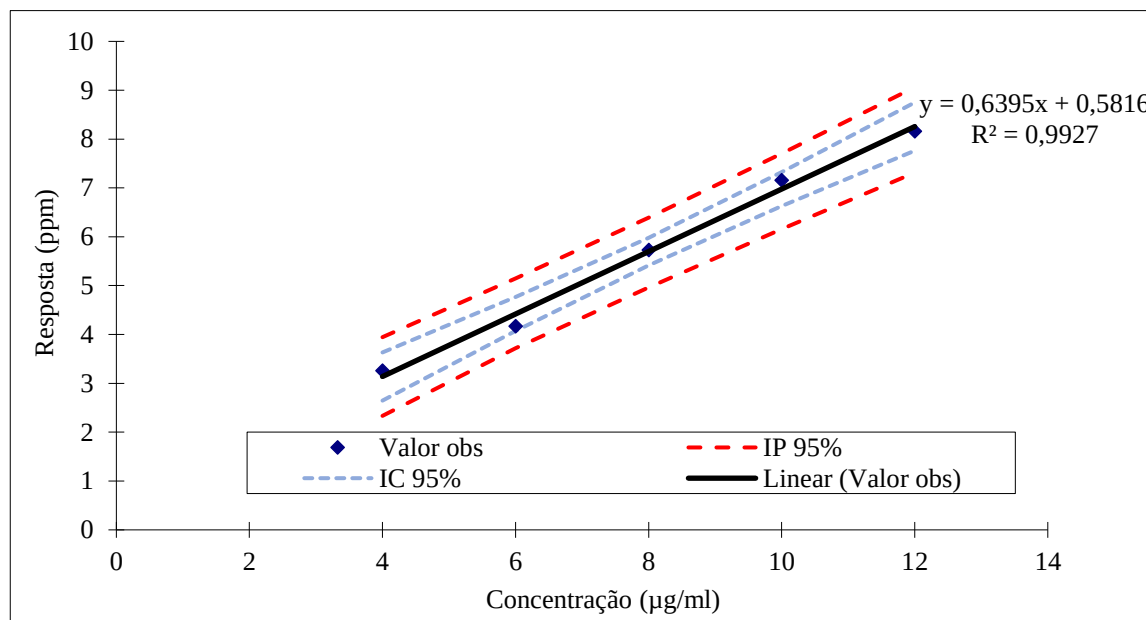


Figura 4.2. Gráfico da Curva de Calibração na Gama 40% a 120% LA.

Pela visualização da Figura 4.2. é possível constatar que os valores observados se encontram próximos da regressão obtida e repartidos em ambos os lados da mesma, tendo o coeficiente de determinação, R^2 , sido de 0,9927, valor superior ao estipulado para este parâmetro, de 0,97.

O coeficiente de correlação nesta gama de trabalho foi de 0,996 pelo que cumpre com o critério de aceitação estabelecido para este parâmetro de validação, $>0,995$.

Na Figura 4.2. estão ainda apresentados os intervalos de confiança para a média dos valores de Y e de predição para os valores individuais de Y, referentes a um nível de confiança de 95%.

Os gráficos referentes ao desenho de residuais e de probabilidade normal obtidos deste modelo encontram-se representados graficamente na Figura 4.3. e

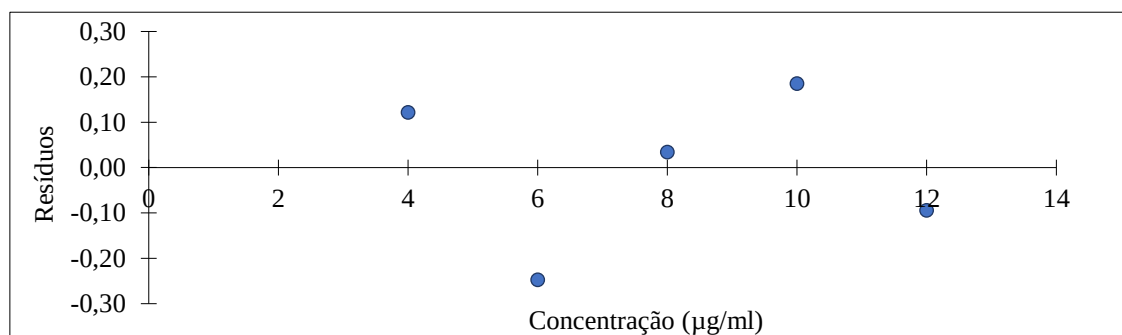


Figura 4.4, respetivamente.

Figura 4.3. Gráfico dos Resíduos.

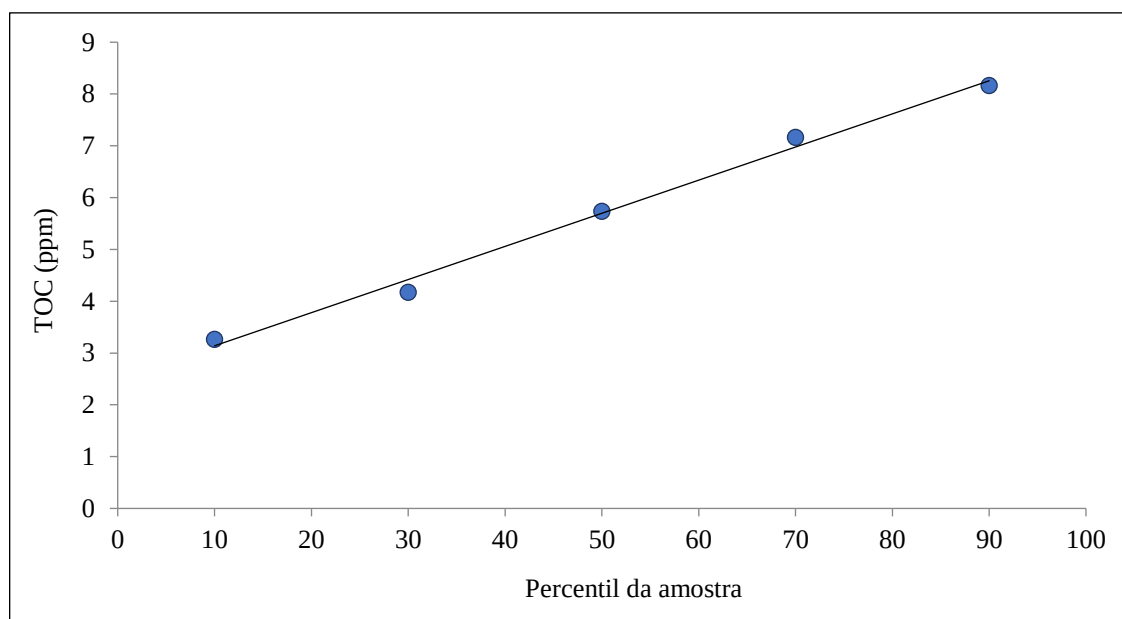


Figura 4.4. Gráfico de Probabilidade Normal.

Pela análise da Figura 4.3. e

Figura 4.4, conclui-se que a distribuição dos resíduos se mostra aleatória uma vez que os pontos não seguem nenhum padrão pelo que se conclui que os erros são aproximadamente normalmente distribuídos e com variância constante e o modelo de regressão linear se ajusta aos dados obtidos.

Adicionalmente, foi também calculado o intervalo de confiança a 95% quer para a ordenada na origem, quer para o declive da regressão linear. Os dados obtidos podem ser consultados na Tabela 4.17..

Tabela 4.17. Intervalos de Confiança a 95% para a Ordenada na Origem e Declive da Regressão Linear.

IC 95% Ordenada na Origem	
Limite Inferior	Limite Superior
-0,273	1,436
IC 95% Declive	
Limite Inferior	Limite Superior
0,539	0,740

Pela observação dos resultados da Tabela 4.17., constata-se que a ordenada na origem não é significativamente diferente de zero.

Assim, conclui-se que o método tem uma linearidade adequada à sua finalidade, na gama de concentrações entre 40% a 120% LA.

- Limite de Quantificação e Limite de Detecção

Através dos resultados da linearidade podemos estimar um limite de quantificação de 3,129 µg/mL e um limite de deteção de 1,032 µg/mL, através das Equações 2.7 e 2.8.

De modo a verificar os limites estimados, foram preparadas 3 soluções: uma a metade da concentração do limite de deteção, uma à concentração do limite de deteção e outra à concentração do limite de quantificação. Para cada uma destas soluções foram efetuadas 3 medições de TOC, cujos resultados podem ser consultados em seguida.

Tabela 4.18. Resultados dos Ensaio Relativos a ½ Limite de Deteção, Limite de Deteção e Limite de Quantificação.

Amostra	TOC (ppb)	Média	DP	CV (%)	
½ Limite de Deteção (0,5 µg/mL)	439,6	440,9	16,04	3,638	
	425,6				
	457,6				
Limite de Deteção	715,6	729,3	13,50	1,852	

(1 µg/mL)	742,6				Critério de Aceitação <15%
	729,6				
Limite de Quantificação (3 µg/mL)	2 051,6	2 041,6	10,00	0,490	
	2 041,6				
	2 031,6				

O equipamento deteta ½ Limite de Detecção estimado (0,5 µg/mL) com um coeficiente de variação de 3,638%. Para o limite de detecção estimado (1 µg/mL) o coeficiente de variação corresponde a um valor inferior ao obtido para metade do limite, de 1,852%. Desta forma, conclui-se que o método possui um grau de precisão adequado, uma vez que os coeficientes de variação obtidos são inferiores ao valor máximo admitido para este padrão de validação que, para o nível LD é de 15%.

Quanto ao Limite de Quantificação, o coeficiente de variação obtido foi de 0,490%.

Assim, é possível concluir que se verifica um limite de detecção de 0,5 µg/mL e um limite de quantificação, LQ, de 3 µg/mL.

- Parâmetro de Seletividade

Foram analisadas diversas amostras com o intuito de estudar a seletividade do método. Sendo um método não específico não se espera que mostre seletividade para o composto em estudo o Cloridrato de Oximetazolina pelo que se pretende averiguar o impacto dos possíveis interferentes no resultado obtido.

Para o cálculo do valor de TOC esperado foram calculados os valores de %FTOC segundo a Equação 3.19 e os seus resultados encontram-se na Tabela 4.19..

Tabela 4.19. %FTOC para as Substâncias em Estudo.

Substância	FTOC (%)
Cloridrato de Oximetazolina	64,74%
Cloreto de Benzalcónio	74,19%
Detergente “Joel”	33,4%

As amostragens efetuadas e os respetivos resultados encontram-se na Tabela 4.20..

Tabela 4.20. Resultados dos Ensaios Relativos ao parâmetro da Seletividade.

Amostra		TOC (ppb)	Esperado (ppb)
1	Solvente - Água Purificada	18,4	-
2	Branco Swab	208	-
3	Branco Recuperação da Placa com Swab	307	-
4	Branco Recuperação da Placa com Solvente	481	-
5	40% LA (Cloridrato de Oximetazolina)	3 262	2 589
	60% LA (Cloridrato de Oximetazolina)	4 172	3 884
	LA (Cloridrato de Oximetazolina)	7 162	6 474
	120 % LA (Cloridrato de Oximetazolina)	8 162	7 768
6	“Joel”	6 292	3 340
7	7.1 Recuperação “Joel” Swab	368	3 340
	7.2 Recuperação “Joel” Swab	338	3 340
8	8.1 Recuperação “Joel” Solvente	386	3 340
	8.2 Recuperação “Joel” Solvente	518	3 340
9	9.1 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) Swab	3 973	6 474
	9.2 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) Swab	3 793	6 474
10	10.1 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) Solvente	5 120	6 474
	10.2 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) Solvente	5 080	6 474
11	11.1 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) + “Joel” Swab	3 163	9 814
	11.2 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) + “Joel” Swab	3 483	9 814
12	12.1 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) + “Joel” Solvente	4 352	9 814
	12.2 Recuperação LA (Cloridrato de Oximetazolina) + “Joel” Solvente	3 472	9 814
13	13.1 Recuperação LA Rinerge Spray Swab	4 793	9 441
	13.2 Recuperação LA Rinerge Spray Swab	5 133	9 441
14	14.1 Recuperação LA Rinerge Spray Solvente	6 374	9 441
	14.2 Recuperação LA Rinerge Spray Solvente	7 464	9 441

Os primeiros 4 ensaios, relativos aos brancos, resultaram em respostas bastante baixas como se esperava uma vez que não deveriam apresentar teor em carbonos. Assim, a interferência dos componentes usados nos métodos de amostragem não se considera significativa.

Todos os valores relativos à análise de soluções contendo SA em diferentes concentrações, ensaio 5, estão um pouco superiores aos esperados pelo que é provável existir interferências no processo de pesagem e preparação de soluções, no entanto a variação não é significativa.

O valor de TOC do detergente “Joel”, ensaio 6, deu bastante elevado, 6 292 ppb quando se esperava 3 340 ppb. A pesagem deste detergente demonstrou-se bastante difícil dada a sua viscosidade e incapacidade da balança em estabilizar num valor. Adicionalmente, a homogeneização da solução levou ao aparecimento de muitas bolhas de ar na amostra que influenciam o valor do TOC.

No entanto, o valor de TOC da recuperação do detergente “Joel” segundo ambos os métodos de amostragem é bastante inferior ao valor da recuperação de Oximetazolina (ensaios 7 e 8). Para avaliar a interferência deste detergente quando em conjunto com a substância de interesse efetuaram-se os ensaios 9, 10, 11 e 12.

Ao contrário do esperado, no ensaio 11 e 12 os valores obtidos foram inferiores ao do ensaio 9 e 10, o que permite concluir que a presença de mais componentes na placa afeta negativamente a sua recuperação, no entanto, esta interferência não é significativa, pois não alterará em grande percentagem o valor esperado numa validação de limpeza.

Ainda relativamente aos ensaios 9 e 10, correspondentes à recuperação do Cloridrato de Oximetazolina segundo com os dois métodos de amostragem, observa-se que os valores de recuperação das sobrecargas, estão um pouco inferiores aos esperados pelo que é provável existir perdas no processo de amostragem e ser necessário calcular um fator de recuperação.

A substância ativa em estudo faz parte da composição do Rinerge Spray. Para avaliar as possíveis perturbações introduzidas pelos excipientes deste produto foram efetuados os ensaios 13 e 14 correspondentes à recuperação de placas inox sobrecarregadas com Rinerge. Um dos excipientes do Rinerge Spray é o Cloreto de Benzalcónio, substância com elevado número de carbonos, o que irá aumentar o valor de TOC esperado da recuperação (ensaio 13 e 14) em comparação com as recuperações da SA apenas (ensaio 9 e 10).

Como é de esperar, o método de TOC não é seletivo ao Cloridrato de Oximetazolina, no entanto, para o fim a que se destina (avaliação de resíduos após limpeza) pode-se considerar aceitável e as interferências como o detergente “Joel” ou os excipientes existentes no spray Rinerge como pior-caso.

- Parâmetro de Precisão

Para avaliar a precisão do método foram preparadas 6 soluções ao limite analítico e os resultados podem ser consultados na Tabela 4.21..

Tabela 4.21. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro da Precisão.

Amostra	TOC (ppm)	
1	7,512	
2	7,182	
3	7,222	
4	7,322	
5	7,212	
6	7,242	
Média	7,28	
Máx	7,512	
Mín	7,182	
DP	0,122	
CV (%)	1,677	Critério de Aceitação <10%

O coeficiente de variação obtido da precisão do sistema foi 1,677%, valor inferior ao limite máximo estipulado para este parâmetro, <10%. Conclui-se, assim, que o sistema tem uma precisão adequada à finalidade do método.

- Parâmetro de Repetibilidade

Para este parâmetro foram avaliadas 6 amostras provenientes da recuperação de placas inox ao nível do LA, com os dois métodos de amostragem incluídos nesta validação.

a) Método de amostragem com Zaragatoa (Swab)

Tabela 4.22. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Repetibilidade da Recuperação com Swab. (Parte 1/2)

Amostra	TOC (ppm)	Recuperação (%)
1	3,933	60,75
2	3,763	58,13
3	3,623	55,96
4	3,793	58,59
5	3,623	55,96
6	3,973	61,37

Tabela 4.22. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Repetibilidade da Recuperação com Swab. (Parte 2/2)

Média		58,46	Critério de Aceitação <20%
Máx		61,37	
Mín		55,96	
DP		2,294	
CV (%)		3,924	

O coeficiente de variação obtido para o conjunto de valores de recuperação das amostras analisadas foi de 3,924%, valor inferior ao valor máximo admitido para este parâmetro de validação: 20%. Assim, conclui-se que o método tem uma repetibilidade adequada à sua finalidade.

b) Método de amostragem com Passagem de Solvente

Tabela 4.23. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Repetibilidade da Recuperação com Solvente (água).

Amostra	TOC (ppm)	Recuperação (%)	Critério de Aceitação <20%
1	5,200	80,32	
2	5,080	78,47	
3	5,120	79,09	
4	4,990	77,08	
5	5,200	80,32	
6	5,710	88,20	
Média		80,58	
Máx		88,20	
Mín		77,08	
DP		3,928	
CV (%)		4,875	

O coeficiente de variação obtido para o conjunto de valores de recuperação das amostras analisadas foi de 4,875%, valor inferior ao valor máximo admitido para este parâmetro de validação: 20%. Assim, conclui-se que o método tem uma repetibilidade adequada à sua finalidade.

- Parâmetro de Exatidão

Para efetuar a análise deste parâmetro foram adicionadas quantidades de solução aquosa de Clo-ridrato de Oximetazolina a placas em triplicado aos níveis 40% LA, LA e 120% LA. As placas foram amostradas com os seguintes métodos de amostragem.

a) Método de amostragem com zaragatoa (Swab)

Tabela 4.24. Resultados dos Ensaios Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Swab aos níveis 40%, 100% e 120% LA.

Nível	TOC (ppm)	Recuperação (%)	Média	Variância (%)	
40% LA	1,903	73,49	75,16	34,925	Critério de Aceitação <25%
	1,703	65,77			
	2,233	86,23			
LA	3,573	55,19	55,71	0	
	3,623	55,96			
	3,623	55,96			
120% LA	3,433	44,19	40,63	-0,271	Critério de Aceitação <15%
	3,413	43,93			
	2,623	33,76			
Média		57,16			
Máx		86,23			
Mín		33,76			
DP		16,137			
CV (%)		28,227			

Para este conjunto de dados observa-se que as recuperações das amostras analisadas aos níveis 40%LA, LA e 120%LA foram 75,16%, 55,71% e 40,63%, respetivamente. Estes valores são bastante discrepantes resultando num coeficiente de variação superior a 28%.

Verifica-se também que o desvio de 40%LA relativamente ao LA é superior ao critério de aceitação de 25%, como estipulado para este parâmetro de validação.

Adicionalmente, a recuperação associada ao nível 120% LA foi muito reduzida, cerca de 40%, abaixo do intervalo de valores individuais expectável para este parâmetro (50% a 150%).

Conclui-se, então, que a recuperação de maiores quantidades de substância ativa recorrendo a um swab vai diminuindo, uma vez que não se altera a quantidade de solvente utilizada na amostragem.

Desta forma, diminuiu-se a gama de concentrações (40%, 60% e 100%LA) utilizadas para este parâmetro na tentativa de obter valores menos díspares de recuperação. Os resultados relativos a esta alteração podem ser consultados na Tabela 4.25..

Tabela 4.25. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Swab aos níveis 40%, 60% e 100% LA.

Nível	TOC (ppm)	Recuperação (%)	Média	Variância (%)	Critério de Aceitação <25%
40% LA	2,073	80,05	72,07	19,647	
	1,713	66,15			
	1,813	70,01			
60% LA	2,203	56,72	59,46	-1,288	
	2,503	64,44			
	2,223	57,23			
LA	3,973	61,37	60,24	0	
	3,793	58,59			
	3,933	60,75			
Média		63,92			
Máx		80,05			
Mín		56,72			
DP		7,452			
CV (%)		11,658			

Através da observação dos resultados da Tabela 4.25. verifica-se que os valores obtidos para estes ensaios foram mais coerentes entre si, apresentando um coeficiente de variação de 11,658%.

O valor médio obtido para o conjunto de percentagens de recuperação das amostras analisadas aos níveis 40%LA, 60%LA e LA foram de 72,07%, 59,46% e 60,24%, respetivamente. O desvio de 40%LA relativamente ao LA e o desvio do 60%LA em relação a LA são ambos inferiores a 25%, como estipulado para este parâmetro de validação.

Os valores individuais estão ainda compreendidos entre os 50 e 150%, logo, face aos resultados apresentados, conclui-se que o método é exato nesta gama de concentrações.

Conclui-se ainda que a percentagem média de recuperação utilizando este método de amostragem é de 63,92%.

b) Método de amostragem com Passagem de Solvente

Do ensaio de Repetibilidade, verificou-se que a recuperação utilizando o método de amostragem com passagem de solvente resulta em melhores recuperações do que o método de amostragem com swab (vide Tabela 4.22 e Tabela 4.23). Assim, para este parâmetro e método de amostragem foram efetuadas análises em triplicado aos níveis de 40%, 60%, 100% e 120% de LA.

Tabela 4.26. Resultados dos Ensaio Relativos ao Parâmetro da Exatidão da Recuperação com Solvente.

Nível	TOC (ppm)	Recuperação (%)	Média	Variância (%)	
40% LA	2,190	84,57	79,29	-6,553	Critério de Aceitação <25%
	1,900	73,37			
	2,070	79,94			
60% LA	3,110	80,07	75,78	-10,7	
	2,980	76,72			
	2,740	70,54			
LA	5,350	82,64	84,86	0	
	5,990	92,53			
	5,140	79,40			
120% LA	6,380	82,13	83,84	-0,012	Critério de Aceitação <15%
	6,520	83,93			
	6,640	85,47			
Média		80,94			
Máx		92,53			
Mín		70,54			
DP		5,789			
CV (%)		7,152			

Os valores das recuperações obtidas segundo amostragem com passagem de solvente mostram-se superiores à amostragem realizada com swab e mais semelhantes entre si, apresentando um coeficiente de variação de 7,152%.

O valor médio obtido para o conjunto de percentagens de recuperação das amostras analisadas aos níveis 40%LA, 60%LA, LA e 120%LA foram de 79,29%, 75,78%, 84,86% e 83,84%, respectivamente. O desvio de 40%LA relativamente ao LA e o desvio do 60%LA em relação a LA não devem ser superiores a 25%, o que se verifica nos dados obtidos. O desvio de 120%LA e LA não deve variar mais de 15%, o que também se verifica para os dados apresentados.

Os valores individuais estão compreendidos entre os 50 e 150%. Face aos resultados apresentados conclui-se que o método é exato.

Adicionalmente, conclui-se que a percentagem média de recuperação utilizando este método de amostragem é de 80,94%.

- **Parâmetro de Estabilidade**

Para este parâmetro foram analisadas a estabilidade das soluções analíticas e a estabilidade da substância no equipamento para ambos os métodos de amostragem.

- **Estabilidade das Soluções Analíticas**

Foram preparadas sobrecargas de placas inox ao nível do LA e amostradas de acordo com os métodos de amostragem em questão, swab e passagem com solvente.

Determinou-se o teor das soluções obtidas imediatamente após a sua preparação e após 48h de conservação. Uma foi armazenada à temperatura ambiente e com exposição à luz (deixada na bancada no CQ) e outra armazenada no frigorífico e sem exposição à luz. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 4.27. e na Tabela 4.28., para ambos os métodos de amostragem em estudo.

Tabela 4.27. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade das Soluções de Recuperação com Swab.

Tempo (h)	Solução	TOC (ppm)	Média	Desvio (%)	
0	1	4,293	4,528	-	Critério de Aceitação <5%
	2	4,763			
48	Frio	4,573	-	0,994	
	Ambiente	4,543	-	0,331	

Tabela 4.28. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade das Soluções de Recuperação com Solvente.

Tempo (h)	Solução	TOC (ppm)	Média	Desvio (%)	
0	1	5,449	5,434	-	Critério de Aceitação <5%
	2	5,419			
48	Frio	5,489	-	1,012	
	Ambiente	5,429	-	-0,092	

No estudo das estabilidades das soluções analíticas obtidas através de recuperação com swab, as soluções são estáveis quando mantidas no frigorífico e na ausência de exposição de luz ou na bancada

com presença de luz, durante pelo menos 48h, uma vez que o desvio é 0,331% e 0,994%, ambos valores iguais ou inferiores a 5%.

Quanto às soluções analíticas obtidas através da recuperação com passagem de solvente, conclui-se que estas são estáveis quando mantidas no frigorífico e na ausência de exposição de luz ou na bancada com presença de luz, durante pelo menos 48h, uma vez que o desvio é 1,012% e 0,092%, ambos valores iguais ou inferiores a 5%.

Deste modo, comprova-se a estabilidade das soluções analíticas pelo período de 48 horas.

▪ Estabilidade da Substância no Equipamento

Foram preparadas placas com sobrecarga de Cloridrato de Oximetazolina (correspondente a limite analítico de 10 µg/mL).

Determinou-se o teor das soluções obtidas imediatamente após a sua preparação e após 48h em que as placas inox estiveram em condições ambientais, isto é, na bancada com exposição à luz, usando amostragem com swab e passagem com solvente.

Os resultados podem ser consultados na Tabela 4.29 e Tabela 4.30.

Tabela 4.29. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade no Equipamento de Recuperação com Swab.

Tempo (h)	TOC (ppm)	Média	Desvio (%)	
0	4,293	4,528	-	Critério de Aceitação <15%
	4,763			
48	4,423	4,468	1,325	
	4,513			

Tabela 4.30. Resultados dos Ensaio Relativos ao parâmetro de Estabilidade no Equipamento de Recuperação com Solvente.

Tempo (h)	TOC (ppm)	Média	Desvio (%)	
0	5,449	5,434	-	Critério de Aceitação <15%
	5,419			
48	5,639	5,614	-3,312	
	5,589			

Na estabilidade da substância no equipamento, considera-se que a substância é estável no equipamento nas condições de conservação em que foi realizado o estudo, durante pelo menos 48h quando

a variação de teor é igual ou inferior a 15%, situação que se verificou em ambos os métodos de amostragem.

Comprova-se, assim, a estabilidade da substância no equipamento pelo período de 48 horas.

4.2.1 Conclusões da Validação do Método Analítico

Em suma, os resultados obtidos para o método validado da quantificação de Cloridrato de Oximetazolina por TOC são:

- Precisão: $CV = 1,677\%$

- Repetibilidade:

Recuperação com Swab: $CV = 3,924\%$

Recuperação com Solvente: $CV = 4,874\%$

- Exatidão: Verificou-se uma percentagem média de:

Recuperação com Swab de 63,92%

Recuperação com Solvente de 80,94%

- Linearidade: coeficiente de correlação linear = 0,996

- Estabilidades:

Recuperação com Swab das soluções - estável até 48h no frigorífico e na bancada, $CV < 5\%$

Recuperação com Swab da substância no equipamento - estável até 48h, $CV < 15\%$.

Recuperação com Solvente das soluções - estável até 48h no frigorífico e na bancada, $CV < 5\%$

Recuperação com Solvente da substância no equipamento - estável até 48h, $CV < 15\%$.

Face aos resultados, podemos concluir que os 2 métodos (amostragem com swab e solvente) são adequados para o fim a que se destinam: quantificação da substância ativa, a nível das validações de limpeza de equipamento quando:

- O equipamento possui superfície de aço inoxidável;
- O procedimento de limpeza utiliza água e/ou detergente “Joel”;

- O produto Rinerge 0,05% Spray Nasal 10 mL seja o pior caso;
- Os LA estejam incluídos na gama de trabalho desta validação (4 a 12 µg/mL).

Tendo ainda em conta o resultado do parâmetro da exatidão (recuperação), o fator de recuperação a utilizar na determinação do LA é de 0,6392 (63,92%), quando se trate de amostras obtidas por amostragem com swab. Quando forem obtidas amostras por passagem de solvente (água), o fator de recuperação a utilizar na determinação do LA é de 0,8094 (80,94%).

4.3 Validações de Limpeza

O setor FLP está correntemente dividido na produção de medicamentos e na produção de dermocosméticos.

Para os equipamentos utilizados na produção de medicamentos optou-se por se efetuar um conjunto de testes por forma a validar a limpeza dos equipamentos. Os testes escolhidos foram a inspeção visual, recolha de água de lavagem para TOC para análise de resíduos de limpeza e compostos orgânicos, análise de resíduos de substância ativa em HPLC ou, para os equipamentos onde o Cloridrato de Oximetazolina é o pior-caso, análise de resíduos de substância ativa em TOC conforme o método validado e ainda pesquisa microbiológica.

Já relativamente aos equipamentos onde são produzidos exclusivamente produtos dermocosméticos (produtos da marca Barral), por não possuírem substâncias ativas a abordagem utilizada foi diferente. O teste de inspeção visual, análise de água de lavagem em TOC e pesquisa microbiológica mantém-se, sendo adicionado ainda a pesquisa de substâncias iónicas por condutividade através da recolha de água de lavagem para análise de resíduos de detergentes de limpeza. A utilização de dois métodos não específicos visa fortalecer a robustez do processo de validação.

A seleção dos métodos de amostragem foi baseada na possibilidade de fisicamente amostrar cada equipamento. Por um lado, em certos equipamentos a amostragem por zaragatoa ou placas de contacto é possível, quer seja para análise de resíduos de substância ativa, quer para pesquisa microbiológica, ou seja, os locais que são acessíveis ao operador e ao método de amostragem. Por outro, devido à geometria e acessibilidade ao equipamento pode não ser possível a amostragem utilizando estes métodos. Nesse caso, a amostragem é feita com passagem de solvente.

Na Tabela 4.31. podem ser encontrados todos os equipamentos em validação bem como os testes realizados no protocolo de validação de cada equipamento e o respetivo método de amostragem.

Tabela 4.31. Testes a Efetuar por Equipamento para as Validações de Limpeza.

	Testes a Efetuar					
Equipamento	Inspeção Visual	TOC	Condutividade	SA		Microbiologia
				HPLC	TOC	
Agitador Duplo Cone	+	+	-	(a)	-	(a)
Agitador em Hélice	+	+	-	-	(a)	(a)
Bomba de Trasfega de Líquidos SB1	+	-	-	-	(b)	(b)
Bomba de Trasfega de líquidos SB2	+	+	-	(b)	-	(b)
Câmara de Pesagem	+	-	-	-	(a)	(a)
Homogeneizador 200L Herba	+	+	-	(a)	-	(a)
Homogeneizador 300L Tubomek – Barral	+	+	+	-	-	(a)
Homogeneizador Melter – Barral	+	+	+	-	-	(b)
Homogeneizador Turbofix – Barral	+	+	+	-	-	(b)
Máquina de Enchimento Bisnagas Axomatic – Barral	+	+	+	-	-	(a)
Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock – Barral	+	+	+	-	-	(a)
Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini	+	+	-	(b)	-	(b)
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck	+	-	-	-	(b)	(b)
Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis	+	+	-	(a)	-	(a)
Máquina Doseadora Jolly – Barral	+	+	+	-	-	(a)
Reator 150L	+	+	-	(a)	-	(a)
Reator 2000L	+	+	-	(b)	-	(b)
Reservatórios 100L	+	+	+	-	-	(a)
Reservatórios 150L – Barral	+	+	-	(a)	-	(a)
Reservatórios 250L	+	+	-	(a)	(a)	(a)
Reservatórios 350L	+	+	-	(a)	-	(a)
Reservatórios 350L – Barral	+	+	+	-	-	(a)

‘+’: Teste a efetuar

‘-’: Teste não efetuado

(a): Teste efetuado com amostragem por zaragatoa ou placa de contacto (para microbiologia)

(b): Teste efetuado com amostragem com passagem de solvente

4.3.1 Apresentação dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos

- Seleção dos Produtos Pior-Caso e Cálculo dos Limites de Aceitação

A seleção do produto pior-caso A para cada equipamento é baseada na análise dos valores dos PDEs das substâncias ativas que passam em cada equipamento. Tendo sido selecionado como pior-caso A a substância ativa que apresenta o menor valor de PDE.

O pior-caso B é identificado analisando a menor dimensão de lote dos produtos produzidos no equipamento, que não coincida com o pior-caso A.

Tendo identificados os produtos pior-caso para cada equipamento é possível proceder ao cálculo dos limites de aceitação para os testes relativos à análise de compostos orgânicos e à análise de resíduos de substância ativa. Na Tabela 4.32. encontra-se resumida a informação necessária ao cálculo dos limites analíticos para cada equipamento utilizado na produção exclusiva de medicamentos.

Tabela 4.32. Dados para o Cálculo do Limite Analítico para os Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos. (Parte 1/2)

Equipamento	Produto Pior-Caso A	PDE (mg/dia)	Produto Pior-Caso B	MDd (g/dia)	LRA (ppm)	DL	SCEP (cm ²)	LRS (µg/cm ²)		ASL/ASA (cm ²)		VS (mL)		FR	LA (ppm)	
								TOC	SA	TOC	SA	TOC	SA		TOC	SA
Aagitador Duplo Cone	Dicloident (Diclofe- nac)	0,5	Gindoxi	2,5	>10	200 kg	946,44	2 113,18	2 113,18	539,47	100	5 000	50	0,9092	76	3 843
Aagitador em Hélice	Rinerge (Oximetazolina)	0,05	Lisomucin	3	>10	200 L	767,08	2 607,29	2 607,29	76,7	100	5 000	40	0,6392	13	4 166
Bomba de Trasfega de Líquidos SB1*	Rinerge (Oximetazolina)	0,05	Ketoco- nazole	200	0,25	200 kg	3 648,33	13,70		3 648,33		1 500		0,8094	27	
Bomba de Trasfega de líquidos SB2	Zotinar (Acetonido Prednaci- nolona)	4,8	Aciclosina	1	>10	100 kg	3 648,33	274,1	274,1	3 648,33	3 648,33	5 000	1 000	1	67	1 000
Câmara de Pesagem*	Rinerge (Oximetazolina)	0,05	Aciclosina	1	>10	100 kg	183 805,00	5,386		100		40		0,6392	9	
Homogeneizador 200 L Herba	Zotinar (Acetonido Prednaci- nolona)	4,8	Aciclosina	1	>10	100 kg	35 385,07	28,26	28,26	3 207,04	100	5 000	50	0,757	6	43
Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini	Dicloident (Diclofe- nac)	0,5	Ketoco- nazole	200	2,5	200 L	5 528,2	361,8	90,40	1 842,7	1 842,7	5 000	1 000	0,8855	46	148
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck*	Rinerge (Oximetazolina)	0,05	Lisomucin	3	>10	200 L	1 679,2	1 191		1 679,2		500		0,8094	3 238	
Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis	Zotinar (Acetonido Prednaci- nolona)	4,8	Aciclosina	1	>10	100 kg	9 283,09	107,7	107,7	501,56	100	5 000	50	0,757	4	163
Reator 150 L	Zotinar (Acetonido Prednaci- nolona)	4,8	Aciclosina	1	>10	100 kg	21 211,95	47,14	47,14	3 082,2	100	5 000	50	1	10	71
Reator 2000 L	Dicloident (Diclofe- nac)	0,5	Zotinar	15	>10	200 L	107 992,25	18,52	18,52	8 835,73	8 835,73	5 000	1 000	0,8855	11	144

Tabela 4.32. Dados para o Cálculo do Limite Analítico para os Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos. (Parte 2/2)

Equipamento	Produto Pior-Caso A	PDE (mg/dia)	Produto Pior-Caso B	MDd (g/dia)	LRA (ppm)	DL	SCEP (cm ²)	LRS (µg/cm ²)		ASL/ASA (cm ²)		VS (mL)		FR	LA (ppm)	
								TOC	SA	TOC	SA	TOC	SA		TOC	SA
Reservatórios de 100L	Zotinar (Acetonido Prednaci- nolona)	4,8	Aciclosina	1	>10	100 kg	14 677,54	68,13	68,13	2 531,7	100	5 000	50	0,757	12	113
Reservatórios 250 L	Rinerge (Oximetazolina)	0,05	Zotinar	15	3,33	1 000 L	25 844,31	386,93	128,98	3 437,03	100	5 000	40	0,6392	89	206
Reservatórios 350 L	Diclodent (Diclofe- nac)	0,5	Ketoco- nazole	200	2,5	200 L	29 267,08	68,34	17,08	3 928,56	100	5000	50	0,9092	18	31

‘*’: Nos equipamentos assinalados não são efetuados dois testes (um para TOC e outro SA) sendo apenas realizado um para deteção de SA por TOC segundo o método validado

‘>10’: Casos em que o LRA obtido é superior a 10 ppm, no entanto para efeitos de cálculo considera-se 10 ppm.

- Determinação dos Locais e Métodos de Amostragem

A seleção dos locais de amostragem deve ter em conta os locais do equipamento com maior área de contacto com o produto como é o caso do interior dos equipamentos (paredes, fundos, tampas e pás de agitação), as áreas de difícil limpeza e, por isso, de fácil acumulação de produto como dobradiças, torneiras e tubos.

Também o método de amostragem utilizado varia de acordo com a geometria e acessibilidade do ponto de amostragem escolhido.

A recolha de amostras para análise de resíduos de compostos orgânicos é efetuada segundo especificado no ponto 3.4.2. desta dissertação.

Quanto aos pontos de amostragem para recolha de amostras para determinação de resíduos de substância ativa ou pesquisa microbiológica, nos equipamentos em que é possível a amostragem por zaragatoas para determinação de resíduos de substância ativa, este método deve ser o preferencial devido à maior facilidade de execução da amostragem. Caso a acessibilidade ao equipamento dificulte a amostragem recorrendo a este método, deve-se utilizar a passagem de solvente para recolha das amostras.

Relativamente ao método de amostragem escolhido para a pesquisa microbiológica é preferencial a utilização de placas de contacto quando o local de amostragem o permite uma vez que é o método de mais fácil amostragem e execução e o que requer menor processamento de amostra e trabalho após a recolha da amostra. Em sítios onde, devido à geometria do equipamento, não é possível a amostragem recorrendo a placas de contacto, esta deve ser realizada com zaragatoas numa área de amostragem equivalente. Quando a acessibilidade ao interior do equipamento não permite nenhum dos métodos de amostragem referidos, opta-se pela passagem de água estéril como método de recolha de amostras.

Da Tabela 4.33. à Tabela 4.41. estão apresentados os locais e métodos de amostragem utilizados no processo de validação de limpeza de cada equipamento utilizado na produção de medicamentos.

Tabela 4.33. Pontos de Amostragem do Agitador Duplo Cone.

Agitador Duplo Cone		
Ponto n°	Designação	Local da amostragem
1	Veio Central/Eixo (Microbiologia – Z)	
2	Cone Superior (Microbiologia – PC)	
3	Cone Inferior (Microbiologia – PC)	
4	Disco Central (Microbiologia – PC)	

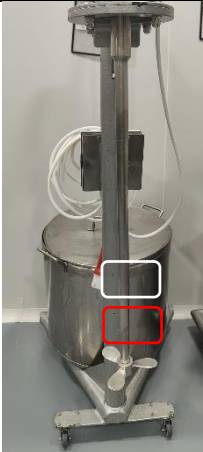
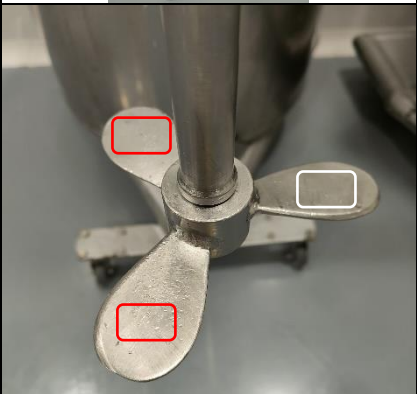
Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.34. Pontos de Amostragem do Agitador em Hélice.

Agitador em Hélice		
Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Veio Central/Eixo (Microbiologia – Z)	
2	Hélice (Microbiologia – PC)	

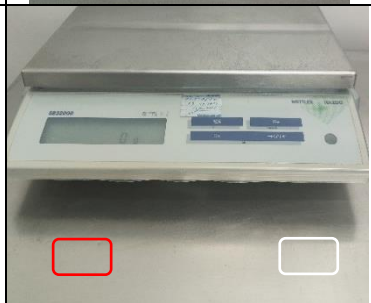
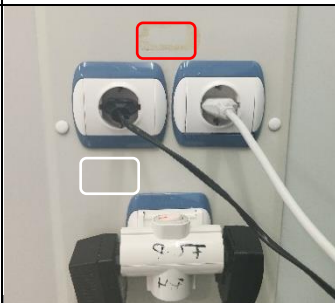
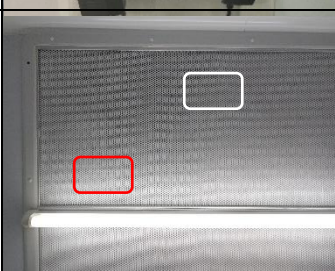
Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por TOC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.35. Pontos de Amostragem da Câmara de Pesagem.

Câmara de Pesagem					
Ponto n°	Designação	Local da amostragem	Ponto n°	Designação	Local da amostragem
1	Balança (Microbiologia – PC)		4	Parede (Microbiologia – PC)	
2	Lamelas (Microbiologia – PC)		5	Balança do Chão (Microbiologia – PC)	
3	Bancada (Microbiologia – PC)		6	Tomada (Microbiologia – PC)	
-	-	-	7	Rede de Fluxo Laminar (Microbiologia – PC)	

Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por TOC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.36. Pontos de Amostragem do Homogeneizador 200 L.

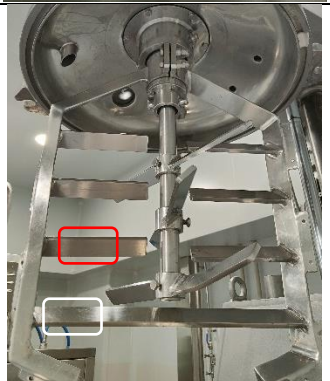
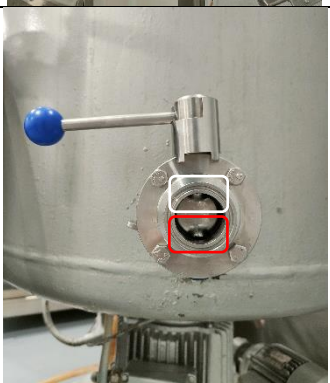
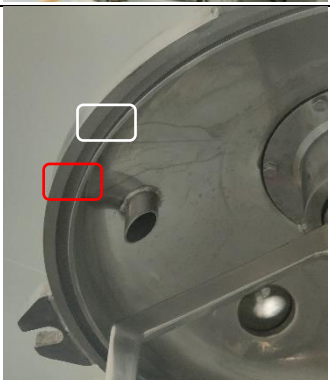
Homogeneizador Herba					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Turbina (Microbiologia – PC)		4	Parede (Microbiologia – PC)	
2	Escoamento (Microbiologia – Z)		5	Pá de Agitação (Microbiologia – PC)	
3	Fundo (Microbiologia – PC)		6	Torneira de Saída (Microbiologia – Z)	
Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia			7	Borracha (Microbiologia – Z)	

Tabela 4.37. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis.

Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Fundo (Microbiologia – PC)		4	Agitador (Microbiologia – PC)	
2	Escoamento (Microbiologia – Z)		5	Peça do conjunto de distribuição (Microbiologia – Z)	
3	Parede (Microbiologia – PC)		6	Embolo/ Doseador e Bico de Distribuição	

Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC

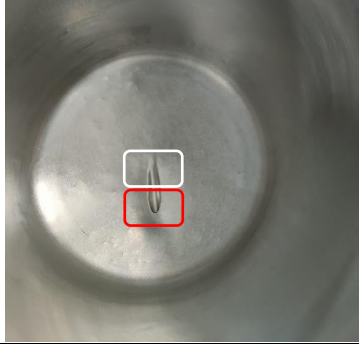
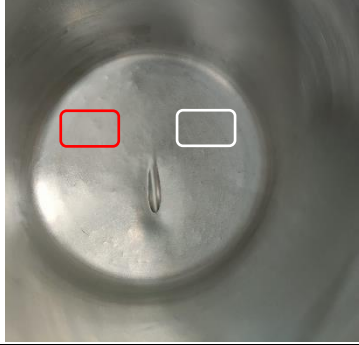
Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

As peças do ponto 6 são utilizadas apenas para amostragem com passagem de água para análise em TOC

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.38. Pontos de Amostragem do Reator 150 L.

Reator 150 L		
Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede (Microbiologia – PC)	
2	Escoamento (Microbiologia – Z)	
3	Fundo (Microbiologia – PC)	
4	Torneira de Saída (Microbiologia – Z)	

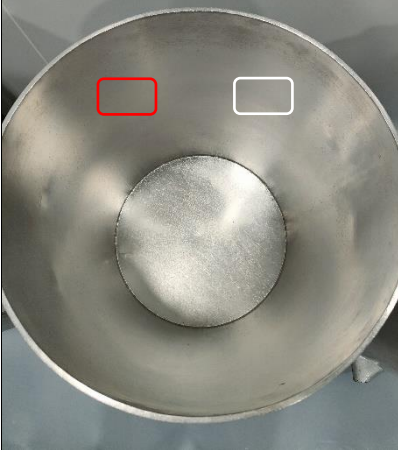
Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.39. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 100 L.

Reservatório de 100 L		
Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede do Reservatório (Microbiologia – PC)	
2	Fundo do Reservatório (Microbiologia – PC)	

Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.40. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 250 L.

Reservatórios de 250 L					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede do Reservatório (Microbiologia – PC)		4	Torneira de Saída (Microbiologia – Z)	
2	Fundo do Reservatório (Microbiologia – PC)		-	-	-
3	Tubo de Escoamento (Microbiologia – Z)		-	-	-

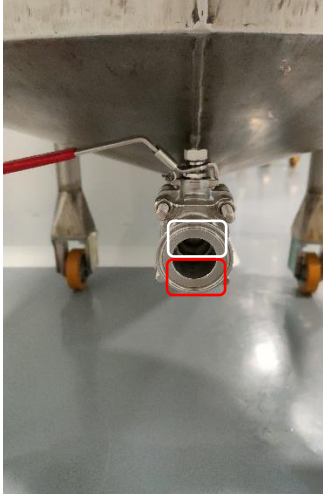
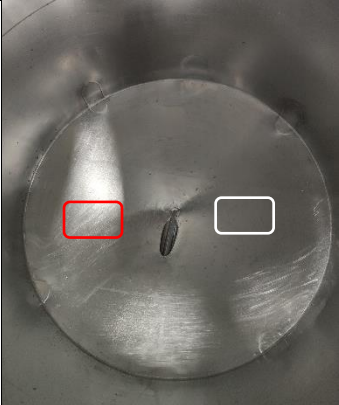
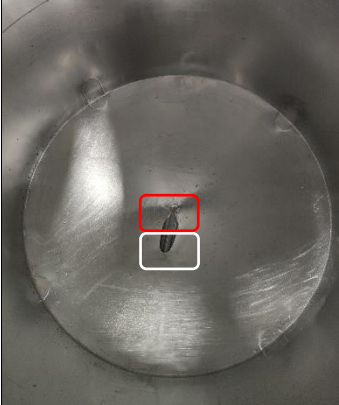
Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por TOC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.41. Pontos de Amostragem dos Reservatórios 350 L.

Reservatório de 350 L					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede do Reservatório (Microbiologia – PC)		4	Torneira de Saída (Microbiologia – Z)	
2	Fundo do Reservatório (Microbiologia – PC)		-	-	-
3	Tubo de Escoamento (Microbiologia – Z)		-	-	-

Os quadrados vermelhos indicam as zonas a amostrar para análise de resíduos de SA por HPLC

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Nos casos particulares dos equipamentos Bomba de Trasfega de Líquidos SB1 e SB2, Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini e Strunck, a sua geometria não permite amostragem com zaragoas e placas de contacto uma vez que são constituídos por mangueiras compridas ou estreitas que impedem a amostragem no seu interior, pelo que a recolha de amostras é efetuada segundo especificado nos pontos 3.4.4.2..

O Reator 2 000 L encontra-se numa situação semelhante, por ser de grandes dimensões, não é fisicamente possível proceder à amostragem do seu interior com zaragoas e placas de contacto, de maneira que, a amostragem deste equipamento também é realizada por passagem de solvente.

A Bomba de trasfega SB1 e a Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck são amostradas por passagem de água purificada para análise em TOC como especificado na validação do método analítico (3.6.1.2.). Na validação do método foi utilizado um volume de solvente correspondente à capacidade do frasco TOC, 40 mL, para cada placa inox de 100 cm². Tendo em conta a área de lavagem destes equipamentos (vide Tabela 4.32), determinou-se, através de uma proporção, que o volume de água purificada a introduzir no equipamento para realizar a amostragem deve ser cerca de 1,5 L e 0,5 L para a Bomba de Trasfega SB1 e Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck, respetivamente.

Relativamente à Bomba de Trasfega SB2 o solvente usado para a recolha de amostras para análise da substância ativa, Acetonido de Prednacinolona, em HPLC é Etanol 95% (V/V) e o volume a introduzir no equipamento é 1 L. O solvente utilizado na recolha de amostras para análise da substância ativa, Diclofenac, em HPLC, na Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini e no Reator 2 000 L é o Acetonitrilo num volume de 1 L.

Para a pesquisa microbiológica, os equipamentos referidos são amostrados com passagem de água desmineralizada estéril, como descrito no ponto 3.4.5.3.

- Apresentação de Resultados de Validação de Limpeza para os Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos

Com os limites de aceitação definidos para cada teste efetuado, os pontos e métodos de amostragem definidos, foram efetuadas recolhas de amostras após limpeza dos equipamentos. Da Tabela 4.42 a Tabela 4.51 encontram-se apresentados os resultados de validação de limpeza por equipamento.

Os valores apresentados nas seguintes tabelas, Tabela 4.42 a Tabela 4.51, foram calculados segundo a Equação 3.4 nos equipamentos onde foi realizada amostragem para Análise de Resíduos de Substância Ativa por HPLC. Quanto aos valores obtidos por TOC são apresentados os resultados fornecidos pelo equipamento (Dados Brutos) assim como os resultados provenientes do desconto do

branco. Para os equipamentos onde são efetuadas amostragens para determinação de resíduos de substância ativa por TOC, os resultados apresentados foram calculados de acordo com a Equação 3.22.

Tabela 4.42. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Agitador Duplo Cone.

Equipamento: Agitador Duplo Cone				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Diclodent (Diclofenac)		
Lote		T005	-	-
Data de Higienização		24/06/2023	-	-
Data de Amostragem		28/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e umidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	1,100	-	-
	Amostra A	1,020	-	-
	Amostra B	0,922	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-0,080	-	-
	Valor Amostra B	-0,178	-	-
Critério de Aceitação		≤76		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – HPLC (ppm)				
Pontos de Amostragem	1. Veio Central/Eixo	ND	-	-
	2. Cone Superior	ND	-	-
	3. Cone Inferior	ND	-	-
	4. Disco Central	2	-	-
Critério de Aceitação		≤3 843		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Veio Central/Eixo (Z)	<1	-	-
	2. Cone Superior (PC)	2 (1 fungo)	-	-
	3. Cone Inferior (PC)	<1	-	-
	4. Disco Central (PC)	<1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.43. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Agitador em Hélice.

Equipamento: Agitador em Hélice				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Rinerge (Cloridrato de Oximetazolina)		
Lote		T005	T006	T007
Data de Higienização		29/05/2023	29/06/2023	05/07/2023
Data de Amostragem		05/06/2023	30/06/2023	06/07/2023
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	C	C
Ausência de manchas;		C	C	C
Ausência de odores;		C	C	C
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas;		C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	C	C
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	C	C
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,214	0,359	0,144
	Amostra A	0,477	0,420	1,050
	Amostra B	0,256	0,317	0,540
Resultados	Valor Amostra A	0,263	0,061	0,906
	Valor Amostra B	0,042	-0,042	0,396
Critério de Aceitação		≤13		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – TOC (ppm)				
Pontos de Amostragem (Dados Brutos)	Branco	0,300	0,069	0,131
	1. Veio Central/Eixo	0,516	0,672	0,210
	2. A. Pá de Agitação	0,504	0,389	0,145
	3. B. Pá de Agitação	-	0,459	0,214
Resultados	1. Veio Central/Eixo	0,334	0,931	0,122
	2. A. Pá de Agitação	0,315	0,494	0,022
	3. B. Pá de Agitação	-	0,602	0,128
Critério de Aceitação		≤4 166		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	1ufc/5mL	<1	<1
	1. Veio Central/Eixo (Z)	Incontável	5	<1
	2. Pá de Agitação (PC)	<1	15	9
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.44. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Bomba de Trasfega de Líquidos SB1.

Equipamento: Bomba de Trasfega de Líquidos SB1				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Rinerge (Cloridrato de Oximetazolina)		
Lote		T007	-	-
Data de Higienização		07/07/2023	-	-
Data de Amostragem		07/07/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,093	-	-
	Amostra A	0,152	-	-
	Amostra B	0,188	-	-
Resultados	Valor Amostra A	0,091	-	-
	Valor Amostra B	0,147	-	-
Critério de Aceitação		≤27		
Pesquisa Microbiológica (UFC/mL)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	Amostra A	1/3mL	-	-
Critério de Aceitação		≤100		

Tabela 4.45. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Câmara de Pesagem.

Equipamento: Câmara de Pesagem				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Rinerge (Cloridrato de Oximetazolina)		
Lote		T006	-	-
Data de Higienização		27/06/2023	-	-
Data de Amostragem		28/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – TOC (ppm)				
Pontos de Amostragem (Dados Brutos)	Branco	4,350	-	-
	1. Balança	2,860	-	-
	2. Lamelas	3,150	-	-
	3. Bancada	2,680	-	-
	4. Parede	3,280	-	-
	5. Balança do Chão	5,530	-	-
	6. Tomada	4,130	-	-
	7. Rede de Fluxo Laminar	3,880	-	-
Resultados	1. Balança	-2,302	-	-
	2. Lamelas	-1,854	-	-
	3. A. Bancada	-2,580	-	-
	4. Parede	-1,653	-	-
	5. Balança do Chão	1,823	-	-
	6. Tomada	-0,340	-	-
	7. Rede de Fluxo Laminar	-0,726	-	-
Critério de Aceitação		≤9		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Balança (PC)	<1	-	-
	2. Lamelas (PC)	<1	-	-
	3. Bancada (PC)	<1	-	-
	4. Parede (PC)	<1	-	-
	5. Balança do Chão (PC)	1	-	-
	6. Tomada (PC)	<1	-	-
	7. Rede de Fluxo Laminar (PC)	1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.46. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador 200 L Herba.

Tabela 11-10: Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador 200 L Herba.				
Equipamento: Homogeneizador 200 L Herba				
Amostragem		1	2	3
Produto		Zotinar (Acetonido Prednacinolona)		
Lote		T001	-	-
Data de Higienização		14/06/2023	-	-
Data de Amostragem		15/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,794	-	-
	Amostra A	0,741	-	-
	Amostra B	0,931	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-0,053	-	-
	Valor Amostra B	0,137	-	-
Critério de Aceitação		≤6		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – HPLC (ppm)				
Pontos de Amostragem	1. Turbina	ND	-	-
	2. Escoamento	ND	-	-
	3. Fundo	ND	-	-
	4. Parede	ND	-	-
	5. Pá de Agitação	ND	-	-
	6. Torneira de Saída	ND	-	-
	7. Borracha	ND	-	-
Critério de Aceitação		≤43		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Turbina (PC)	6	-	-
	2. Escoamento (Z)	<1	-	-
	3. Fundo (PC)	<1	-	-
	4. Parede (PC)	<1	-	-
	5. Pá de Agitação (PC)	<1	-	-
	6. Torneira de Saída (Z)	<1	-	-
	7. Borracha (Z)	<1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.47. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini.

Equipamento: Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Dicloident (Diclofenac)		
Lote		T003	T005	-
Data de Higienização		02/06/2023	30/06/2023	-
Data de Amostragem		05/06/2023	03/07/2023	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	C	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	C	-
Ausência de manchas;		C	C	-
Ausência de odores;		C	C	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	C	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	C	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	C	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	C	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,251	3,130	-
	Amostra A	1,210	4,640	-
	Amostra B	0,840	4,200	-
Resultados	Valor Amostra A	0,959	1,510	-
	Valor Amostra B	0,589	1,070	-
Critério de Aceitação		≤46		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – HPLC (ppm)				
Amostra	Amostra A	ND	ND	-
	Amostra B	ND	ND	-
Critério de Aceitação		≤148		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Amostra	Branco	<1*	<1	-
	Amostra A	Incontável*	55	-
Critério de Aceitação		≤100		

*Amostragem não efetuada segundo protocolo

Tabela 4.48. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck.

Equipamento: Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Rinerge (Cloridrato de Oximetazolina)		
Lote		T005	T006	T007
Data de Higienização		31/05/2023	29/06/2023	10/07/2023
Data de Amostragem		05/06/2023	03/07/2023	11/07/2023
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	C	C
Ausência de manchas;		C	C	C
Ausência de odores;		C	C	C
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas;		C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	C	C
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	C	C
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,105	3,080	0,091
	Amostra A	1,680	2,820	1,160
	Amostra B	0,990	2,790	1,090
Resultados	Valor Amostra A	2,433	-0,402	1,651
	Valor Amostra B	1,367	-0,448	1,543
Critério de Aceitação		≤3 238		
Pesquisa Microbiológica (UFC/mL)				
Amostra	Branco	1ufc/3mL*	<1	<1
	Amostra A	Incontável*	2	2
Critério de Aceitação		≤100		

*Amostragem não efetuada segundo protocolo

Tabela 4.49. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis.

Equipamento: Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Zotinar (Acetonido Prednacinolona)		
Lote		T001	-	-
Data de Higienização		20/06/2023	-	-
Data de Amostragem		20/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	5,790	-	-
	Amostra A	4,200	-	-
	Amostra B	5,250	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-1,590	-	-
	Valor Amostra B	-540	-	-
Critério de Aceitação		≤4		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – HPLC (ppm)				
Pontos de Amostragem	1. Fundo	ND	-	-
	2. Escoamento	ND	-	-
	3. Parede	ND	-	-
	4. Agitador	ND	-	-
	5. Peça do conjunto de distribuição	ND	-	-
Critério de Aceitação		≤163		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Fundo (PC)	<1	-	-
	2. Escoamento (Z)	<1	-	-
	3. Parede (PC)	<1	-	-
	4. Agitador (PC)	<1	-	-
	5. Peça do conjunto de distribuição (Z)	4	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.50. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Reator 150 L.

Equipamento: Reator 150 L				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Zotinar (Acetonido Prednacinolona)		
Lote		T001	-	-
Data de Higienização		12/05/2023	-	-
Data de Amostragem		15/05/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	1,310	-	-
	Amostra A	2,370	-	-
	Amostra B	2,540	-	-
Resultados	Valor Amostra A	1,060	-	-
	Valor Amostra B	1,230	-	-
Critério de Aceitação		≤10		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – HPLC (ppm)				
Pontos de Amostragem	1. Parede	ND	-	-
	2. Escoamento	3,84	-	-
	3. Fundo	ND	-	-
	4. Torneira de Saída	ND	-	-
Critério de Aceitação		≤71		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Parede (PC)	<1	-	-
	2. Escoamento (Z)	Incontável	-	-
	3. Fundo (PC)	<1	-	-
	4. Torneira de Saída (Z)	1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.51. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Reservatório 250 L.

Equipamento: Reservatório 250 L				
Amostragem		1	2	3
Produto (SA)		Rinerge (Cloridrato de Oximetazolina)		
Lote		T007	-	-
Data de Higienização		05/07/2023	-	-
Data de Amostragem		06/07/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,819	-	-
	Amostra A	0,295	-	-
	Amostra B	0,233	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-0,524	-	-
	Valor Amostra B	-0,586	-	-
Critério de Aceitação		≤84		
Análise de Resíduos de Substância Ativa – TOC (ppm)				
Pontos de Amostragem (Dados Brutos)	Branco	0,131	-	-
	1. Parede do Reservatório	0,391	-	-
	2. Fundo do Reservatório	0,295	-	-
	3. Tubo de Escoamento	0,239	-	-
	4. Torneira de Saída	0,204	-	-
Resultados	1. Parede do Reservatório	0,402	-	-
	2. Fundo do Reservatório	0,253	-	-
	3. Tubo de Escoamento	0,167	-	-
	4. Torneira de Saída	0,113	-	-
Critério de Aceitação		≤206		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Parede do Reservatório (PC)	26	-	-
	2. Fundo do Reservatório (PC)	2	-	-
	3. Tubo de Escoamento (Z)	Incontável	-	-
	4. Torneira de Saída (Z)	33	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

4.3.1.1 Conclusões da Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos

Na Tabela 4.52, apresenta-se um resumo dos resultados de validação de limpeza em equipamentos utilizados na produção de medicamentos.

Tabela 4.52. Resumo dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos. (Parte 1/2)

Equipamentos	Amostragens	Inspeção Visual	TOC	Substância Ativa	Microbiologia
		C/NC	C/NC	C/NC	C/NC
Agitador Duplo Cone	Amostragem 1	C	C	C	C
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Agitador em Hélice	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	C	C	C	C
	Amostragem 3	C	C	C	C
Bomba de Trasfega de Líquidos SB1	Amostragem 1	C	-	C	C
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Câmara de Pesagem	Amostragem 1	C	-	C	C
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Homogeneizador 200 L Herba	Amostragem 1	C	C	C	C
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	C	C	C	C
	Amostragem 3	-	-	-	-
Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	C	C	C	C
	Amostragem 3	C	C	C	C
Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis	Amostragem 1	C	NC	C	C
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Reator 150 L	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-

Tabela 4.52. Resumo dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Medicamentos. (Parte 2/2)

Reservatórios 250 L	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-

O resultado da inspeção visual dos equipamentos mostrou-se sempre conforme como tal não poderia deixar de ser, uma vez que, caso algum dos critérios avaliados não estivesse conforme impossibilitaria o prosseguimento das amostragens e conduziria à necessidade de nova higienização do equipamento e/ou da área de trabalho.

Em algumas das amostragens para análise de resíduos em TOC, o valor do branco mostrou-se superior ao valor das amostras, o que culmina num resultado negativo. O TOC é um equipamento muito sensível e cujos resultados são afetados pela existência de bolhas de ar nas amostras. Nestas amostragens, a água purificada (5L) é transportada num recipiente grande e parte é passada para um recipiente mais pequeno do qual são retiradas as amostras do branco, uma vez que os frascos não podem ser mergulhados na água de amostragem. Assim, devido a estas passagens a água não se encontra totalmente parada na altura da amostragem e é possível que a água incorpore algumas bolhas de ar que afetarão os resultados.

No entanto, como todos os valores das amostras, incluindo o branco, se encontram dentro dos limites definidos no critério de aceitação, tomam-se estes resultados como conformes. Ainda assim, é importante salientar que a água usada na recolha de amostragens para TOC esteja parada de forma a minimizar o ar incorporado nas mesmas.

A única exceção ocorreu na Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis, cujos valores de TOC de todas as amostras, incluindo o branco, deram superiores ao critério de aceitação. Estes resultados podem ser devidos à contaminação das amostras, uma vez que a amostragem se realizou na sala de lavagens do setor. Adicionalmente, como as amostragens para análise de resíduos de substância ativa em HPLC estavam, não só dentro do limite de aceitação, como não foi detetado num vestígio da SA, os valores elevados de TOC podem dever-se a resíduos de agentes de limpeza. Assim, considera-se o resultado desta amostragem como não conforme e a recolha de amostras deve, não só ser efetuada num local limpo livre de possíveis interferências, como se deve assegurar o enxaguamento suficiente do equipamento após a sua higienização.

Relativamente às amostras analisadas em HPLC para determinação de resíduos de SA, todos se mostraram conformes, não tendo sido detetados valores de SA superiores ao critério de aceitação em nenhum equipamento.

Quanto à análise microbiológica, o Agitador em Hélice apresentou um resultado incontável no ponto de amostragem nº 1 o veio central. Após colaboração das operadoras do setor, averiguou-se que o transporte do agitador da sala de lavagens para a sala onde normalmente é usado se fazia, algumas vezes, recorrendo ao auxílio do veio central do mesmo, permitindo o contacto desta parte do equipamento com as luvas do operador o que pode ter sido a origem da contaminação verificada. Por forma a colmatar esta ocorrência, optou-se por especificar na instrução de limpeza deste agitador e, de maneira a prevenir situações semelhantes, também no Agitador Duplo Cone, que o saco de polietileno utilizado para acondicionar o agitador após higienização deve cobrir não só a hélice do mesmo como também toda a extensão do veio central.

Nas Máquinas de Enchimento de Líquidos, tanto a Marchesini como a Strunck, verificou-se uma não conformidade na primeira amostragem devido a um resultado incontável da água de lavagem. Por lapso, esta amostragem foi realizada com água purificada ao invés de água desmineralizada estéril como especificado no protocolo de validação para este método de amostragem. No entanto, apesar de a contagem na amostragem ter sido elevada, o valor do branco mostrou-se conforme o que pode sugerir que a elevada contagem não se deva exclusivamente à água utilizada na amostragem, mas também ao estado de limpeza do equipamento. Como nas seguintes amostragens realizadas com água desmineralizada estéril a contagem microbiológica se encontra dentro dos níveis aceitáveis para este critério para ambos os equipamentos esta amostragem deverá ser excluída do relatório de validação, sendo efetuada nova amostragem com o solvente adequado por forma a melhor concluir sobre a eficácia da higienização.

Também o Reator 150 L e o Reservatório 250 L apresentaram não conformidades na contagem microbiológica num dos pontos amostrados. Verifica-se que estes pontos de amostragem, ponto nº 2 do Reator 150 L e ponto nº 3 do Reservatório 250 L, correspondem ao tudo de escoamento dos equipamentos. Este local é de difícil acesso por parte das colaboradoras tornando a sua correta higienização um trabalho árduo, pelo que é um ponto de amostragem propenso ao crescimento de microrganismos. De forma a colmatar a dificuldade de limpeza e promover a adequada higienização do local alterou-se a instrução de limpeza dos equipamentos. A alteração consiste na utilização de um esfregão com um cabo (previamente higienizado com lixívia) contendo lixívia e que deverá ser passado em toda a extensão do tubo de escoamento até à torneira de saída antes do último enxaguamento com água purificada abundante para eliminar os resíduos de lixívia.

Com as alterações introduzidas espera-se um melhoramento dos resultados obtidos nas amostragens dos equipamentos de modo que seja possível obter resultados conformes para finalizar a validação de limpeza dos equipamentos.

4.3.2 Apresentação dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos

- Seleção dos Produtos Pior-Caso e Cálculo dos Limites de Aceitação

A seleção do produto pior-caso A para cada equipamento é realizada de maneira diferente uma vez que os produtos produzidos nestes equipamentos não possuem substância ativa. Desta forma, a determinação do produto pior-caso A deveria ser baseada numa análise de risco tendo em conta a dificuldade de limpeza de cada produto produzido nos equipamentos. No entanto, como o fabrico dos produtos da marca Barral é recente no setor não existem ainda dados históricos extensos sobre estes parâmetros para todos os produtos. A alteração do local de produção antigo para os Laboratórios Atral processa-se de modo gradual, pelo que nem todos os produtos a virem ser produzidos estão atualmente a sê-lo.

Até à data da elaboração desta dissertação, o produto que apresentou mais dificuldades de limpeza reportadas pelas operadoras do setor foi o Creme Gordo, no entanto, atualmente, o seu fabrico encontra-se parado e não foi definida uma estratégia de limpeza eficaz.

Adicionalmente, para além de assegurar a produção dos produtos da marca Barral, os Laboratórios Atral estão também a desenvolver novos produtos a serem lançados em nome da marca.

Desta maneira, a seleção do produto pior-caso através desta abordagem é dificultada. Assim, optou-se por proceder à amostragem dos equipamentos após produção, e respetiva higienização, de todos os produtos da marca de Barral, por forma a recolher dados sobre a dificuldade de limpeza de cada produto bem como da sua eficácia.

O pior-caso B também não é identificado pela menor dimensão de lote dos produtos produzidos no equipamento, uma vez que, como muitos produtos são experimentais ou se encontram em fase de testes de produção, não têm a dimensão de lote firmemente estabelecida. Desta forma, foi tomado como dimensão mínima de lote pior-caso a capacidade do equipamento, caso este seja de pequenas dimensões uma vez que não se prevê alguma vez a produção de lotes mais pequenos, ou a capacidade mínima de trabalho de certos equipamentos utilizados na produção de cada produto, cujas dimensões sejam grandes.

Tendo identificados o produto pior-caso para cada equipamento é possível proceder ao cálculo dos limites de aceitação para os testes relativos à análise de compostos orgânicos e à análise de compostos iónicos. Na Tabela 4.53. encontra-se resumida a informação necessária ao cálculo dos limites analíticos para cada equipamento utilizado na produção exclusiva de dermocosméticos.

Tabela 4.53. Dados para o Cálculo do Limite Analítico para os Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos.

Equipamento	LRA (ppm)	DL	SCEP (cm²)	LRS (µg/cm²)	ASL (cm²)	VS (mL)	LA (ppm)
Homogeneizador 300 L Turbomek	10	300 kg	89 234	33,62	13 737,8	5 000	31
Homogeneizador Melter	10	167 kg	87 890,18	19,00	6 096,65	5 000	8
Homogeneizador Turbofix	10	650 kg	176 514,08	36,82	11 209,6	5 000	28
Máquina de Enchimento Bisnagas Axomatic	10	300 kg	9 006,8	333,1	2 227,4	5 000	50
Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock	10	300 kg	10 722,26	279,79	2 184,5	5 000	41
Máquina Doseadora Jolly	10	300 kg	6 536,1	459	1 511,1	5 000	46
Reservatórios 150L	10	150 kg	16 193,34	92,63	2 654,18	5 000	16
Reservatórios 350L	10	350 kg	31 557,3	110,91	4 272,57	5 000	32

- Determinação dos Locais e Métodos de Amostragem

A seleção dos locais de amostragem processa-se de igual modo ao já estabelecido para os equipamentos utilizados exclusivamente na produção de medicamentos.

Como não são usados métodos específicos na análise das amostras destes equipamentos, não são efetuadas zaragatoas para recolha de amostras para HLPC ou TOC, sendo estas apenas utilizadas na pesquisa microbiológica quando não é possível o uso de placas de contacto. Nos equipamentos que não conseguem ser sujeitos a amostragem com zaragatoas e placas de contacto para microbiologia esta é efetuada por passagem de água desmineralizada estéril.

Para a recolha de amostras para análise de resíduos de compostos orgânicos e de resíduos de substâncias iónicas, a recolha de amostras é efetuada por passagem de água purificada segundo especificado em 3.4.2 e 3.4.3, respetivamente.

Da Tabela 4.54. à Tabela 4.59. estão apresentados os locais e métodos de amostragem utilizados no processo de validação de limpeza de cada equipamento utilizado na produção de dermocosméticos.

Nos casos particulares dos Homogeneizadores Melter e Tubofix, por serem de grandes dimensões a sua geometria não permite amostragem com zaragatoas e placas de contacto de maneira que, a amostragem destes equipamentos é realizada por passagem de água purificada para análise em TOC e Condutividade e passagem de água desmineralizada estéril para pesquisa microbiológica.

- Apresentação de Resultados de Validação de Limpeza para os Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos

Com os limites de aceitação definidos para cada teste efetuado, os pontos e métodos de amostragem definidos, foram efetuadas recolhas de amostras após limpeza dos equipamentos. Da Tabela 4.60. à Tabela 4.63. estão apresentados os resultados de validação de limpeza por equipamento.

Tabela 4.54. Pontos de Amostragem do Homogeneizador 300 L Tubomek.

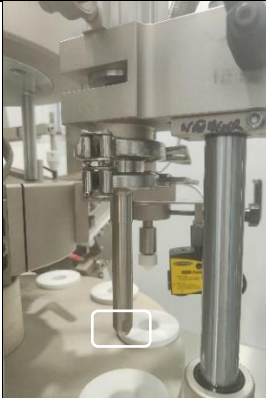
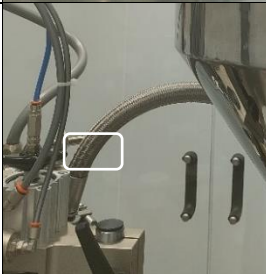
Homogeneizador Tubomek					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Tampa do Homogeneizador (Microbiologia – PC)		4	Parede Interna do Homogeneizador (Microbiologia – PC)	
2	Pá de Agitação (Microbiologia – PC)		-	-	-
3	Pá de Arrasto (Microbiologia – PC)		-	-	-

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.55. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Bisnagas Axomatic.

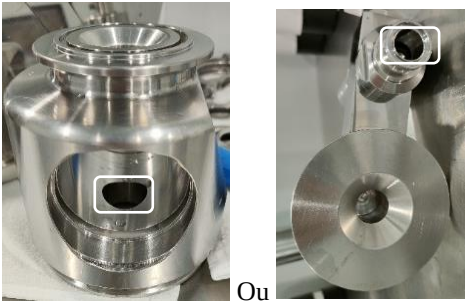
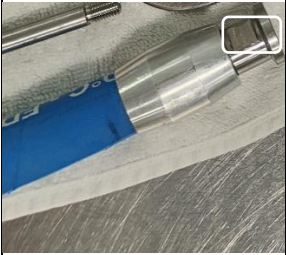
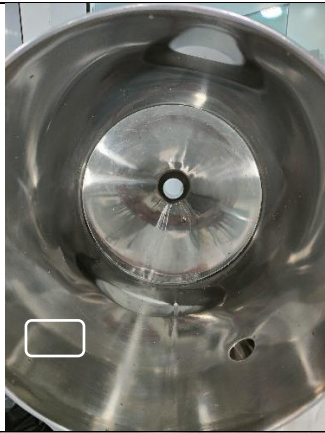
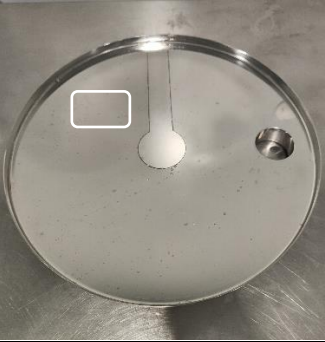
Máquina de Enchimento de Bisnagas Axomatic					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Interior Agu- lha de Enchi- mento (Microbiologia – Z)		5	Interior da Co- nexão do Tubo ao Depósito (Microbiologia – Z)	
2	Agitador Espi- ral (Microbiologia – PC)		6	Interior da Tampa (Microbiologia – PC)	
3	Interior do De- pósito (Microbiologia – PC)		-	-	-
4	Interior Tubo (Microbiologia – Z)		-	-	-

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.56. Pontos de Amostragem da Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock.

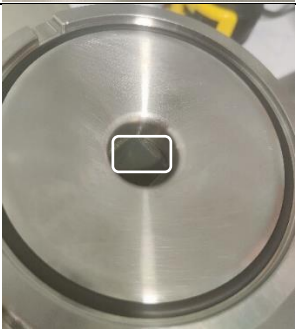
Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Injetor de Dosagem (Microbiologia – Z)		5	Interior da Conexão da Agulha ao Depósito (Microbiologia – Z)	 Ou
2	Mangueira de Conexão (Microbiologia – Z)		6	Interior do Depósito (Microbiologia – PC)	
3	Peça de Conexão (Microbiologia – Z)		7	Interior da Tampa (Microbiologia – PC)	
4	Interior Tubo (Microbiologia – Z)		-	-	-

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.57. Pontos de Amostragem da Máquina Doseadora Jolly.

Máquina de Doseadora Jolly		
Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Interior Agulha de Enchimento (Microbiologia – Z)	
2	Interior da Conexão da Agulha ao Depósito (Microbiologia – Z)	
3	Interior do Depósito (Microbiologia – PC)	
4	Interior da Tampa (Microbiologia – PC)	

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.58. Pontos de Amostragem dos Reservatório 150 L.

Reservatório 150 L		
Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede do Reservatório (Microbiologia – PC)	
2	Fundo do Reservatório (Microbiologia – PC)	

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.59. Pontos de Amostragem dos Reservatório 350 L.

Reservatório 350 L					
Ponto nº	Designação	Local da amostragem	Ponto nº	Designação	Local da amostragem
1	Parede do Reservatório (Microbiologia – PC)		4	Tubo de Escoamento (Microbiologia – Z)	
2	Fundo do Reservatório (Microbiologia – PC)		5	Torneira de Saída (Microbiologia – Z)	
3	Interior da Tampa (Microbiologia – PC)		-	-	-

Os quadrados brancos indicam as zonas a amostrar para pesquisa microbiológica

Z- Amostragem por zaragatoa para microbiologia

PC- Amostragem por placa de contacto para microbiologia

Tabela 4.60. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock.

Equipamento: Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock				
Amostragem		1	2	3
Produto		Creme Hidratante	Gel Íntimo – Prevenção	Gel Íntimo – Conforto
Lote		T001	T001	T001
Data de Higienização		16/06/2023	29/06/2023	06/07/2023
Data de Amostragem		19/06/2023	30/06/2023	07/07/2023
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	C	C
Ausência de manchas;		C	C	C
Ausência de odores;		C	C	C
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas;		C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	C	C
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	C	C
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,381	0,601	0,418
	Amostra A	0,852	0,504	0,168
	Amostra B	0,798	0,636	0,213
Resultados	Valor Amostra A	0,471	-0,097	-0,250
	Valor Amostra B	0,417	0,035	-0,205
Critério de Aceitação		≤41		
Análise de Resíduos de Substâncias iônicas – Condutividade (µS/cm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,831	0,783	0,912
	Amostra A	0,884	0,821	0,989
	Amostra B	0,849	0,797	1,054
Resultados	Valor Amostra A	0,053	0,038	0,077
	Valor Amostra B	0,018	0,014	0,142
Critério de Aceitação		≤4,3		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	<1	<1
	1. Injetor de Dosagem (Z)	<1	<1	<1
	2. Mangueira de Conexão (Z)	<1	6	<1
	3. Peça de Conexão (Z)	<1	<1	<1
	4. Interior do Tubo (Z)	<1	<1	4
	5. Interior da Conexão da Agulha ao Depósito (Z)	<1	Incontável	<1
	6. Interior do Depósito (PC)	6	-	-
	7. Interior da Tampa (PC)	<1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.61. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza da Máquina Doseadora Jolly.

Equipamento: Máquina Doseadora Jolly				
Amostragem		1	2	3
Produto		Gel Íntimo – Prevenção	-	-
Lote		T001	-	-
Data de Higienização		29/06/2023	-	-
Data de Amostragem		30/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	3,790	-	-
	Amostra A	1,840	-	-
	Amostra B	2,480	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-1,950	-	-
	Valor Amostra B	-1,310	-	-
Critério de Aceitação		≤46		
Análise de Resíduos de Substâncias iônicas – Condutividade (µS/cm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	1,165	-	-
	Amostra A	0,871	-	-
	Amostra B	0,930	-	-
Resultados	Valor Amostra A	-0,294	-	-
	Valor Amostra B	-0,235	-	-
Critério de Aceitação		≤4,3		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Pontos de Amostragem	Branco	<1	-	-
	1. Interior Agulha de Enchimento (Z)	Incontável	-	-
	2. Interior Tubo de Conexão ao Depósito (Z)	1	-	-
	3. Interior do Depósito (PC)	<1	-	-
	4. Interior da Tampa (PC)	<1	-	-
Critério de Aceitação		≤50		

Tabela 4.62. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador Melter.

Equipamento: Homogeneizador Melter				
Amostragem		1	2	3
Produto		Creme Hydra+	-	-
Lote		T003	-	-
Data de Higienização		19/06/2023	-	-
Data de Amostragem		29/06/2023	-	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	-	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	-	-
Ausência de manchas;		C	-	-
Ausência de odores;		C	-	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	-	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	-	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	-	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	-	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,088	-	-
	Amostra A	1,400	-	-
	Amostra B	1,930	-	-
Resultados	Valor Amostra A	1,312	-	-
	Valor Amostra B	1,842	-	-
Critério de Aceitação		≤8		
Análise de Resíduos de Substâncias iônicas – Condutividade (µS/cm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,677	-	-
	Amostra A	1,169	-	-
	Amostra B	1,275	-	-
Resultados	Valor Amostra A	0,492	-	-
	Valor Amostra B	0,598	-	-
Critério de Aceitação		≤4,3		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Amostra	Branco	<1	-	-
	Amostra A	Incontável	-	-
Critério de Aceitação		≤100		

Tabela 4.63. Resultados da Amostragem para Validação de Limpeza do Homogeneizador Turbofix.

Equipamento: Homogeneizador Turbofix				
Amostragem		1	2	3
Produto		Gél Íntimo – Prevenção	Gél Íntimo – Conforto	-
Lote		T001	T001	-
Data de Higienização		29/06/2023	06/07/2023	-
Data de Amostragem		29/06/2023	07/07/2023	-
Inspeção Visual				
Critérios Avaliados		C/NC		
Componentes desmontados, lavados e secos;		C	C	-
Ausência de resíduos de pó em toda a área, soldaduras, rebordos e sulcos;		C	C	-
Ausência de manchas;		C	C	-
Ausência de odores;		C	C	-
Área de trabalho limpa e arrumada;		C	C	-
Ausência de escoriações mecânicas;		C	C	-
Ausência de fibras, borracha ou tecidos;		C	C	-
Ausência de dedadas, restos de gordura e humidade.		C	C	-
Critério de Aceitação		C		
Análise de Resíduos de Compostos Orgânicos – TOC (ppm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,130	0,275	-
	Amostra A	3,750	6,350	-
	Amostra B	4,560	3,210	-
Resultados	Valor Amostra A	3,620	6,075	-
	Valor Amostra B	4,430	2,935	-
Critério de Aceitação		≤28		
Análise de Resíduos de Substâncias iônicas – Condutividade (µS/cm)				
Amostra (Dados Brutos)	Branco	0,742	0,665	-
	Amostra A	1,294	1,224	-
	Amostra B	1,209	1,476	-
Resultados	Valor Amostra A	0,552	0,559	-
	Valor Amostra B	0,467	0,811	-
Critério de Aceitação		≤4,3		
Pesquisa Microbiológica (UFC)				
Amostra	Branco	<1	<1	-
	Amostra A	Incontável	Incontável	-
Critério de Aceitação		≤100		

4.3.2.1 Conclusões da Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos

Na Tabela 4.64, apresenta-se um resumo dos resultados de validação de limpeza em equipamentos utilizados na produção de dermocosméticos.

Tabela 4.64. Resumo dos Resultados de Validação de Limpeza em Equipamentos Utilizados na Produção de Dermocosméticos.

Equipamentos	Amostragens	Inspeção Visual	TOC	Condutividade	Microbiologia
		C/NC	C/NC	C/NC	C/NC
Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock	Amostragem 1	C	C	C	C
	Amostragem 2	C	C	C	NC
	Amostragem 3	C	C	C	C
Máquina Doseadora Jolly	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Homogeneizador Melter	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	-	-	-	-
	Amostragem 3	-	-	-	-
Homogeneizador Turbofix	Amostragem 1	C	C	C	NC
	Amostragem 2	C	C	C	NC
	Amostragem 3	-	-	-	-

Como já verificado nos resultados para os equipamentos de produção de medicamentos, também na Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock e na Máquina Doseadora Jolly, alguns valores correspondentes ao branco de TOC e Condutividade foram superiores aos valores das amostras o que culminou em resultados finais negativos. Novamente, esta incoerência deve-se ao modo de amostragem dos brancos que envolve água menos parada e com mais incorporação de ar o que pode afetar os resultados. No entanto, todos os valores amostrados, mesmo sem descontar o valor do branco, se encontram muito abaixo do limite do critério de aceitação, pelo que se consideram conformes as amostragens.

Relativamente aos ensaios microbiológicos, as Máquinas de Enchimento de Cremes Axoblock e Doseadora Jolly mostraram-se não conformes, tendo apresentado níveis microbiológicos incontáveis numa das amostragens. Tendo em conta os restantes resultados para os vários pontos de amostragem e outras amostragens, conclui-se que a higienização de locais mais recônditos pode ser imprevisível. Por forma a eliminar essa variabilidade e a higienizar os equipamentos mais eficazmente foi proposta uma

alteração à instrução de limpeza dos equipamentos em questão. A alteração consiste na utilização de um esfregão com um cabo (previamente higienizado com lixívia) contendo lixívia e que deverá ser passado em todas as peças com espaços de abertura estreita que não consigam ser acedidos e esfregados de outra maneira, antes do último enxaguamento com água purificada abundante para eliminar os resíduos de lixívia.

Já para os Homogeneizadores Melter e Turbofix, todas as amostragens efetuadas apresentam-se não conformes do ponto de vista microbiológico. Aquando da amostragem, a sua higienização é feita de modo manual recorrendo a uma mangueira e detergente “Joel”. Por um lado, estes homogeneizadores são de grandes dimensões pelo que dificultam a sua lavagem uma vez que para serem esfregados exigem a utilização de um cabo extensível que não atinge a totalidade do interior do reator deixando muitos locais por esfregar. Por outro, os homogeneizadores são utilizados exclusivamente para a produção de cremes muito suscetíveis de contaminação. Estas situações conjuntamente podem levar a condições favoráveis para proliferação de microrganismos, que, sem a ação de um desinfetante, se tornam de difícil remoção.

Uma das soluções para o combate à proliferação de microrganismos e muito usado na esterilização de equipamentos na indústria médica, alimentar, farmacêutica, cosmética e no tratamento de águas residuais tem sido o uso de ácido peracético (PAA), tendo demonstrado boas propriedades antimicrobianas [76, 77].

É considerado como um bom desinfetante devido à eficácia contra a maioria dos microrganismos e esporos bacterianos [75]. Devido às suas propriedades altamente oxidantes é eficaz na eliminação de bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp* e *Salmonella spp* e vírus [76]. A sua composição consiste numa mistura de ácido acético (3 a 40%) e peróxido de hidrogénio (10 a 40%) em solução aquosa [78]. Tem-se mostrado uma excelente alternativa a desinfetantes à base de cloro devido à sua elevada reatividade e à natureza não tóxica da sua decomposição [76, 77]. É solúvel em água e completamente biodegradável, a sua decomposição origina ácido acético e oxigénio molecular [77, 79]. No entanto, em concentrações elevadas é corrosivo, irritante para a pele e olhos e pode ter um cheiro desagradável semelhante ao do vinagre [79, 80]. É adequado para aplicações em CIP [77].

Nos Laboratórios Atral é utilizado o desinfetante Hydrex 4203 de ácido peracético na sanitização das canalizações e filtros de água. Assim, foi decidida a sua incorporação no procedimento de lavagem destes homogeneizadores. A sua utilização mais comum através de um equipamento CIP onde a sua concentração deverá cerca de 1 500 mg/L [81]. No entanto, uma vez que a unidade CIP dos Laboratórios Atral não se encontra ainda em funcionamento para lavagem destes homogeneizadores, optou-se pela introdução manual deste desinfetante mantendo a proporção dentro do corpo do homogeneizador.

Assim, a alteração proposta à instrução de utilização destes homogeneizadores é a adição deste desinfetante antes do último enxaguamento com água purificada. Deste modo, devem ser adicionados cerca de 3 kg de Hydrex 4203 ao Homogeneizador Turbofix de capacidade máxima 2 000 L e cerca de 1,5 kg ao Homogeneizador Melter cuja capacidade máxima é 1 000 L.

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

A revisão e cálculo dos valores de PDE para humanos das substâncias ativas foram efetuados com sucesso e resultaram nos seguintes valores: Metocarbamol 320 mg/dia, Minociclina 812 mg/dia, Ceftriaxona 2,5 mg/dia, Penicilina G Benzatínica 9,43 mg/dia, Cloridrato de Glucosamina 2 130 mg/dia, Cefotaxima 25 mg/dia, Cetoconazol 50 mg/dia, Penicilina G Sódica 0,417 mg/dia, Penicilina G Procaína 23,81 mg/dia e Cefadroxil 5 mg/dia. Com os resultados obtidos é possível a atualização, caso necessária, dos produtos pior-caso A em cada equipamento dos diversos setores nos quais são produzidos os medicamentos compostos por estas substâncias ativas de forma a melhor prevenir a contaminação cruzada assegurando a segurança do consumidor.

Para as substâncias Metocarbamol e Minociclina foi adicionalmente calculado o valor do PDE para animais tendo-se obtido os valores 6,4 mg/dia e 16,24 mg/dia, respetivamente. Estes valores são importantes uma vez que ambas as substâncias contactam com equipamentos utilizados no fabrico de produtos veterinários e, deste modo, é importante garantir que o produto a ser administrado em animais não contém resíduos de outros produtos que possam ser prejudiciais à saúde dos mesmos.

A validação do método analítico TOC para determinação de Oximetazolina Cloridrato foi realizada para dois métodos de amostragem, com zaragatoa (swab) e passagem de solvente (água purificada). O método não demonstrou a linearidade necessária na gama de validação 50%LA a 200%LA ($r < 0,995$), pelo que a gama foi reduzida para 40%LA a 120%LA tendo demonstrado linearidade adequada dado que o coeficiente de correlação obtido foi 0,996 ($> 0,995$).

Ambos os métodos de amostragem demonstraram bons resultados de recuperação, em média, de 63,92% para amostragem com swab e de 80,94% para amostragem com passagem de água purificada. A validação deste método permite a análise desta substância ativa quando é considerada a substância pior-caso A, apenas nos casos em que a superfície de amostragem do equipamento é aço inoxidável, o que sucede no Agitador em Hélice, Bomba de Tráfego de Líquidos SB1, Câmara de Pesagem,

Reservatório 250 L e Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck. Assim, esta validação permite a análise da Oximetazolina Cloridrato de modo a averiguar e prevenir contaminação cruzada noutros produtos fabricados posteriormente no mesmo equipamento.

Relativamente às validações de limpeza foram realizadas amostragens em diversos equipamentos envolvidos na produção de medicamentos e dermocosméticos, os quais, o Agitador Duplo Cone, Agitador em Hélice, Bomba de Tráfego de Líquidos SB1, Câmara de Pesagem, Homogeneizador 200 L Herba, Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini e Strunck, Máquina de Enchimento de Cremes Comadis, Reator 150 L, Reservatório 250 L, Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock, Máquina Doseadora Jolly, Homogeneizador Melter e Turbofix. Devido ao plano de produção não foi possível a amostragem dos restantes equipamentos do setor.

Para dar por concluída uma validação de limpeza, têm de ser obtidos três resultados conformes em todos os parâmetros avaliados. Apenas foi possível realizar 3 amostragens no Agitador em Hélice, Máquina de Enchimento de Líquidos Strunck e Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock. No entanto, a pesquisa microbiológica nestes equipamentos resultou em valores não conformes numa das amostragens. Também a Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini, o Reator 150 L, o Reservatório 250 L, a Máquina Doseadora Jolly, o Homogeneizador Melter e o Turbofix tiveram resultados microbiológicos não conformes.

Perante esses resultados, foram propostas alterações às instruções de limpeza utilizadas. Nomeadamente, no Agitador em Hélice foi especificado que o saco de polietileno deverá cobrir não só as pás do agitador como também todo o veio central por forma a evitar contaminações aquando da mudança de sala do equipamento, o que resultou na obtenção de resultados microbiológicos conformes nas amostragens posteriores.

As Máquinas de Enchimento de Líquidos foram amostradas pela primeira vez recorrendo a água purificada ao invés de água desmineralizada estéril tendo essa amostragem resultado em valores não conformes, no entanto, as restantes amostragens realizadas segundo o protocolo de validação obtiveram resultados conformes em ambos os equipamentos.

Para os equipamentos onde a contaminação foi elevada em locais de difícil acesso como tubos, nomeadamente a Máquina de Enchimento de Cremes Axoblock, Reator 150 L, Reservatório 250 L e Máquina Doseadora Jolly, foi proposto a lavagem destes locais com um esfregão embebido em solução de lixívia, cuja eficácia não foi possível averiguar pois não foram efetuadas mais amostragens na maioria destes equipamentos. Foi efetuada nova amostragem ao Reservatório de 250 L, cujos resultados não estavam prontos à data do término desta dissertação.

Quanto aos Homogeneizadores Melter e Turbofix foi também proposto a adição de uma etapa no processo de limpeza com Hydrex 4203, um PAA com elevadas propriedades desinfetantes, de modo a controlar os resultados microbiológicos dentro dos critérios de aceitação, no entanto, não foi possível averiguar o impacto desta alteração pois não foram efetuadas mais amostragens nestes equipamentos.

Apenas um resultado de análise de compostos orgânicos em TOC foi considerado como não conforme na Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis, tendo sido proposto um melhor enxaguamento do equipamento de modo a eliminar resíduos de agentes contaminantes como agentes de limpeza. Foi efetuada nova amostragem a este equipamento, cujos resultados não se encontravam prontos à data de término desta dissertação.

Em conclusão, os valores de PDE das substâncias ativas utilizadas nos diversos setores dos Laboratórios Atral foram revistos e calculados e o método analítico para determinação de resíduos de Clo-ridrato de Oximetazolina foi validado com sucesso para dois métodos de amostragem. Foram elaboradas as instruções de limpeza de 6 dos 8 equipamentos recentemente adquiridos para o setor FLP bem como elaborados os protocolos de validação de limpeza para todos os 8 equipamentos, tendo sido também revistos e atualizados os protocolos de validação de limpeza dos outros 13 equipamentos já existentes no setor. Através dos resultados provenientes da amostragem dos equipamentos no setor FLP, foram propostas diversas alterações às instruções de limpeza para que sejam mais robustas e demonstrem consistentemente resultados dentro dos critérios de aceitação determinados. Adicionalmente, foi também elaborado o plano de monitorização de limpeza para todos os equipamentos presentes no setor FLP, a ser efetuado recorrendo a amostragens para análise TOC e microbiológica.

No entanto, terminada esta dissertação existem ainda várias amostragens a serem efetuadas futuramente por forma a terminar a validação de limpeza dos equipamentos do setor assim como outros pontos a complementar, dos quais:

- Avaliar os resultados obtidos das amostragens ao Reservatório 250 L e Máquina de Enchimento de Pomadas Comadis, por forma a avaliar se as alterações introduzidas conduzem ao resultado esperado;
- Repetir a amostragem microbiológica à Máquina de Enchimento de Líquidos Marchesini e Strunck utilizando água desmineralizada estéril;
- Efetuar as amostragens em falta para os equipamentos com apenas uma ou duas amostragens realizadas;

- Verificar, através da realização de mais amostragens, se as alterações introduzidas são suficientes para tornar o processo de limpeza dos equipamentos mais robusto e proporcionar a obtenção consistente de resultados dentro dos critérios de aceitação;
- Efetuar a validação de limpeza dos equipamentos em que não foi possível iniciar a recolha de amostras para o processo de validação;
- Introdução e desenvolvimento de métodos de limpeza automáticos com o equipamento CIP, também recentemente adquirido no setor FLP;
- Podem ainda ser validados novos métodos analíticos por TOC para determinação de outras substâncias ativas manuseadas no setor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] «Quem somos - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/quem-somos/>
- [2] «Atral no Mundo - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/atral-no-mundo/>
- [3] «Novo acionista - Grupo Medifarma - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/noticias/novo-acionista-grupo-medifarma/>
- [4] «Barral passa a ser detida pelos Laboratórios Atral», Netfarma. Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.netfarma.pt/barral-passa-a-ser-detida-pelos-laboratorios-atral/>
- [5] «Unidade Geral - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/producao/unidade-geral/>
- [6] «Unidade de Penicilinas - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/producao/unidade-penicilinas/>
- [7] «Unidade de Cefalosporinas - Laboratórios ATRAL». Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.atral.pt/producao/unidades-de-cefalosporinas/>
- [8] O. Karnieli, «Chapter 6 - Bioreactors and Downstream Processing for Stem Cell Manufacturing», em *Stem Cell Manufacturing*, J. M. S. Cabral, C. Lobato de Silva, L. G. Chase, e M. Margarida Diogo, Eds., Boston: Elsevier, 2016, pp. 141–160. doi: 10.1016/B978-0-444-63265-4.00006-6.
- [9] European Medicines Agency, «Good manufacturing practice», European Medicines Agency. Acedido: 24 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice>
- [10] A. Jain, P. Mane-Kolpe, P. Parekar, A. Todkari, K. Sul, e S. Shivpuje, «Brief review on Total Quality Management in Pharmaceutical Industries», vol. 7, pp. 1030–1037, dez. 2022, doi: 10.35629/7781-070510301037.
- [11] International Society for Pharmaceutical Engineering, «ISPE Guide: Cleaning Validation Lifecycle – Applications, Methods, and Controls», 2020.

- [12] European Medicines Agency, «Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions», nov. 2016, [Em linha]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf
- [13] CSI, «Clean-in-place: 5 Steps in a Common Food, Dairy, and Beverage CIP...», Central States Industrial. Acedido: 4 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.csidesigns.com/blog/articles/5-steps-in-a-common-food-dairy-beverage-clean-in-place-cycle>
- [14] M. Sfakianakis, «The Benefits of Using an Alkaline Detergent», Eazychem. Acedido: 20 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.eazychem.co.uk/benefits-using-alkaline-detergent/>
- [15] J. Tan, D. Wang, H. Cao, Y. Qiao, H. Zhu, e X. Liu, «Effect of Local Alkaline Micro-environment on the Behaviors of Bacteria and Osteogenic Cells», *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, n.º 49, pp. 42018–42029, dez. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b15724.
- [16] European Commission, «EU GMP Annex 9: Manufacture of Liquids, Creams and Ointments - ECA Academy». Acedido: 9 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/eu-gmp-annex-9-manufacture-of-liquids-creams-and-ointments>
- [17] E. L. Barle, «Using Health-Based Exposure Limits to Assess Risk in Cleaning Validation», *Pharm. Technol.*, vol. 41, n.º 5, pp. 42–53, 2017.
- [18] European Commission, «EdraLex GMP Volume 4 Annex 15: Qualification and Validation». 30 de março de 2015. Acedido: 25 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/2015-10_annex15_0.pdf
- [19] A. Mahajan, «Review on Selection of Worst Case Product for Cleaning Validation», vol. 10, n.º 3, 2021.
- [20] European Medicines Agency, «Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities», nov. 2014.
- [21] European Medicines Agency, «Guideline for Elemental Impurities Q3D(R2)». 26 de maio de 2022. Acedido: 12 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3D-R2_Guideline_Step4_2022_0308.pdf
- [22] H. Balfour, «How should cleaning validation sampling locations be chosen?», *European Pharmaceutical Review*. Acedido: 16 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/172853/how-should-cleaning-validation-sampling-locations-be-chosen/>
- [23] European Medicines Agency, «ICH guideline Q9 (R1) on quality risk management». 26 de junho de 2023. Acedido: 29 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-17.pdf

- [24] J. Bhattacharya, «Quality Risk Management –Understanding and Control the Risk in Pharmaceutical Manufacturing Industry», *Int. J. Pharm. Sci. Invent.*, vol. 4, n.º 1, pp. 29–41, jan. 2015.
- [25] «Olhar 20/20 | MultiOpticas». Acedido: 25 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.multiplicas.pt/blog/cuidados-visuais/2020/olhar-2020>
- [26] K. Bader e K. Scalva, «Translating Laboratory Developed Visual Residue Limits to Process Area Applications | IVT», *J. Valid. Technol.*, vol. Special Edition: Cleaning Validation, pp. 45–50, mar. 2014.
- [27] A. Flueckiger, M. Crevoisier, D. G. Dolan, E. L. Barle, M. Ovais, e A. Walsh, «Cleaning Limits—Why the 10-ppm and 0.001-Dose Criteria Should be Abandoned, Part II», *Pharm. Technol.*, vol. 40, n.º 8, pp. 45–55, ago. 2016.
- [28] S. Lakshmana Prabu e T. Prakash, «Cleaning Validation and Its Importance in Pharmaceutical Industry», *Pharma Times*, vol. 42, n.º 7, jul. 2010.
- [29] D. G. Dolan, E. L. Barle, M. Schwind, C. Jandard, G. Tuschl, e C. Sehner, «Comparison of Permitted Daily Exposure with 0.001 Minimal Daily Dose for Cleaning Validation», *Pharm. Technol.*, vol. 41, n.º 5, pp. 42–53, mai. 2017.
- [30] R. Sharnez, M. Horner, A. Spencer, e A. Tholudur, «Biopharmaceutical Cleaning Validation: Leveraging Acceptable Exposure of Host- Cell Protein to Set Acceptance Limits for Inactivated Product», *J Valid. Technol.*, vol. 18, pp. 38–44, jan. 2012.
- [16] R. Sharnez, E. Aisenbrey, J. Bercu, D. Binkley, e A. Tholudur, «Cleaning Validation of Multiproduct Equipment: Acceptance Limits for Inactivated Product, Part II-Application of the Comparable Quality Approach to Intrasite Assessments», *J Valid. Technol.*, vol. 18, pp.17-25, 2012.
- [32] R. Sharnez, A. Spencer, J. Bussiere, D. Mytych, A. To, e A. Tholudur, «Biopharmaceutical Cleaning validation: acceptance limits for inactivated product based on gelatin as a reference impurity», *J. Valid. Technol.*, jan. 2013.
- [33] D. A. LeBlancDestin A., «Equipment Cleaning Validation- Microbial Control Issues», *J. Valid. Technol.*, vol. 8, n.º 4, ago. 2002, Acedido: 11 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://studylib.net/doc/25322859/equipment-cleaning-validation--microbial-control-issues>
- [34] P. Kushwaha, «Microbial Contamination: A Regulatory Perspective», *J. Pharm. Res.*, vol. 3, n.º 1, jan. 2010.
- [35] Council of Europe, «European Pharmacopeia», *European Pharmacopeia*, vol. I. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of The Council of Europe, Strasbourg, p. 4207,4208, 2019.
- [36] M. Ratajczak, M. M. Kubicka, D. Kamińska, P. Sawicka, e J. Długaszewska, «Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products», *Saudi Pharm. J. SPJ*, vol. 23, n.º 3, pp. 303–307, jul. 2015, doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.015.
- [37] World Health Organization, «Quality assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Vol. 2, Good manufacturing practices and inspection»,

Good Manuf. Pract. Insp., 2007, Acedido: 1 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43532>

- [38] Z. Zaheer e R. Zainuddin, «Analytical Methods for Cleaning Validation», *Pharm. Lett.*, vol. 3, n.º 6, pp. 232–239, 2011.
- [39] A. Suneetha e S. Donepudi, «HPLC method development and validation for the estimation of Axitinib in rabbit plasma», *Braz. J. Pharm. Sci.*, vol. 53, n.º 3, out. 2017, doi: 10.1590/s2175-97902017000300012.
- [40] A. Rosetti, R. Ferretti, L. Zanitti, A. Casulli, C. Villani, e R. Cirilli, «Single-run reversed-phase HPLC method for determining sertraline content, enantiomeric purity, and related substances in drug substance and finished product», *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, n.º 6, pp. 610–616, dez. 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2020.11.002.
- [41] Y. Sunandamma, «Single RP-HPLC Method for the Quantification of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Formulations», *The Experiment*, vol. 7, n.º 4, pp. 428–437, fev. 2013.
- [42] G. Hoizey, D. Lamiabie, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, e H. Millart, «Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC with UV detection», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 30, n.º 3, pp. 661–666, out. 2002, doi: 10.1016/S0731-7085(02)00289-3.
- [43] S. Notari, C. Tommasi, E. Nicastri, R. Bellagamba, M. Tempestilli, L. P. Pucillo, P. Narciso, e P. Ascenzi, «Simultaneous determination of maraviroc and raltegravir in human plasma by HPLC-UV», *IUBMB Life*, vol. 61, n.º 4, pp. 470–475, 2009, doi: 10.1002/iub.181.
- [44] M. C. Roman, J. Hildreth, e S. Bannister, «Determination of Catechins and Caffeine in Camillia sinensis Raw Materials, Extracts, and Dietary Supplements by HPLC-UV: Single-Laboratory Validation», *J. AOAC Int.*, vol. 96, n.º 5, pp. 933–941, set. 2013, doi: 10.5740/jaoacint.10-488.
- [45] A. Aubin e D. Root, «Transfer and Subsequent Redevelopment of a USP Related Substances HPLC Method to the Acquity UPLC® SYSTEM», *Waters Corp.*.
- [46] S. R. Gunturi, I. Ghobrial, e B. Sharma, «Development of a sensitive size exclusion HPLC method with fluorescence detection for the quantitation of recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) aggregates», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, n.º 1, pp. 213–221, jan. 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2006.06.006.
- [47] Y. Kara, Z. Can, e S. Kolaylı, «Applicability of Phenolic Profile Analysis Method Developed with RP-HPLC-PDA to some Bee Product», *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 65, p. e22210384, 2022, doi: 10.1590/1678-4324-2022210384.
- [48] A. Hawrył, M. Hawrył, e M. Waksmundzka-Hajnos, «Liquid chromatography fingerprint analysis and antioxidant activity of selected lavender species with chemometric calculations», *PLOS ONE*, vol. 14, n.º 7, p. e0218974, jul. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0218974.

- [49] Imagination at Work, «The Right Analytical Method for the Right Application: TOC Analysis for Cleaning Validation». Acedido: 7 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <http://www.youngin.com/application/AN-0807-0071EN.pdf>
- [50] Veolia, «Sievers M9 TOC Analyzers». Acedido: 9 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.watertechnologies.com/products/analyzers-instruments/sievers-m9-toc-analyzers>
- [51] D. T. Lehman e E. Lingenfelter, «Cleaning Validations: Alternatives for monitoring non-soluble compounds». Eurofins. Acedido: 7 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://cdnmedia.eurofins.com/corporate-eurofins/media/12153200/9407_toc-cleaning-validation_web.pdf
- [52] Suez, «Cost of Ownership Comparison: HPLC to TOC for Cleaning Validation». Acedido: 8 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.watertechnologies.com/applications/cleaning-validation>
- [53] M. Cantiga, «Validação e Implementação de método TOC e HPLC no âmbito de validações de limpeza», FCT-UNL, 2020. (Dissertação de Mestrado)
- [54] M. J. O’Neil, Ed., *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, Fifteenth edition. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2013.
- [55] Imagination at Work, «Validating the TOC Method for Cleaning Validation Applications in the Pharmaceutical Industry». Acedido: 9 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://blogsdm.files.wordpress.com/2009/11/geanalytical_validating-toc-for-cv_an_5.pdf
- [56] European Medicines Agency, «ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures». 24 de março de 2022. Acedido: 9 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf
- [57] M. Mukaka, «A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research», *Malawi Med. J. J. Med. Assoc. Malawi*, vol. 24, n.º 3, pp. 69–71, set. 2012.
- [58] Relacre, «Guia 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química». Acedido: 13 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>
- [59] L. S. Easily, «Coefficient of Determination vs Coefficient of Correlation», *Learn Statistics Easy*. Acedido: 9 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://statisticseasily.com/coefficient-of-determination-vs-coefficient-of-correlation/>
- [60] U.S. Food and Drug Administration, «21 CFR 211.165 -- Testing and release for distribution.» Acedido: 27 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/part-211/section-211.165>
- [61] U.S. Food and Drug Administration, «21 CFR 211.194 -- Laboratory records.» Acedido: 27 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/part-211/section-211.194>
- [62] European Medicines Agency, «ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents». 22 de abril de 2021. Acedido: 12 de novembro de 2023. [Em linha].

Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guide-line/ich-guideline-q3c-r8-impurities-guideline-residual-solvents-step-5_en.pdf

- [63] G. C. R. Douglas C. Montgomery, *Applied Statistics and Probability For Engineers*, Third Edition. John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [64] PubChem, «Oxymetazoline hydrochloride». Acedido: 10 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66259>
- [65] PubChem, «Benzododecinium chloride». Acedido: 10 de setembro de 2023. [Em linha]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8753>
- [66] T. Little, «Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods», *BioPharm Int.*, vol. 29, n.º 10, pp. 30–32, out. 2016.
- [67] «Product Monograph Analgesic and Muscle Relaxant Methocarbamol and Ibuprofen caplets». Pharmascience Inc., 31 de dezembro de 2012.
- [68] «Product Monograph Minocycline (Minocycline Hydrochloride Capsules USP)». Sanis Health Inc., 10 de maio de 2012. Acedido: 16 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00016420.PDF8
- [69] E. Ratti, J. Berry, D. Greenblatt, L. Loci, A. Ellrodt, J. Shefner, e M. Cudkowicz, «Pre-clinical Rodent Toxicity Studies for Long Term Use of Ceftriaxone», *Toxicol. Rep.*, vol. 2, pp. 1396–1403, out. 2015, doi: 10.1016/j.toxrep.2015.09.010.
- [70] E. F. S. Authority (EFSA), «Opinion of the safety of glucosamine hydrochloride from *Aspergillus niger* as food ingredient», *EFSA J.*, vol. 7, n.º 6, p. 1099, 2009, doi: 10.2903/j.efsa.2009.1099.
- [71] Hospira, Inc., «Safety Data Sheet - Cefotaxime for Injection», jul. 2016. Acedido: 16 de agosto de 2023. [Em linha]. Disponível em: https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/cefotaxime_injection%28Hospira%29_12-Jul-2016.pdf
- [72] T. Kawamoto, Y. Ito, O. Morita, e H. Honda, «Mechanism-based risk assessment strategy for drug-induced cholestasis using the transcriptional benchmark dose derived by toxicogenomics», *J. Toxicol. Sci.*, vol. 42, pp. 427–436, jul. 2017, doi: 10.2131/jts.42.427.
- [73] Y. C. Huang, J. L. Colaizzi, R. H. Bierman, R. Woestenborghs, e J. Heykants, «Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 30, n.º 2, pp. 206–210, ago. 1986, doi: 10.1128/aac.30.2.206.
- [74] C. Cui, X. Zhang, Y. Wang, S. Lu, H. Lu, Q. Hui, W. Ahmad, Y. Cai, X. Liu, L. Liu, F. Shi, Y. Liu, K. Zhao, F. Zhai, Y. Xiang, P. Hu, Y. Li, H. Ren, N. Jin, e Z. Liu, «Acute and chronic toxicity assessment of benzylpenicillin G residue in heat-treated animal food products», *Chemosphere*, vol. 202, mar. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.066.
- [75] L. J. I. Horspool e Q. A. McKellar, «Disposition of penicillin g sodium following intravenous and oral administration to equidae», *Br. Vet. J.*, vol. 151, n.º 4, pp. 401–412, jan. 1995, doi: 10.1016/S0007-1935(95)80129-4.
- [76] F. Yemiş, «Classification, Uses and Environmental Implications of Disinfectants», *Pak. J. Anal. Environ. Chem.*, vol. 21, n.º 2, pp. 179–192, dez. 2020, doi: 10.21743/pjaec/2020.12.20.

- [77] W. P. da Silva, T. D. Carlos, G. S. Cavallini, e D. H. Pereira, «Peracetic acid: Structural elucidation for applications in wastewater treatment», *Water Res.*, vol. 168, p. 115143, jan. 2020, doi: 10.1016/j.watres.2019.115143.
- [78] C. Pironti, F. Dell’Annunziata, R. Giugliano, V. Folliero, M. Galdiero, M. Ricciardi, O. Motta, A. Proto, e G. Franci, «Comparative analysis of peracetic acid (PAA) and permaleic acid (PMA) in disinfection processes», *Sci. Total Environ.*, vol. 797, p. 149206, nov. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149206.
- [79] J. Fisher, «Cleaning Procedures in the Factory | Types of Disinfectant», em *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Ed., Oxford: Academic Press, 2003, pp. 1382–1385. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00249-2.
- [81] K. Turner, «Volwaterbaai Seawater Desalination Plant Chemicals And Discharges Summary (Appendix To Preliminary Design Report)». 18 de junho de 2013.



(a

SOFIA MENDES ALBUQUERQUE

VALIDAÇÕES DE LIMPEZA EM EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO
DE MEDICAMENTOS E DERMOCOSMÉTICOS NO SETOR DE FORMAS LÍQUIDAS
E PASTOSAS