



Bruna Sofia Martins Pereira

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validação de Técnicas de Limpeza de Equipamentos na Indústria Farmacêutica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dr.^a Ana Margarida Cepêda, Laboratórios Atral, SA

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Dr.^a Maria Ascensão Carvalho Fernandes Miranda Reis

Arguente: Eng. Ricardo Jorge Milheiro Dias Tavares Grilo

Vogal: Dr.^a Ana Margarida Vilares Cepêda



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril 2015



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Bruna Sofia Martins Pereira

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validação de Técnicas de Limpeza de Equipamentos na Indústria Farmacêutica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Dr.^a Ana Margarida Cepêda, Laboratórios Atral, SA

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Eusébio, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof.^a Dr.^a Maria Ascensão Carvalho Fernandes Miranda Reis

Arguente: Eng. Ricardo Jorge Milheiro Dias Tavares Grilo

Vogal: Dr.^a Ana Margarida Vilares Cepêda

Abril 2015

Esta dissertação está escrita sob as regras do novo acordo ortográfico.

Aos meus Pais

Aos meus Avós

Ao Pedro

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

Validação de Técnicas de Limpeza de Equipamentos na Indústria Farmacêutica

Direitos de Cópia © 2015 por Bruna Sofia Martins Pereira

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

O autor concede à Faculdade de Ciências e Tecnologia e à Universidade Nova de Lisboa, nos termos dos regulamentos aplicáveis, o direito de divulgar e distribuir cópias desta dissertação. Concretamente:

“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.”

Agradecimentos

A realização deste estágio curricular não seria possível sem a interligação entre a FCT-UNL e os Laboratórios Atral, SA. Este tipo de estágio foi uma mais valia na minha vida, na medida em que foi possível conjugar a parte académica com a parte profissional, e evoluir nesse sentido. Deste modo, tenho a agradecer a diversas pessoas, que estiveram presentes ao longo deste estágio, mas também ao longo deste fantástico curso:

À Dra. Elisabete Vasquez, diretora de recursos humanos da AtralCipan, pela disponibilidade e oportunidade que me ofereceu em realizar este estágio;

À Dra. Margarida Cepêda, minha orientadora, um enorme obrigado por tudo! Obrigada pelo conhecimento transmitido, pelos ensinamentos que me deu, pelo tempo que disponibilizou mesmo estando com muito trabalho em mãos, pela confiança depositada em mim;

Ao Professor Mário Eusébio, meu co-orientador, muito obrigado pelo voto de confiança, pelo acompanhamento ao longo deste estágio e pela disponibilidade para esclarecimento das dúvidas que fui tendo ao longo da escrita desta dissertação;

Ao Eng. Ricardo Grilo, pela simpatia, disponibilidade e preocupação em saber como estava a decorrer o trabalho. Todos os conselhos dados por si foram escutados, guardados, e com certeza irei segui-los no futuro;

À Eng^a. Nádía Rodrigues, o que te dizer? Obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelos pequenos-almoços, por ajudares no que sabias, mas principalmente pelas gargalhadas constantes! ;

À minha colega de estágio e também de curso, Sofia Marques, com a qual ouvi muitas músicas, me diverti, aprendi e troquei ideias. Também te estou agradecida!;

À Dra. Iva Bruinheira e à Dra. Helena Nunes pela simpatia e carinho e pelas conversas positivas que fomos tendo ao longo deste percurso;

Aos restantes elementos da Garantia da Qualidade, fica também um agradecimento pela disponibilidade nas várias fases deste estágio, nomeadamente, à Dra. Teresa Malta, ao Dr. António Marques da Costa, ao Eng. Fernando Ferreira, ao Eng. Sérgio Rodrigues, à Carla Paulino e à Maria da Luz;

À Dra. Sandra Lopes, Eng^a Cristina Barroso, Eng^a. Joana Cecílio e Eng^a Ágata Melon, pela vossa disponibilidade durante a minha primeira validação analítica, estou-vos muito grata! À Eng^a Fernanda Pontes, à Ana Paula, à Helena e ao Nuno, um muito obrigado pela vossa disponibilidade e oportunidade de trabalho em conjunto de modo a rentabilizarmos os HPLCs. À Eng^a Iva Vinhas por todos os conhecimentos transmitidos, principalmente ao nível da análise TOC, foi uma ajuda importante. Também tenho de agradecer às restantes pessoas que fazem parte do Controlo de Qualidade, nomeadamente ao Dr. José Martins, à Dra. Cristina Oliveira, à Eng^a Carla Capela, à Clara, à Marina, à Marisa, à Eng^a Inês Magalhães, à D. Anabela, à D.

Rosário, ao Francisco e ao João pela simpatia e ajuda na procura por pequenos materiais necessários ao meu trabalho.

Ao departamento da Microbiologia um muito obrigado à Daniela, à Ana Rosa à Sandra, mas em especial à Dra. Sofia Ferreira pela alegria que sempre transmitiu e pelas ideias novas que me deu a conhecer mas também à D. Joaquina pelos pequenos ensinamentos e conversas que tivemos.

Relativamente à área de produção, um obrigado à Dra. Dora Pereira e à D. Lídia Antunes que tantas vezes as chatee para saber quando podia efetuar as amostragens aos equipamentos. Também deixo um agradecimento aos operadores da área da produção, aquando das minhas idas ao FSO3 sempre se mostraram disponíveis para o que fosse necessário.

Ao grupo de investigação da FCT-UNL, que me disponibilizou o aparelho de análise de TOC, para as análises que foram necessárias e efetuar às águas de lavagem da primeira amostragem que fiz.

Aos meus colegas de curso, mas em especial às “PTA *girls*”: Andreia Gouveia, Carina Constantino e Sofia Pires, que para além de colegas se tornaram grandes amigas, não irei esquecer o tempo passado à volta de *flowsheets* e *excels*, mas também o tempo passado em modo diversão. À Rita Castanheiro e Nádía Pedro pela amizade e pelos momentos divertidos que passamos ao longo destes anos de faculdade. À minha madrinha de curso, Ana Mónica Silva, um obrigado por tudo!

A todos os meus amigos, mas em especial, à Luísa Fernandes, Fábio Januário, Nuno Vilhena e Nuno Amaro, pela grande amizade, pelos momentos divertidos, e por terem estado presentes nestes últimos meses.

À minha família. Aos meus Pais que estiveram sempre presentes neste percurso, pelos valores que me transmitiram ao longo dos anos, pela pessoa que sou hoje. Obrigada pelo vosso apoio incondicional, por nunca me deixarem ir abaixo nas situações mais stressantes, mas principalmente porque proporcionaram a minha chegada aqui. Aos meus Avós, que sempre demonstraram preocupação e ao mesmo tempo alegria. Obrigado por terem tolerado todas as ausências e pelo carinho que sempre me deram.

Ao Pedro, por teres estado sempre presente neste longo percurso, pelo amor e pelo apoio que sempre prestaste!

A ti Isabel, obrigada pela tua disponibilidade, apoio e carinho demonstrado ao longo deste percurso!

Um grande Obrigado a todos vós!

Resumo

A indústria farmacêutica é uma indústria de grande dimensão e que exige a maior qualidade possível. No grupo AtralCipan, essa exigência não é esquecida e por isso se tem um enorme cuidado ao nível da limpeza dos equipamentos por forma a impedir contaminações cruzadas. Os Laboratórios Atral têm vindo ao longo dos anos a realizar validações de limpeza com o objetivo de mostrar e verificar que realmente as limpezas efetuadas aos equipamentos e respetivas salas são eficazes, não comprometendo nenhuma produção.

A presente dissertação visa na validação de limpeza dos equipamentos do setor das formas sólidas orais cefalosporinas. O trabalho desenvolvido iniciou-se com a seleção dos produtos pior-caso do setor através de uma análise de risco. Posteriormente, analisou-se cada equipamento presente no setor (câmara de pesagem, tamisador, misturador bicónico, compactadora, máquina de comprimir e despoeirador, bacias de revestimento e máquina de blisterar) para identificação dos pontos críticos de limpeza dos mesmos.

Com base nas áreas dos equipamentos e posologia dos produtos, calculou-se o limite analítico para cada produto pior-caso e validou-se o método analítico por HPLC para cada um. Os resultados destas duas validações foram favoráveis, revelando que a pesquisa de resíduos de substância ativa através de HPLC é um método adequado e que pode ser utilizado.

O passo seguinte deste processo recai nas amostragens a efetuar a cada equipamento consoante os pontos críticos identificados. As amostragens efetuadas incidiram sobre a pesquisa de carbono orgânico total, determinação de atividade microbiológica e determinação de resíduos de substância ativa. No geral obtiveram-se bons resultados, verificando-se que todas as amostragens obtiveram resultados inferiores aos limites estipulados, existindo um desvio para o misturador bicónico ao nível da pesquisa de carbono orgânico total e dois desvios na determinação de atividade microbiana na compactadora e máquina de blisterar.

O trabalho desenvolvido forneceu informações importantes à empresa, demonstrando que o modo de limpeza dos seus equipamentos é apropriado, prevenindo futuras contaminações cruzadas entre os diversos medicamentos fabricados.

Palavras-chave: validação de limpeza, equipamentos farmacêuticos, produto pior-caso, TOC, microbiologia, substância ativa

Abstract

The pharmaceutical industry is a big market industry which requires the best possible quality. In the AtralCipan Company group, such requirement is not neglected so that there is a tremendous care concerning the cleaning of the equipment in order to avoid possible crossed contamination.

The present dissertation is devoted to the cleaning validation of equipment from the cephalosporins oral solid shape sector. The developed work has initiated with the selection of the worst-case products in the sector, through a risk-analysis. Subsequently, each sector equipment had been analysed (weighing chamber, a sieve, biconical mixer, compactor, compressing and deduster machine, coating basins, and blister machine) for critical washing points identification.

Considering equipment area and product posology, the analytic limit had been computed for each worst-case product and the analytical method was validated by HPLC for each one. Test results for both validations showed to be satisfactory, revealing that the search for active substance residues through HPLC is an adequate method and can be used.

The next step of this process consisted on the equipment sampling according to the identified critical points. The performed samples were focused on total organic carbon searching, microbiological activity determination and active substance residues determination. Generically, good outcomes had been achieved, as verified by the sampling results which were lower than the stipulated limits. In the case of the biconic mixer, a deviation in the total organic carbon searching was observed and two deviations in the case of the microbiological activity determination in compactor and blister machines.

The developed work supplied pertinent information for the Company, showing that the cleaning process of their equipment is appropriate, which allows to prevent future crossed-contaminations among the several produced medicines.

Keywords: cleaning validation, pharmaceutical equipments, worst-case product, TOC, microbiology, active substance.

Índice

1. Qualidade na Indústria Farmacêutica	1
1.1. A Qualidade e a sua Gestão	2
1.1.1. Sistema de Qualidade Farmacêutica	2
Boas Práticas de Fabrico	3
Gestão dos Riscos de Qualidade	3
1.1.2. Controlo da Qualidade	4
1.1.3. Requisitos Legais da Qualidade Farmacêutica	5
2. A Limpeza dos Equipamentos na Indústria Farmacêutica	7
2.1. Possíveis Contaminantes dos Fármacos	8
2.2. Procedimento e Validação de Limpeza	10
2.3. Plano Mestre de Validação de Limpeza	10
2.4. Validação de Método Analítico para Validação de Limpeza	12
2.4.1. Escolha do Método Analítico a Aplicar	12
2.4.2. Escolha do Método de Amostragem	14
2.4.3. Seleção dos Piores-Casos	15
Análise de risco	15
Cálculo do Limite Analítico da Substância Ativa	16
Limite de Resíduo Aceitável	17
Limite Residual de Superfície	18
Limite Analítico	19
2.4.4. Parâmetros da Validação do Método Analítico	20
Linearidade e Gama	21
Precisão	21
Precisão do sistema	21
Repetibilidade	21
Limite de Detecção e Limite de Quantificação	22
Exatidão/Recuperação	23
Seletividade	23
Estabilidade do analito nas soluções analíticas e no equipamento	24
2.5. Validação de Limpeza para cada Equipamento	24
Inspeção Visual	25
Pesquisa de Resíduos de Detergente ou outro Agente de Limpeza	25
Pesquisa de Atividade Microbiológica	26
Pesquisa de Resíduos de Substância Ativa	27
3. Materiais e Métodos Utilizados	29
3.1. Equipamentos incluídos no estudo	30

Câmara de Pesagem.....	30
Tamisador.....	31
Misturador Bicónico	31
Compactadora	32
Máquina de Comprimir e Despoeirador	32
Bacias de Revestimento.....	33
Máquina de Blisterar.....	34
3.1.1. Definição dos pontos críticos de cada equipamento	35
3.2. Validação do Método Analítico.....	42
3.2.1. Determinação do Limite Analítico para o Primeiro Caso	42
3.2.2. Determinação do Limite Analítico para o Segundo Caso	45
3.2.3. Materiais Necessários ao Processo de Validação Analítica	49
3.2.4. Processo de Validação do Método Analítico.....	50
3.3. Validação de Limpeza dos Equipamentos	59
3.3.1. Testes a Efetuar a Cada Equipamento.....	59
Teste de Validação de Limpeza nº 1 – Inspeção Visual	60
Teste de Validação de Limpeza nº 2 – Determinação de Resíduos de Agente de Limpeza	60
Teste de Validação de Limpeza nº 3 – Determinação de Atividade Microbiana....	61
Teste de Validação de Limpeza nº 4 – Determinação de Resíduos de Substância Ativa	62
4. Resultados e Discussão	67
4.1. Validação do Método Analítico	68
4.1.1. Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico Validado para o Produto 1.....	68
4.1.2. Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico Validado para o Produto 9.....	79
4.2. Validação de Limpeza dos Equipamentos	89
4.2.1. Apresentação de Resultados	89
4.2.2. Interpretação dos Resultados	95
Intervalo de Dias entre a Produção, Limpeza e Amostragens	96
Teste de Validação de Limpeza nº 1 – Inspeção Visual	96
Teste de Validação de Limpeza nº 2 – Determinação de Resíduos de Agente de Limpeza	99
Teste de Validação de Limpeza nº 3 – Determinação de Atividade Microbiana	100
5. Conclusões	105
6. Trabalho Futuro	107
7. Referências Bibliográficas	109
8. Anexos.....	113

Índice de Tabelas

Tabela 2-1 - Métodos analíticos específicos e não-específicos	13
Tabela 2-2 - Índices de risco aplicados à seleção do produto pior-caso.	16
Tabela 2-3 – Comparação entre os parâmetros recomendados pela ICH, USP, FDA e os utilizados no estudo.	20
Tabela 2-4 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação.	22
Tabela 2-5 - Limites recomendados para contaminação microbiológica em áreas limpas	26
Tabela 3-1 - Pontos críticos de amostragem da câmara de pesagem.	35
Tabela 3-2 - Pontos críticos de amostragem do tamisador.	36
Tabela 3-3 - Pontos críticos de amostragem para o misturador bicônico.	37
Tabela 3-4 - Pontos críticos de amostragem para a compactadora.	37
Tabela 3-5 - Pontos críticos de amostragem para a máquina de comprimir e despoeirador.	39
Tabela 3-6 - Ponto crítico de amostragem para as bacias de revestimento.	40
Tabela 3-7 - Pontos críticos de amostragem para a máquina de blisterar.	41
Tabela 3-8 - Tamanho de lote de cada produto produzido no FSO3.	42
Tabela 3-9 - Produto Pior-caso A e B por conjunto de equipamentos.	43
Tabela 3-10 - Resultados obtidos para o LRS.	44
Tabela 3-11 - Resultados para o LA.	44
Tabela 3-12 - Produtos Pior-Caso por conjunto de equipamentos.	46
Tabela 3-13 - Resultados obtidos para o LRS.	47
Tabela 3-14 - Resultados para o LA.	47
Tabela 3-15 - Análise de risco para determinação do produto pior-caso.	48
Tabela 3-16 – Materiais, reagentes e condições cromatográficas necessários na validação do método analítico.	49
Tabela 3-17 - Soluções a utilizar no processo de validação – produto 1.	51
Tabela 3-18 - Soluções a utilizar no processo de validação – produto 9.	52
Tabela 3-19 - Preparação das soluções ao nível LQ.	56
Tabela 3-20 - Testes a realizar no processo de Validação da Limpeza.	60
Tabela 3-21 - Condições cromatográficas e materiais usados na análise das amostras de validação de limpeza.	63
Tabela 3-22 - Critérios de aceitação para a determinação de substância ativa.	66
Tabela 4-1 - Resultados da precisão do sistema – Validação do método analítico SA1.	72
Tabela 4-2 - Resultados da repetibilidade do método-Validação do método analítico SA1.	73
Tabela 4-3 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico SA1.	73
Tabela 4-4 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico SA1.	74

Tabela 4-5 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico SA1.....	75
Tabela 4-6 - Resultados do limite de quantificação- Validação do método analítico SA1.....	76
Tabela 4-7 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico SA1.	76
Tabela 4-8 - Resultados da estabilidade da substância no equipamento - Validação do método analítico SA1.	77
Tabela 4-9 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico SA1.	77
Tabela 4-10 - Resultados da precisão do sistema - Validação do método analítico SA3.	82
Tabela 4-11 - Resultados da repetibilidade do método - Validação do método analítico SA3..	83
Tabela 4-12 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico SA3.....	84
Tabela 4-13 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico SA3.....	84
Tabela 4-14 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico SA3.....	85
Tabela 4-15 - Resultados do Limite de Quantificação - Validação do método analítico SA3....	86
Tabela 4-16 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico SA3.	86
Tabela 4-17 - Resultados da estabilidade da substância no equipamento - Validação do método analítico SA3.	87
Tabela 4-18 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico SA3.	87
Tabela 4-19 - Resultados obtidos para a Câmara de Pesagem.....	89
Tabela 4-20 - Resultados obtidos para o Tamisador.....	90
Tabela 4-21 - Resultados obtidos para o Misturador Bicônico.	90
Tabela 4-22 - Resultados obtidos para a Compactadora.	92
Tabela 4-23 - Resultados obtidos para a Máquina de Comprimir e Despoeirador.....	93
Tabela 4-24 - Resultados obtidos para as Bacias de Revestimento.	94
Tabela 4-25 - Resultados obtidos para a Máquina de Blisterar.....	94
Tabela A.2-1 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 1 lote C004.	115
Tabela A.2-2 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 1 lote D001.	116
Tabela A.2-3 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 9 lote D001.	118
Tabela A.2-4 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 9 lote D006.	119

Índice de Figuras

Figura 1-1 - Organograma do grupo AtralCipan .	xix
Figura 2-1 - Esquema de possível contaminação no fabrico de medicamentos.	8
Figura 3-1 - Câmara de Pesagem.	30
Figura 3-2 - Tamisador.	31
Figura 3-3 - Misturador Bicónico.	31
Figura 3-4 - Compactadora.	32
Figura 3-5 - Máquina de Comprimir (A) e Despoeirador (B).	33
Figura 3-6 - Bacia de Revestimento.	34
Figura 3-7 - Máquina de Blisterar.	34
Figura 3-8 - Movimentos a efetuar com o <i>swab</i> , aquando da amostragem na placa.	53
Figura 3-9 - Frascos para análise TOC.	61
Figura 3-10 - Placa de contato da Oxoid.	61
Figura 3-11 - <i>Swab</i> .	63
Figura 3-12 - Frascos de amostragem de 150mL com tampa Astra devidamente rotulados.	63
Figura 4-1 - Cromatograma correspondente à solução a 50% do limite analítico (SA).	68
Figura 4-2 - Cromatograma correspondente à solução ao limite analítico (SA).	68
Figura 4-3 - Cromatograma correspondente à solução a 200% do limite analítico (SA).	68
Figura 4-4 - Cromatograma correspondente ao solvente utilizado na preparação das amostras (metanol).	69
Figura 4-5 - Cromatograma correspondente ao “branco” de <i>swab</i> .	69
Figura 4-6 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa.	69
Figura 4-7 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa e/ou outras soluções.	69
Figura 4-8 - Cromatogramas correspondentes às soluções de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm.	70
Figura 4-9 - Cromatograma correspondente à solução de detergente e/ou outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA50%. 70	70
Figura 4-10 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do <i>swab</i> .	71
Figura 4-11 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa.	71
Figura 4-12 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA1.	75
Figura 4-13 - Estudo da estabilidade do produto no equipamento (dia 67).	78

Figura 4-14 - Cromatograma correspondente à solução a 50% do limite analítico (SA).....	79
Figura 4-15 - Cromatograma correspondente à solução ao limite analítico (SA).....	79
Figura 4-16 - Cromatograma correspondente à solução a 200% do limite analítico (SA).....	79
Figura 4-17 - Cromatograma correspondente ao solvente utilizado na preparação das amostras (fase móvel).....	80
Figura 4-18 - Cromatograma correspondente “branco” de <i>swab</i>	80
Figura 4-19 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa.	80
Figura 4-20 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10 ppm.....	80
Figura 4-21 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções de lavagem.	81
Figura 4-22 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10 ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA50%.	81
Figura 4-23 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do <i>swab</i>	81
Figura 4-24 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa.....	81
Figura 4-25 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA3.	85
Figura 4-26 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA3.	88
Figura 4-27 - Intervalo de dias entre a limpeza e amostragens - Produto 1.....	97
Figura 4-28 - Intervalo de dias entre a limpeza e amostragens - Produto 9.....	98
Figura 4-29 - Análise dos resultados da pesquisa de resíduos de agente de limpeza–Produto 1.	99
Figura 4-30 - Análise dos resultados da pesquisa de resíduos de agente de limpeza–Produto 9. ..	100
Figura 4-31 - Análise dos resultados da atividade microbiana - caso do produto 1.....	101
Figura 4-32 - Análise dos resultados da atividade microbiana - caso do produto 9.....	101
Figura 4-33 - Análise dos resultados da pesquisa de substância ativa – caso do Produto 1 ..	102
Figura 4-34 - Análise dos resultados da pesquisa de substância ativa – caso do Produto 9. .	103

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

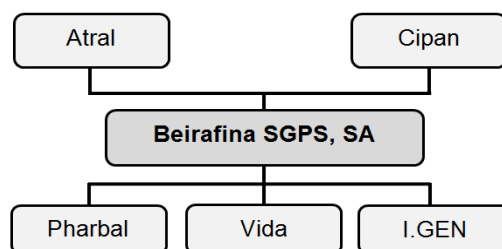
A, Ap	Área do pico correspondente à substância ativa no cromatograma da solução padrão
ADI	Aceptable Daily Intake
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
API's	Active Pharmaceutical Ingredients
ASA	Área de Superfície Amostrada
ASL	Área de Superfície Lavada
B, Ba	Área do pico correspondente à substância ativa no cromatograma da solução amostra
C	Conforme
CQ	Controlo de Qualidade
CV	Coefficiente de Variação
D, L	Quantidade de substância ativa na formulação
DFA	Diluyente Fluido A de Peptona
DL50	Minima Dose Letal
DP	Desvio Padrão
Dx	Diluição x
EMEA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FLP	Formas Líquidas e Pastosas Gerais
FR	Fator de Recuperação
FS	Fator de Segurança
FSO1	Formas Sólidas Orais Gerais
FSO2 - UP	Formas Sólidas Orais – Unidade Penicilínica
FSO3 - UC	Formas Sólidas Orais – Unidade Cefalosporínica
GMP	Good Manufacturing Practice
GQ	Garantia da Qualidade
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
LA	Limite Analítico
LD	Limite de Detecção

LQ	Limite de Quantificação
LRA	Limite de Resíduo Aceitável
LRS	Limite Residual de Superfície
MDd	Máxima Dose Diária
mDd	Minima Dose Diária
NA	Não Aplicável
ND	Não Detetável
NOEL	Nível de Efeito Não Observado
P	Atividade / Potência do padrão
PM, Aw	Massa média dos comprimidos
PMVL	Plano Mestre de Validações de Limpeza
ppm	Partes por milhão
SA	Substância Ativa
SCEP	Superfície do Equipamento em Contacto com o Produto
T	Teor de Substância Ativa
TL	Tamanho de Lote
TOC	Carbono Orgânico Total
Tp	Toma de Ensaio Padrão
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
Va	Volume de aplicação na placa
Vi	Volume inicial do balão
VL	Volume de Lavagem
VS	Volume de Solvente
Ws	Peso padrão de substância ativa
Wt	Peso da amostra

Enquadramento e Motivação

O grupo AtralCipan é um grupo farmacêutico integrado que produz princípios ativos (APIs) para a indústria farmacêutica, mas também produtos acabados. A Atral começou por ser uma pequena farmácia situada em Alcântara, Lisboa, que com as oportunidades de crescimento que foram existindo ao longo dos tempos, conseguiu aumentar o seu volume de vendas, tendo contratado mais técnicos e construído as suas próprias instalações fabris para fazer face ao movimento de exportação que criara. A Atral fabrica e comercializa diversos medicamentos, produto acabado, e a Cipan dedica-se à produção de antibióticos.

Este grupo farmacêutico foi crescendo sendo que atualmente é constituído por 5 empresas dirigidas pela Beirafina SGPS, SA (vide Figura 1-1) [1].



Os Laboratórios Atral, SA ao longo dos anos têm vindo a desenvolver os seus produtos de forma a dar aos seus clientes a máxima qualidade possível. A sua produção incide maioritariamente em antibacterianos, vitaminas e diversos medicamentos para combater determinadas doenças do foro sanguíneo, cardiovascular, digestivo, nervoso, músculo-esquelético e respiratório [1], sempre de acordo com as Boas Práticas de Fabrico. A Atral divide-se em dois edifícios separados: o edifício 10 e o edifício 25. O edifício 10 que é composto por quatro setores: Formas Líquidas e Pastosas Gerais (FLP – onde são produzidos xaropes, pomadas, cremes e soluções orais e nasais), Formas Sólidas Oraís Gerais (FSO1 – produz-se neste setor comprimidos, cápsulas, saquetas e implantes), Injetável 3 (INJ3-UC – unidade cefalosporínica onde são produzidos frascos e ampolas estéreis) e Formas Sólidas Oraís Cefalosporínicas (FSO3-UC – neste setor produzem-se comprimidos e pós para suspensões orais cefalosporínicas); tanto o setor Injetável 3 como o FSO3 estão ambos segregados do restante edifício 10 por constarem de uma outra família de produtos. O edifício 25 é composto pelo Injetável 2 (INJ2-UP – unidade penicilínica onde são produzidos frascos e ampolas estéreis) e pelas Formas Sólidas Oraís Penicilínicas (FSO2-UP - produzem-se comprimidos, saquetas, cápsulas e pós para suspensões orais penicilínicas).

Este trabalho teve como principal foco a validação de limpeza dos equipamentos do FSO3, onde o objetivo principal é garantir que não existe contaminação cruzada entre produções. Posto isto, pretende-se avaliar quais as quantidades presentes de carbono orgânico total, se existe ou não atividade microbiana e se está presente alguma substância ativa. Pretende-se que os resultados obtidos estejam abaixo dos limites de aceitação impostos para cada teste a efetuar, garantido assim a qualidade dos produtos produzidos neste setor.



1.

Qualidade na Indústria Farmacêutica

1.1. A Qualidade e a sua Gestão

A qualidade de um qualquer medicamento produzido por uma indústria farmacêutica é uma questão de extrema importância. Um medicamento é uma substância que contém propriedades curativas ou preventivas de doença, pelo que deve ser o mais seguro e controlado possível [2]. Assim, a qualidade de um medicamento não é da exclusiva responsabilidade da indústria farmacêutica que o produz, sendo que os distribuidores, farmácias, parafarmácias e também os próprios consumidores têm um papel importante na sua preservação. Deste modo a indústria farmacêutica ao longo dos anos tem vindo a implementar regras e regulamentos com o objetivo de controlar todo o processo de produção de determinado produto, com vista a tornar o medicamento o mais seguro possível e com a qualidade pretendida. Tem vindo a ser implementado o Sistema de Qualidade Farmacêutica que incorpora as Boas Práticas de Fabrico (GMPs) e a Gestão de Riscos de Qualidade.

1.1.1. Sistema de Qualidade Farmacêutica

A gestão da qualidade no ramo da indústria farmacêutica envolve um conjunto de procedimentos que são organizados e interligados de modo a garantir que determinado medicamento contém a qualidade que se deseja. Alguns dos passos a adotar para garantir a qualidade de um fármaco são [3]:

- A conceção do produto é obtida através da implementação de um plano pré-definido, que vai sendo melhorado continuamente, permitindo assim a entrega do produto com a qualidade adequada;
- Os medicamentos devem ser desenvolvidos, produzidos e controlados de acordo com as boas práticas de fabrico;
- Os resultados do produto e da monitorização do processo devem ser analisados e levados em conta na investigação de desvios e também antes da libertação do lote, de maneira a evitar possíveis desvios;
- Após a implementação de qualquer mudança, deve ser realizada uma avaliação por forma a provar que os objetivos para a qualidade estão a ser cumpridos;
- Nenhum medicamento pode ser vendido ou fornecido sem que antes esteja aprovado o certificado do lote de produção e que os requisitos de autorização de comercialização e produção estejam conformes.

Com o pressuposto de cumprir todos os objetivos do sistema de qualidade farmacêutica, a empresa deve periodicamente avaliar a sua gestão da qualidade, para verificar a conformidade de todos os pontos ou introduzir melhorias no processo.

Boas Práticas de Fabrico

As Boas Práticas de Fabrico, ou como são mais conhecidas as GMPs, são um conjunto de regras que quando implementadas garantem que o medicamento esteja a ser produzido e controlado segundo os padrões de qualidade adequados e segundo o que é exigido pela autorização de introdução no mercado [3].

Tanto a produção do medicamento, como o controlo de qualidade devem obedecer às regras exigidas pelas Boas Práticas de Fabrico:

- O processo de fabrico tem de estar definido e periodicamente deve ser revisto, de modo a garantir que o medicamento tem a qualidade exigida e está a ser fabricado segundo as suas especificações;
- Todos os passos ou alterações do processo de produção devem ser validados;
- É imprescindível: pessoal qualificado, instalações, equipamentos e armazenagem adequados, processos aprovados e ainda embalagens e rótulos corretos;
- Durante o fabrico do medicamento devem ser registados e depois guardados todos os passos do processo em questão de modo a comprovar que estão a ser cumpridos todos os procedimentos, quantidades e qualidade do produto;
- Deve existir um sistema que permita retirar do mercado um qualquer lote de um qualquer produto, caso seja necessário;
- Verificação das reclamações sobre os produtos, investigar as causas das mesmas e tomar providências para que não voltem a ocorrer.

Gestão dos Riscos de Qualidade

Ao serem aplicadas as GMP's, é necessário avaliar e estudar quais os possíveis riscos que o processo de produção pode acarretar, por exemplo, caso exista algum desvio na produção do fármaco ou mesmo que as condições de armazenamento do produto final não sejam adequadas. Assim torna-se essencial que a empresa faça uma gestão dos riscos de qualidade, por forma a verificar que todos os parâmetros que envolvem a produção do medicamento têm de ser conformes, respeitando a qualidade pretendida e exigida. Deste modo é necessário identificar quais os riscos que estão associados à produção e avaliar quais os danos que podem vir a causar futuramente [4].

A gestão dos riscos de qualidade, segundo a comissão europeia, deve ter em conta que:

“A estimativa dos riscos para a qualidade deve basear-se no conhecimento científico e estar fundamentalmente ligada à proteção do doente; e o nível de esforço, formalidade e documentação do processo de gestão dos riscos de qualidade deve ser proporcional ao nível de risco.”[4]

Deste modo, a avaliação dos riscos de qualidade passa por seguir um procedimento de análise em que inicialmente se avaliam e identificam os riscos existentes, de seguida procede-se

a uma análise e estimativa dos mesmos, e também se propõem formas de reduzir os riscos identificados.

A metodologia a aplicar é vasta, porém nem todos os procedimentos existentes são passíveis de serem aplicados nesta área, pelo que a indústria farmacêutica tem vindo a implementar métodos de avaliação de riscos reconhecidos tais como: análise de modos de falha e seus efeitos (FMEA), análise da criticidade de modos de falha e seus efeitos (FMECA), análise da árvore de falhas (FTA), análise de perigos e controlos de pontos críticos (HACCP), análise de perigos operacionais (HAZOP), entre outras.

Especificamente neste trabalho, o método adotado para realizar a análise de risco foi a FMEA. A análise de modos de falha e seus efeitos é uma análise que fornece uma estimativa de quais os modos de falha em processos e qual o seu possível efeito no produto. É tido em conta o grau de gravidade, a detetabilidade e as probabilidades de ocorrência das possíveis consequências de um risco. A FMEA é utilizada na indústria farmacêutica essencialmente para detetar falhas ou riscos associados à produção, sendo que o modo de classificação desta análise é através de um índice de risco, que quanto maior for, maior será a probabilidade do risco ocorrer [4].

1.1.2. Controlo da Qualidade

O Controlo da Qualidade está diretamente relacionado com as Boas Práticas de Fabrico. Caracteriza-se por ser um conjunto de amostragens, especificações e ensaios que têm de ser efetuados tanto para as matérias-primas antes de serem utilizadas no processo de fabrico, como para o produto final antes de este ser comercializado. Assim, são requeridos [3, 5]:

- Pessoal qualificado, instalações e procedimentos adequados, por forma a aprovar os ensaios que irão ser efetuados às matérias-primas, produtos intermédios e produto final;
- Amostras de matérias-primas, de produtos intermédios e finais e de materiais de embalagem aprovados;
- Métodos de ensaios validados;
- Registos que comprovem que todas as amostras bem como os ensaios efetuados foram todos realizados e estão conformes;
- Que os produtos acabados estejam conforme a Autorização de Introdução no Mercado, ou seja, que a quantidade de substância ativa, tal como a composição e pureza do medicamento estejam de acordo com o que é suposto;
- Um qualquer lote de determinado produto não pode ser comercializado sem que uma pessoa qualificada possa garantir que todos os requisitos estão conformes;
- Amostras em número suficiente de matérias-primas e de produtos para o caso de, no futuro, ser necessário fazer alguma verificação. São retidas amostras de referência ou seja amostras de matéria-prima, material de embalagem ou de produto acabado durante o prazo de validade do lote e também amostras de retenção que é uma amostra de uma unidade totalmente

embalada do lote do produto acabado. A amostra de referência serve para o caso em que seja necessário avaliar o produto em si, enquanto que a amostra de retenção é guardada essencialmente para futura identificação de por exemplo, número de lote ou folheto informativo.

Se forem cumpridos todos os requisitos e verificada a qualidade exigida do fármaco, então a empresa está a fazer um bom trabalho no que respeita ao controlo de qualidade de matérias-primas e produto acabado.

1.1.3.Requisitos Legais da Qualidade Farmacêutica

Em Portugal as entidades reguladoras que supervisionam os setores de produção de medicamentos são: o INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I. P. a nível de medicamentos para uso humano e a DGAV, Direção Geral de Alimentação e Veterinária para os medicamentos de uso veterinário. Sempre que exista um novo medicamento para ser introduzido no mercado ou que sejam efetuadas alterações em um medicamento, é obrigatório que o INFARMED seja informado de tal para que possa conceder a AIM (Autorização de Introdução no Mercado). Periodicamente a indústria farmacêutica que esteja a produzir determinado medicamento, deve enviar para o INFARMED um relatório em como comprova a segurança do mesmo. O INFARMED, tal como a DGAV, efetuam regularmente inspeções às indústrias farmacêuticas para verificar e garantir que todos os produtos, processos e documentação estão conforme o que é suposto [2].

Relativamente à Europa, a *European Medicines Agency*, EMA, é a agência responsável pela avaliação científica de medicamentos produzidos em indústrias farmacêuticas da união europeia, ou seja é o órgão europeu responsável pela proteção da saúde dos humanos e animais [6].

Quando um medicamento está em vias de ser comercializado nos EUA, a FDA tem de o aprovar. A *Food and Drug Administration*, FDA, no caso de produtos farmacêuticos, é responsável por proteger a saúde pública, ou seja, assegura que os medicamentos para uso humano e veterinário são eficazes e principalmente, seguros [7].

Resumidamente, qualquer uma destas entidades tem o objetivo e a missão de garantir que todos os medicamentos em comercialização nas suas zonas são seguros, isto é, que o seu fabrico está autorizado e validado segundo as normas, mas também garantir que os produtos são dotados da qualidade pretendida para o fim a que se destinam.

2.

A Limpeza dos Equipamentos na Indústria Farmacêutica

Cada vez mais o estado da limpeza dos equipamentos e a qualidade da mesma se tem tornado um aspeto bastante importante. Na indústria farmacêutica os equipamentos utilizados para a produção de vários medicamentos podem ser os mesmos, o que é alterado é apenas o medicamento que se está a produzir no momento. Com isto, a FDA no seu regulamento, contém um capítulo dedicado à limpeza, onde entre outros pontos, refere na *guideline* 21CFR 211.67 que: “Os equipamentos e utensílios devem ser limpos, ter uma boa manutenção e higienização em intervalos apropriados para evitar problemas de funcionamento ou contaminação que alterem a segurança, identidade, força, qualidade ou a pureza do medicamento”[8], isto é, qualquer equipamento que contacte com o medicamento que está a ser produzido, deve ser limpo e higienizado de uma forma adequada para prevenir a contaminação entre medicamentos diferentes.

A limpeza dos equipamentos farmacêuticos é um dos parâmetros que mais tem sido alvo de implementação de regulamentação por parte das GMPs, visto ser uma área crítica que influência diretamente a qualidade do medicamento [9]. Para prevenir situações de contaminação do produto final têm sido aplicados e desenvolvidos protocolos de validação do método de limpeza.

2.1. Possíveis Contaminantes dos Fármacos

A FDA afirma na *guideline* 21 CFR 820.70 que: “Cada fabricante deverá estabelecer e manter procedimentos para evitar a contaminação do equipamento ou produto por substâncias que podem ser razoavelmente esperadas que venham a provocar um efeito adverso sobre a qualidade do produto” [10]

Esta é uma das condições impostas pelas GMPs, deve ser prevenida e evitada qualquer possível contaminação no produto final (*vide* Figura 2-1). Uma contaminação é composta por três fases: a fonte da contaminação, substâncias ativas anteriores ou resíduos de agentes de limpeza; o meio de propagação, que podem ser os operadores ou o equipamento, no caso de estar mal limpo; e o recetor, que é a produção seguinte [11].

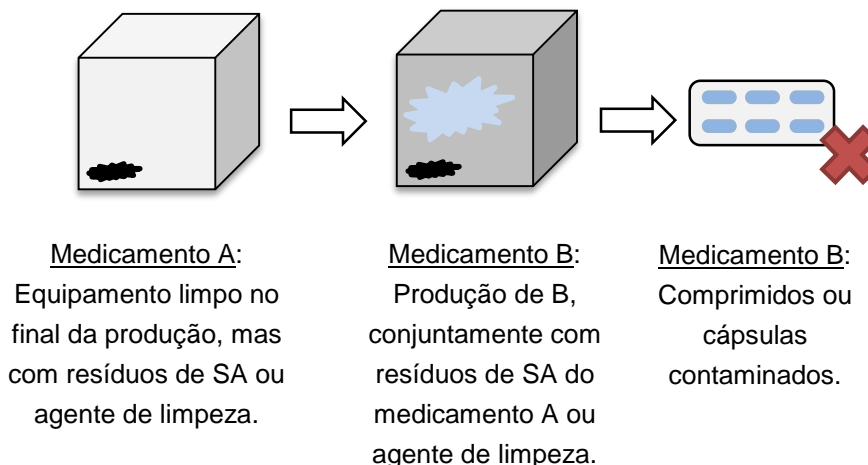


Figura 2-1 - Esquema de possível contaminação no fabrico de medicamentos.

Deste modo existem quatro tipos de possíveis contaminantes:

Agentes de Limpeza

Para a limpeza dos equipamentos são comumente usados agentes de limpeza, como por exemplo: detergentes específicos (de carácter ácido ou básico) para os casos em que a substância a remover tem solubilidade baixa e para os casos em que a substância tem solubilidade elevada até pode ser utilizada apenas água [12].

Quando estes agentes de limpeza são utilizados, deve-se ter em conta que após a limpeza podem ficar alguns resíduos dos mesmos no equipamento, pelo que se deve fazer uma análise a estes resíduos por forma a se analisar qual a quantidade dos mesmos.

Atividade Microbiológica

A presença microbiana é um dos parâmetros que deve ser avaliado, principalmente quando o medicamento que foi produzido é um semissólido, uma solução oral ou oftalmológica [12]. Em qualquer produção de um fármaco não deve existir um excesso de atividade microbiana, nem durante a produção nem depois de efetuada a limpeza dos equipamentos.

De modo a controlar, mas principalmente evitar, que exista uma contaminação microbiana, deve-se monitorizar a humidade das salas bem como dos acondicionamentos dos equipamentos após a limpeza [13].

Contaminantes por materiais diversos

Segundo as normas das GMPs, os equipamentos utilizados devem ser construídos em materiais que não sejam porosos, não reativos, não aditivos e não absorventes. Porém, durante a produção pode existir a libertação de revestimento de alguma superfície ou selante, e também de lubrificantes das máquinas, o que não é desejável [12].

Por vezes também são detetados filamentos de pincéis e de panos de limpeza, fragmentos de luvas, papel e até mesmo pedaços de metal [13].

Contaminação cruzada

A contaminação cruzada entre diferentes medicamentos pode ter consequências graves para o consumidor final. Caso fiquem resíduos de substância ativa ou de um excipiente em algum equipamento, esses resíduos podem misturar-se com os compostos do medicamento seguinte e quando este é ingerido pode provocar reações alérgicas no consumidor que podem afetar a saúde do mesmo.

Neste tipo de contaminação, quando existem resíduos da substância ativa anterior, esta pode vir a diminuir ou mesmo inibir a substância ativa do medicamento que está a ser formulado no momento e por vezes até pode mesmo provocar uma troca de efeito pretendido [13].

2.2. Procedimento e Validação de Limpeza

A validação de limpeza na indústria farmacêutica tem sido uma questão cada vez mais abordada e analisada, pelo que a validação do processo de limpeza se tornou um dos requerimentos das GMPs [14].

A validação de limpeza é requerida para todos os equipamentos que estiveram em contato com o produto ao longo da sua produção, isto para comprovar a pureza do medicamento e também a não existência de contaminação microbiana ou cruzada. Com esta validação o que se pretende é avaliar quais os contaminantes presentes e em caso afirmativo quantificá-los de maneira a que futuramente os resíduos que possam permanecer nos equipamentos não irão comprometer a qualidade e segurança do medicamento [15].

Em termos de documentação, tem de ser elaborado um protocolo de validação. Um bom protocolo deve assegurar que o procedimento de validação de limpeza contempla vários elementos de estudo e que estes foram aprovados, validados.

Para garantir um procedimento de validação de limpeza do equipamento, é necessário assegurar cinco elementos [16]:

- Uma instrução de limpeza por cada equipamento que esteja em contato com o produto durante a sua produção;
- Um método de ensaio que seja adequado e sensível de modo a identificar níveis residuais de substância ativa;
- Um limite residual real que mostre como o equipamento está efetivamente limpo;
- Um protocolo que mostre como a validação foi bem sucedida, que seja assinado e aprovado por técnicos especializados de diferentes áreas.

A validação de limpeza comprova com um elevado grau de certeza se o procedimento de limpeza foi efetivamente eficaz na remoção dos resíduos dos equipamentos. No entanto, a realização de validações torna-se vantajosa a vários níveis, como por exemplo a redução dos custos de qualidade, redução de tempo, menos lotes falhados e concordância com as regulamentações [9].

2.3. Plano Mestre de Validação de Limpeza

Um plano mestre de validação de limpeza, PMVL, tem como objetivo expor o estado das validações de limpeza para os equipamentos utilizados na produção dos medicamentos, de modo a comprovar que os equipamentos estão bem limpos e higienizados, impedindo assim as contaminações já descritas no ponto 2.1.

Para a elaboração de um plano mestre de validação de limpeza, inicialmente torna-se necessária a compreensão das regulamentações da FDA bem como das GMPs e também a

recolha de informação sobre os produtos, equipamentos e procedimentos de limpeza aplicados na fábrica [17].

Após a recolha destes elementos, torna-se possível iniciar um rascunho ou mesmo o documento final do plano mestre de validação de limpeza, que deve ser constituído pelos seguintes pontos:

- As assinaturas de técnicos de diferentes áreas do controlo/garantia da qualidade, em como aprovam o documento redigido;
- O âmbito e o objetivo;
- As responsabilidades, ou seja de quem é a responsabilidade da elaboração e execução do plano;
- Referências, todos os documentos e procedimentos que foram consultados para a elaboração do plano;
- O procedimento/estratégia de validação de limpeza (tabelas resumo em que sejam especificados os produtos, equipamentos, procedimentos e agentes de limpeza; seleccionar as condições para o teste a efetuar; escolher qual o método analítico a utilizar; determinação dos limites);
- Os requerimentos para o protocolo/relatório finais;
- Cronologia das etapas a efetuar;
- Manutenção da validação.

Depois do esboço efetuado, procede-se à organização de toda a informação recolhida. Inicialmente o plano mestre de validação de limpeza deve apresentar as várias atividades que o mesmo impõe. Num primeiro passo descreve-se o modo como as validações irão ocorrer, ou seja especifica-se quais os pontos-chave que devem ser tidos em conta em um processo de limpeza e também como irá ser o plano de validações.

Sabendo quais são os produtos e os equipamentos em que passam, é possível organizá-los em tabelas. Os produtos, podem ser agrupados por famílias, enquanto que os equipamentos estes podem ser organizados com base nos procedimentos ou agentes de limpeza, mas também pela secção fabril. Após este ponto, é possível identificar qual o equipamento e qual o produto pior-caso. O equipamento pior-caso representa todos os equipamentos de determinada secção, pois será o que apresentar uma maior dificuldade de limpeza. Relativamente ao produto pior-caso, este será selecionado com base em determinados fatores como toxicidade, solubilidade e frequência de produção.

Um outro ponto a incluir no PMVL são os critérios de aceitação da validação de limpeza: critério de aceitação visual, microbiológico (que inclui análises microbiológicas) e químico (que inclui testes à substância ativa do produto e ao agente de limpeza). Estes devem ser definidos para demonstrar que a validação de limpeza que se está a efetuar é válida, garantindo por isso

a limpeza efetiva do equipamento. De seguida deve ser especificado qual o plano de amostragem e também como deverá ser desenvolvida a validação do método analítico.

Por fim, deve ser declarado qual o tempo de revalidação de uma validação de limpeza já efetuada e também qual o tipo de controlo que o PMVL deve ter (ou seja sempre que seja introduzido um novo fármaco, equipamento ou alteração de um procedimento de limpeza, o PMVL deve ser alterado e avaliado novamente) [17].

2.4. Validação de Método Analítico para Validação de Limpeza

Uma validação de limpeza implica necessariamente a aprovação de um protocolo de validação do método analítico utilizado para a pesquisa de resíduos que possam estar presentes após a limpeza dos equipamentos.

Deste modo o primeiro passo a efetuar para desenvolver um protocolo de validação de um método analítico é determinar qual o objetivo do mesmo e como deve ser utilizado. A preparação deste protocolo deve seguir um protocolo padrão, onde estão descritos de forma clara os passos a dar na elaboração do mesmo. Os passos a seguir na elaboração de um protocolo de validação de limpeza são [18]:

- Definir o objetivo e o âmbito do método analítico;
- Determinar qual a abordagem da validação e qual o método analítico a aplicar;
- Preparar um procedimento de validação;
- Definir os critérios de aceitação do método;
- Elaborar um método de ensaio provisório (pois podem ser efetuadas alterações ao longo do processo de validação do método);
- Realizar experiências de pré-validação;
- Ajustar os critérios de aceitação se for necessário;
- Aprovar o protocolo elaborado;
- Executar a validação e avaliar os resultados obtidos;
- Efetuar o relatório, rever o mesmo e aprová-lo;
- Arquivar o protocolo e o relatório já aprovados.

2.4.1. Escolha do Método Analítico a Aplicar

Um dos fatores que leva a concluir se um equipamento de produção está efetivamente limpo é o método analítico escolhido para a validação. O método analítico deve ser testado a vários níveis de modo a demonstrar que são confiáveis os resultados obtidos através do mesmo. Quando se delinea a estratégia de validação de limpeza, esta inclui obrigatoriamente a validação de um método analítico, onde devem estar explícitos quais os parâmetros a estudar por forma a garantir uma alta confiança nos resultados obtidos aquando da limpeza [19].

Deste modo o método analítico deve ser capaz de [20]:

- Detetar a substância em estudo a níveis dentro do limite de aceitação;
- Detetar a substância em estudo aquando da presença de impurezas que possam estar presentes na amostra;
- Incluir uma forma de cálculo que consiga converter um resíduo da substância encontrado na amostra para 100%, isto se a recuperação dos dados gerados indicar que a recuperação está fora do intervalo permitido;
- Garantir a estabilidade das amostras, sem possível degradação das mesmas, desde que é realizada a amostragem até à análise.

Existem vários métodos analíticos que podem ser utilizados para este tipo de estudo. No entanto esses métodos podem ser específicos, se detetarem apenas um resíduo ou não específicos, quando detetarem uma variedade de resíduos (*vide* Tabela 2-1) [12].

Tabela 2-1 - Métodos analíticos específicos e não-específicos [12].

Métodos Específicos	Métodos Não-Específicos
Espectrometria próxima do infravermelho (NIR)	Carbono Orgânico Total (TOC)
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	pH
Espectrometria a meio do infravermelho (MIR)	Titulação
Absorção atômica	Condutividade
Electroforese capilar	Gravimetria
Ensaio de enzima imunossorvente (ELISA)	

Numa validação de limpeza o que se pretende é confirmar que o equipamento está devidamente limpo, assim com este estudo pretende-se quantificar o mínimo resíduo que possa existir. Por esta razão e verificando a Tabela 2-1, é necessário um método que seja específico e sensível para que possa identificar possíveis resíduos após limpeza. O escolhido para avaliar a presença de substância ativa neste estudo foi o método específico de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

O HPLC é um método bastante usado em validação de métodos analíticos por ter uma elevada sensibilidade graças aos detetores que possui. Normalmente o detetor mais utilizado é luz ultravioleta (UV), mas por vezes quando os resíduos a detetar não são detetáveis via UV, opta-se por outros como o detetor de dispersão de luz evaporativo (ELSD). O HPLC tem a grande vantagem de ser altamente específico, sensível, e de ser possível utilizar solventes orgânicos para a amostragem com o *swab*, não interferindo estes com a análise [12].

Também foi escolhido o método não-específico de pesquisa de carbono orgânico total, visto que se pretende procurar resíduos de agente de limpeza e de excipientes. O TOC é um

método que pode ser aplicado para a detecção de qualquer resíduo, sendo que esse resíduo deve ser solúvel em água pois o que se analisa é amostras de águas. Este tipo de análise tem algumas vantagens associadas tais como capacidade de detecção de níveis baixos de carbono orgânico total e rapidez de resposta [12].

2.4.2. Escolha do Método de Amostragem

Após a escolha do método analítico a aplicar, deve-se proceder à escolha do método de amostragem. Esta escolha torna-se importante, pois deste modo é possível incorporar testes a este nível durante a validação do método analítico, verificando assim quais as limitações do método de amostragem relativamente à superfície a amostrar. A seleção de um dos métodos de amostragem deve ser consistente e ter como objetivo o de demonstrar que uma possível quantidade residual de substância que possa estar presente no equipamento possa ser realmente detetada [12]. Existem diversos métodos de amostragem que serão apresentados de seguida:

Método de amostragem por swab

Este método baseia-se na eliminação física do resíduo deixado no equipamento após a sua limpeza. Com um *swab* (zargatoa feita de um material macio com a qual se efetuam amostragens em superfícies) humedecido com um solvente, esfrega-se uma zona da superfície do equipamento, de seguida extraem-se com um volume conhecido de solvente os resíduos de substância ativa que possam estar presentes no *swab*. Este resíduo de substância ativa é o que se pretende determinar através do método analítico escolhido.

Método de amostragem por solução de lavagem

Neste caso, analisa-se uma amostra proveniente da última solução de lavagem utilizada para a limpeza do equipamento, e através desta verifica-se se existe resíduo ou não de substância ativa. Deve ser conhecido o volume desta solução e também a área pela qual a mesma passou.

Método de amostragem por placas

Neste método, placas, de área pré-definida, feitas do mesmo material que o equipamento a ser limpo, são afixados no mesmo com o objetivo de passarem por todo o processo de fabrico e limpeza. Após estes dois processos as placas serão analisadas.

Método de amostragem por solvente

Neste método é aplicado à superfície do equipamento um solvente que não é o que é utilizado para a limpeza do equipamento. Isto serve essencialmente para que seja possível a recuperação de outros resíduos que possam estar no equipamento. Este tipo de amostragem pode ser utilizado em conjunto com o método por *swab*.

Método de amostragem por placebo

Este método baseia-se na produção de um lote de placebo logo a seguir ao processo de limpeza. O placebo deve ser idêntico ao produto que irá ser produzido de seguida, isto para averiguar se existem resíduos da limpeza ou SA no equipamento que possam passar para o fármaco.

Método de amostragem por produto

Este método é idêntico ao anterior, mas neste caso é utilizado mesmo o produto e não um placebo. É um método que requer a análise do produto que será produzido de seguida, para determinação de possíveis resíduos do produto anterior.

Método de amostragem direta

Neste método não é utilizada superfície de contato para avaliar a limpeza da superfície dos equipamentos. O que pode ser utilizado nesta avaliação são outros métodos que não exijam contato com a superfície, tal como sondas de medição de espectrofotometria [9].

Foi escolhido o método de amostragem por *swab* para a deteção de SA, pois é um método que se torna vantajoso em relação aos outros por diversas razões: é diretamente amostrada a superfície contaminada; tanto as partículas solúveis como as insolúveis são removidas da superfície do equipamento para o *swab*; algumas zonas do equipamento difíceis de limpar podem ser incorporadas no estudo, pois o *swab* consegue chegar a elas; pode ser aplicado para testes microbiológicos, de pesquisa de SA ou de resíduos de agente de limpeza; e é um método económico[8, 11].

2.4.3. Seleção dos Piores-Casos

Na indústria farmacêutica é frequente a utilização dos mesmos equipamentos para a produção de medicamentos diferentes, mas que pertencem à mesma família. Deste modo é de extrema importância identificar qual o produto pior-caso que é produzido em determinado grupo de equipamentos. Para tal, deve-se ter em conta que a substância ativa, SA, de cada produto apenas pode existir nesse mesmo produto.

Análise de risco

Para determinar qual o produto pior-caso, efetua-se uma análise de risco baseada na análise da criticidade de modos de falha e seus efeitos, FMEA (*vide* 1.1.1), em que são avaliados os produtos produzidos segundo os seguintes parâmetros [21]:

- Solubilidade da SA em água;
- Concentração da SA na formulação;
- Frequência de produção do fármaco;

- Toxicidade da SA;
- Dificuldade de remoção da SA dos equipamentos aquando da lavagem dos mesmos.

Para cada parâmetro são aplicados quatro índices de risco (Tabela 2-1) e a partir destes consegue-se obter qual o índice de risco (IR) para cada produto através da Equação 2.1:

$$IR_{\text{Produto X}} = \text{Equação 2.1}$$

$$= IR_{\text{Concentração de SA}} \times IR_{\text{Toxicidade}} \times IR_{\text{Frequência de Produção}} \times IR_{\text{Dificuldade de Remoção}} \times IR_{\text{Solubilidade}}$$

O produto pior-caso será aquele em que obtiver o índice de risco mais elevado. A tabela 2-2 mostra os índices de risco aplicados à seleção do produto pior-caso.

Tabela 2-2 - Índices de risco aplicados à seleção do produto pior-caso.

Concentração de SA	Índice de risco	Toxicidade ⁽¹⁾	Índice de risco
Sem substância ativa	1	Sem toxicidade	1
Baixo (≤ 30%)	2	Baixa (> 5000 mg/Kg)	2
Médio (31-70%)	3	Média (5000-600 mg/Kg)	3
Alto (> 71%)	4	Alta (< 600 mg/Kg)	4

Frequência de produção ⁽²⁾	Índice de risco	Dificuldade de remoção	Índice de risco
Sem produção	1	Fácil de remover	1
Baixa (≤ 4 lotes)	2	Dificuldade média	2
Média (5-15 lotes)	3	Difícil de remover	3
Alta (≥ 16 lotes)	4	Muito difícil	4

Solubilidade	Índice de risco
Muito solúvel (> 100 g/L)	1
Solúvel (10-100 g/L)	2
Pouco solúvel (1-10 g/L)	3
Insolúvel / Muito pouco solúvel (< 1 g/L)	4

(1) Toxicidade expressa em DL50 em ratos.

(2) Frequência de Produção expressa em número de lotes por ano.

Cálculo do Limite Analítico da Substância Ativa

Em termos oficiais ainda não existem critérios definidos pelos quais se possa guiar para determinar o limite analítico da substância ativa. No entanto o trabalho desenvolvido por Fourman and Mullen na *Eli Lilly*, tem sido o mais citado e utilizado, pelo que será esse método o escolhido para a determinação do LA [22].

Para determinar o limite analítico da substância, é necessário recorrer ao cálculo de outros dois limites: limite de resíduo aceitável, LRA, e limite residual de superfície, LRS.

Limite de Resíduo Aceitável

Com o cálculo deste limite o que se pretende é determinar teoricamente qual a quantidade da substância ativa A que poderá encontrar-se em quantidades residuais em um produto B que seja produzido a seguir ao A. Este limite pode ser calculado de duas formas: baseado na dose do resíduo ou baseado na toxicidade do resíduo.

Cálculo do LRA através da dose do resíduo

Neste cálculo apenas é necessária informação sobre a posologia dos produtos em estudo. Para o produto A, é necessária a mínima dose diária (mDd) de substância ativa que pode ser administrada e para o produto B é necessária a máxima dose diária (MDd) do produto que pode ser tomada por um adulto. Ambas devem estar em concordância ao nível de unidades, ou seja, devem ser expressas em mg ou µg no caso de formas sólidas ou em mL ou L no caso de formas líquidas ou pastosas.

Para além destas duas doses diárias, é também necessário considerar um fator de segurança que varia consoante a forma produzida: 0,01 para formas tópicas, 0,001 para formas orais ou 0,0001 para injetáveis ou formas oftálmicas e produtos que estejam ainda em investigação.

A fórmula a aplicar neste caso será a representada pela Equação 2.2. Caso o valor obtido para o LRA seja superior a 10 µg/g, ou seja 10 ppm, deve-se considerar este mesmo valor como o do LRA.

$$\text{LRA} = \text{FS} \times \frac{\text{mDd de A}}{\text{MDd de B}} \quad \text{Equação 2.2}$$

Cálculo do LRA através da toxicidade do resíduo

No caso de medicamentos recentes ou experimentais, em que as doses não estão completamente estabelecidas por exemplo, o LRA deve contabilizar o consumo aceitável diário (ADI – *Acceptable Daily Intake*) que representa o efeito tóxico da substância no corpo. O ADI pode ser obtido por duas formas:

- a. Para substâncias com poucos dados de toxicidade, através do valor do DL50 (mínima dose letal), valor este que representa o nível de toxicidade que a substância induz em animais, normalmente é expressa em mg por peso do animal, em que metade dos animais laboratoriais morreu. Deste modo convém converter o valor do DL50 para os humanos. Esta conversão pode ser efetuada através de um fator de conversão entre as espécies, que pode ser determinado empiricamente através de uma fórmula desenvolvida por *Layton* [23]. A fórmula a utilizar no cálculo do ADI por esta forma será:

$$\text{ADI(mg/dia)} = \text{DL50 (mg/Kg)} \times \text{P(Kg)} \times \text{F} \quad \text{Equação 2.3}$$

Sendo:

DL50 – mínima dose letal, expressa em mg/Kg

P – peso do corpo humano, expresso em Kg, normalmente aplica-se 60 ou 70 Kg

F – fator que representa a multiplicação entre o fator de segurança, FS, e o fator de conversão entre espécies

- b. Para substâncias em se possui o valor do nível de efeito não observado (NOEL – *No Observable Effect Level*), a fórmula a aplicar será idêntica à anterior:

$$\text{ADI}(\text{mg}/\text{dia}) = \text{NOEL} (\text{mg}/\text{Kg}) \times \text{P}(\text{Kg}) \times \text{FS} \quad \text{Equação 2.4}$$

Sendo:

NOEL – nível de efeito não observado, expresso em mg/Kg

P – peso do corpo humano, expresso em Kg, normalmente aplica-se 60 ou 70 Kg

FS – fator de segurança que depende da via de administração

Deste modo, calculando o ADI para a substância ativa A pelo DL50 ou pelo NOEL, o cálculo do LRA será efetuado através da Equação 2.5.

$$\text{LRA} (\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{\text{ADI de A}}{\text{MDd de B}} \quad \text{Equação 2.5}$$

Tal como no cálculo do LRA baseado na dose do resíduo, caso o valor obtido seja superior a 10 $\mu\text{g}/\text{g}$, ou seja 10 ppm, deve-se considerar este mesmo valor como o do LRA.

Limite Residual de Superfície

Uma vez determinado o limite de resíduo aceitável, o próximo passo é obter o limite residual de superfície, tendo em conta a área da superfície dos equipamentos com os quais os produtos contactam e também o já calculado LRA. Este cálculo depende da área superficial dos equipamentos, e também da quantidade produzida do produto B.

$$\text{LRS} (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \text{LRA} \times \frac{\text{TL}}{\text{SCEP}} \quad \text{Equação 2.6}$$

Sendo:

LRA – limite de resíduo aceitável, expresso em $\mu\text{g}/\text{g}$

TL – tamanho de lote do produto B, expresso em g

SCEP – área da superfície do equipamento em contacto com os produtos, expresso em m^2 , cm^2 ou mm^2

Relativamente ao cálculo do SCEP, este pode ser efetuado para apenas um equipamento ou para todos os equipamentos pelos quais passem tanto o produto A como o produto B. No caso de este cálculo ser efetuado apenas para um dos equipamentos, então será para este que a validação de limpeza irá ser efetuada. Ao se considerar esta área, está-se a considerar que toda a superfície dos mesmos está contaminada uniformemente.

Limite Analítico

Após estabelecidos os dois limites anteriores, LRA e LRS, torna-se possível o cálculo do limite analítico, LA.

O LRA e LRS não são avaliados pelo procedimento analítico, mas o LA já o é. Normalmente é quantificada a substância ativa presente em uma solução que é resultado do *swabbing* efetuado numa pequena zona da superfície do equipamento, ou presente em uma solução de lavagem do equipamento. Segundo isto, existem duas possibilidades de cálculo para o limite analítico:

Quando a amostragem é efetuada com *swab*

$$LA (\mu\text{g/mL}) = LRS \times ASA \times \frac{FR}{VS} \quad \text{Equação 2.7}$$

Sendo:

LRS – limite residual de superfície, expresso em $\mu\text{g/cm}^2$

ASA – área da superfície de amostragem, expresso em cm^2

FR – fator de recuperação para a extração do *swab*, da substância ativa com o solvente usado

VS – volume de solvente utilizado para a extração da substância do *swab*, expresso em mL

Quando a amostragem é efetuada com solvente de lavagem

$$LA (\mu\text{g/mL}) = LRS \times ASL \times \frac{FR}{VL} \quad \text{Equação 2.8}$$

Sendo:

LRS – limite residual de superfície, expresso em $\mu\text{g/cm}^2$

ASL – área da superfície lavada, expresso em cm^2

FR – fator de recuperação para a extração do *swab*, da substância ativa com o solvente usado

VL – volume total de solvente de lavagem, expresso em mL

O valor encontrado para o limite analítico é o valor ao qual os resultados analíticos devem obedecer. Este deve ser apropriado à validação de limpeza a efetuar, deve-se conseguir determiná-lo pelo método analítico escolhido e deve ser passível de ser atingido sem dificuldades [12], [22].

2.4.4. Parâmetros da Validação do Método Analítico

De modo a saber quais os parâmetros que devem ser testados neste tipo de validação, a ICH, USP e FDA, desenvolveram *Guidelines* onde especificam quais os parâmetros necessários. A ICH desenvolveu as *Guidelines for Validation of Analytical Procedures (Q2(R1) - Analytical Validation)*[24], onde identifica quais os parâmetros a testar no procedimento de validação: exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermédia), especificidade, limite de deteção, limite de quantificação, linearidade e robustez. Estes parâmetros são comuns aos exigidos pela USP, sendo que esta no capítulo 1225 – *Validation of Compendial Procedures* [25], ainda refere como parâmetro a incluir no estudo a gama, que está associada à linearidade. Também a FDA faz recomendações neste âmbito, na seção 211.165 – *Testing and release for distribution* [26], referindo que requer para este tipo de validações testes ao nível da exatidão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Para além destes quatro parâmetros obrigatórios, a FDA ainda aconselha testes ao nível da recuperação, e estabilidade das soluções analíticas [18].

Neste estudo foram efetuados testes aos seguintes parâmetros: limite de quantificação, seletividade, precisão, repetibilidade, exatidão, linearidade e estabilidade do analito nas soluções analíticas e no equipamento, por forma a testar a maior parte dos parâmetros recomendados pelas três entidades referidas.

Tabela 2-3 – Comparação entre os parâmetros recomendados pela ICH, USP, FDA e os utilizados no estudo [17, 23–25].

ICH	USP	FDA	Utilizados no estudo
Exatidão	Exatidão	Exatidão	Exatidão
Precisão	Precisão	Sensibilidade	Precisão
- Repetibilidade	- Repetibilidade	Especificidade	- Precisão do sistema
- Precisão intermédia	- Precisão intermédia	Reprodutibilidade	- Repetibilidade
Especificidade	Especificidade	Recuperação	Seletividade
Limite de Deteção	Limite de Deteção	Estabilidade das soluções analíticas	Limite de Deteção
Limite de Quantificação	Limite de Quantificação		Limite de Quantificação
Linearidade	Linearidade e Gama	-	Linearidade e Gama
Robustez	Robustez		Estabilidade do analito nas soluções analíticas e no equipamento

Linearidade e Gama

A capacidade de obter resultados que são diretamente proporcionais às concentrações das amostras contendo o analito é definida por linearidade. A linearidade do método analítico pode ser demonstrada através da análise de várias soluções diferentes de concentração de analito elaboradas a partir de uma solução-mãe ou por pesagens em separado dos componentes do produto.

Quando a análise é realizada com soluções de concentrações de analito conhecidas, o objetivo é obter respostas que sejam diretamente proporcionais à concentração. Esta avaliação é efetuada através de um gráfico em que no eixo das ordenadas sejam representadas as áreas dos picos e no eixo das abcissas as respectivas concentrações, deste modo é possível a construção de uma regressão linear em que a interceção não seja significativamente diferente de zero, o que comprova uma gama linear. Para esta análise, a ICH recomenda que no mínimo sejam analisadas cinco concentrações de analito diferentes.

Relativamente à gama para a qual o processo analítico irá ser validado, esta corresponde ao intervalo entre a solução de menor concentração e a solução de maior concentração de analito que tenham sido testadas na fase de apuramento da linearidade. Este intervalo comprova que o procedimento analítico tem um bom nível de precisão, exatidão e linearidade [23, 24, 26].

Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados obtidos pela aplicação sucessiva do método, a múltiplas tomas de uma amostra homogénea. Pode ser avaliada a dois níveis: precisão do sistema analítico e repetibilidade do método.

Precisão do sistema

A precisão do sistema é analisada por forma a verificar qual a variação que o sistema analítico utilizado pode estar a introduzir no processo de validação. Devem ser analisadas soluções analíticas de concentração conhecida e os respetivos desvios padrão, sendo que a partir destes se deve concluir sobre a precisão do sistema.

Repetibilidade

De modo a determinar qual a repetibilidade do método analítico devem ser estudadas, sem alteração das condições experimentais, em *swabs* e placas de aço-inox, onde sejam aplicadas quantidades conhecidas de uma solução analítica de concentração conhecida. Segundo a ICH, esta análise deve ser feita com um mínimo de 6 determinações para cada e a sua validade é comprovada pelo desvio padrão obtido nas respostas [23, 24].

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção e de quantificação estão interligados no que diz respeito à sua determinação. Assim deste modo é apresentada a Tabela 2-4 com o objetivo de uma melhor percepção dos mesmos.

Tabela 2-4 - Limite de Detecção e Limite de Quantificação [24].

Limite de Detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
Entende-se que é a concentração de analito mais baixa que o método analítico consegue detetar, mas não necessariamente quantificar com valor exato.	Entende-se que é a concentração mais baixa do analito que o método analítico consegue detetar e quantificar com exatidão e precisão.
Segundo a ICH, existem os seguintes modos de determinação:	
Baseado na avaliação visual	
O LD é determinado através da análise de amostras de concentração de analito conhecidas e também através da estabilização de uma concentração mínima de analito que possa ser detetada com segurança.	O LQ é determinado através da análise de amostras de concentração de analito conhecidas e também através da estabilização de uma concentração mínima de analito que possa ser quantificada e aceite com exatidão e precisão.
Baseado no sinal-ruído	
A determinação é efetuada com base em respostas de amostras com concentrações baixas conhecidas de analito e respostas a partir de “brancos” ou de linhas de base sem picos visíveis.	
Se a razão sinal-ruído for de 3:1 ou 2:1, então o LD obtido pode ser aceite	Se a razão sinal-ruído for de 10:1, então o LQ obtido pode ser aceite
Baseado no desvio-padrão da resposta e do declive	
A estimativa do LD pode ser calculada pela fórmula: $LD = \frac{3,3\sigma}{S}$ Equação 2.9	A estimativa do LQ pode ser calculada pela fórmula: $LQ = \frac{10\sigma}{S}$ Equação 2.10
Sendo σ o desvio padrão da regressão e S o declive da curva de calibração. S pode ser estimado a partir da curva de calibração construída para a linearidade, enquanto σ pode ser estimado por uma das seguintes formas:	
<u>Baseado no desvio padrão do branco:</u>	
A determinação do σ é efetuada analisando um número adequado de amostras de “branco” e do cálculo do desvio padrão dessas respostas.	
<u>Baseado na curva de calibração:</u>	
Ao ser estudada uma curva de calibração de soluções que contêm o analito, consegue-se obter o desvio padrão da regressão linear ou o desvio padrão da interceção y da linha de regressão. Qualquer um destes desvios-padrão pode ser usado para o σ .	

Exatidão/Recuperação

A exatidão de um procedimento analítico é definida como a concordância entre o valor real convencional e o valor encontrado no estudo.

O valor real para avaliação da exatidão pode ser testado de duas formas:

- A primeira baseia-se em comparar os resultados obtidos no método com resultados de referência já estabelecidos, neste caso admite-se que a incerteza deste método de referência é conhecida;
- A segunda assenta na análise de soluções com concentrações conhecidas comparando estes resultados com resultados reais de referência. Caso não estejam disponíveis materiais de referência, os resultados obtidos podem ser comparados a uma amostra em branco de concentração conhecida.

A forma aplicada neste trabalho foi a segunda, em que se analisa qual a recuperação do analito a dois níveis: recuperação do *swab* para o solvente e recuperação da placa para o *swab* e deste para o solvente.

A exatidão deve ser testada em toda a gama de trabalho pelo que, a ICH recomenda que sejam efetuadas no mínimo nove determinações repartidas por três níveis diferentes de concentração. Assim, tanto para a recuperação do *swab* como para a recuperação da placa para o *swab* e solvente deverão ser testadas três concentrações com três repetições cada uma.

Os resultados da exatidão deverão ser apresentados em percentagem de recuperação por doseamento da quantidade adicionada conhecida do analito ao *swab* ou placa. Se os passos realizados neste ensaio forem validados, o fator de recuperação determinado para diferentes concentrações será utilizado para corrigir os resultados finais do estudo [24, 26].

Seletividade

A seletividade ou especificidade é designada como a capacidade do método para detetar o analito na presença de possíveis interferentes existentes na amostra tal como impurezas, produtos degradados, resíduos dos *swabs* ou mesmo dos equipamentos, interferências provocadas pelo solvente utilizado ou pelos agentes de limpeza [25]. Para a verificação da seletividade do método analítico devem ser realizadas análises às seguintes amostras:

- Soluções padrão de concentração do analito conhecidas, mas diferentes;
- Solvente utilizado;
- Soluções contendo os agentes de limpeza;
- “Branco” de *swab* ou “branco” de placa;
- Amostras de recuperação de *swab* e de placa.

A ICH enuncia que a seletividade só pode ser comprovada caso não existam interferências elevadas para com o analito, ou caso estas existam, que sejam baixas não interferindo com o mesmo [25].

Estabilidade do analito nas soluções analíticas e no equipamento

A estabilidade do analito é um dos parâmetros mais importantes a estudar numa validação de método analítico. Ao serem efetuados diferentes testes de estabilidade torna-se possível determinar qual o tempo útil entre a recolha das amostras para a validação de limpeza do equipamento e a sua respetiva análise. O principal objetivo deste parâmetro é avaliar se a substância ativa se degrada ao longo do tempo pelo que deve ser estudada: a estabilidade da solução problema e padrão, estabilidade da substância no equipamento e estabilidade do produto no equipamento.

Todas as amostras utilizadas neste estudo, devem ser preparadas a partir de uma solução-mãe do analito preparada na hora com o solvente adequado e concentração conhecida. Tanto para a estabilidade da solução problema e padrão como para a estabilidade da substância no equipamento, as soluções devem ser analisadas na hora e após, no mínimo, 6h, perante condições de temperatura ambiente com exposição à luz e temperatura de frigorífico ao abrigo da luz. No 2º tempo de análise deve ser preparada e analisada novamente uma solução mãe para verificar qual foi a degradação do analito através do desvio encontrado entre as respostas obtidas [27].

Relativamente à estabilidade do produto no equipamento, esta pretende avaliar também qual a degradação do fármaco no equipamento, mas também qual o tempo máximo em que é possível produzir lotes seguidos. As condições deste estudo passam por deixar o produto em uma placa de aço-inox durante X tempo à exposição da luz. A estabilidade é obtida através da diferença de resultados entre o dia zero e o dia X do estudo.

2.5. Validação de Limpeza para cada Equipamento

Após a validação e aprovação do método analítico a utilizar, segue-se a validação de limpeza para cada equipamento utilizado na produção dos fármacos. Antes de efetuar as validações de limpeza, deve ser elaborado para cada equipamento um protocolo/relatório de validação de limpeza que deve conter os seguintes pontos [9]:

- Código interno da empresa, versão do documento e data;
- Verificação e aprovação do documento por elementos que integrem o setor da produção e da garantia da qualidade;
- Objetivo do processo de validação;
- Responsável pela execução e aprovação do estudo de validação;
- O intervalo temporal entre o fim do processo de fabrico e o início do processo de limpeza;

- O número de ciclos de limpeza a serem testados;
- O procedimento de limpeza aplicado a cada equipamento ou peça específica;
- Testes a efetuar a cada equipamento;
- Os procedimentos de amostragem e os pontos críticos para a mesma;
- Dados sobre o método analítico, caso sejam necessários;
- Critérios de aceitação;
- Resultados e avaliação da validação;
- Discussão de possíveis desvios ao estudo;
- Conclusões e recomendações;
- Critérios de revalidação.

Os testes/amostragens a efetuar a cada equipamento só podem ser efetuados após limpeza de mudança de produto para o caso do produto pior-caso A. Devem ser efetuados quatro testes a cada equipamento:

Inspeção Visual

Antes de ser efetuado qualquer um dos testes seguintes, deve ser efetuada uma inspeção visual ao equipamento e à sala onde o mesmo se encontra. Este parâmetro é um método de detecção na hora de custo nulo para a empresa e de extrema importância, pois caso seja visível alguma sujidade no equipamento após o procedimento de limpeza, esta não deve ser considerada e tem de se proceder a uma nova limpeza.

Segundo Fourman e Mullen, os resíduos que poderão encontrar-se em um equipamento apenas são visíveis a olho nu a cerca de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, valor este que pode ser aumentado em caso de utilização de uma lanterna ou caso as substâncias presentes no equipamento possuam cor [22].

A inspeção visual deve ser efetuada sempre antes de qualquer amostragem como forma de garantir que todo o equipamento e respetiva sala se encontram limpos.

Pesquisa de Resíduos de Detergente ou outro Agente de Limpeza

Quando se pretende pesquisar resíduos de detergente ou de outro agente de limpeza, normalmente é escolhido o método não-específico de detecção do carbono orgânico total, TOC.

A determinação do TOC é um método indireto de contabilizar as substâncias orgânicas presentes na água para uso farmacêutico, mas também para avaliação da limpeza dos equipamentos após a produção. A análise de TOC é bastante sensível visto que consegue detetar analitos em muito baixa concentração, em partes por bilião (ppb), no entanto qualquer composto que contenha carbono orgânico será detetado e contabilizado [28].

Qualquer aparelho de medição de TOC para águas de utilização farmacêutica, tem em comum a oxidação das moléculas orgânicas presentes na água para produzir dióxido de carbono. O aparelho, o que faz é acidificar a amostra sob uma atmosfera de azoto ou de outro gás inerte, transformando o carbono presente na amostra em dióxido de carbono. De seguida, é quantificado e removido o carbono inorgânico, ficando apenas o carbono orgânico para determinação. Este pode ser obtido através da subtração do carbono inorgânico ao carbono total, devolvendo o valor do carbono orgânico [29]. Em termos de limites, o recomendado é que os valores obtidos de TOC sejam inferiores a 10 ppm [30], no entanto é possível calcular teoricamente o valor esperado através do Limite Analítico e da área do equipamento utilizada para esta análise.

A recolha destas amostras pode ser efetuada depois de uma limpeza de mudança de produto ou após a limpeza da produção de um outro produto que não seja o produto pior-caso A, pois pretende-se analisar a presença de resíduos de detergente ou de agente de limpeza.

Pesquisa de Atividade Microbiológica

A contaminação microbiológica é um fator a ter em conta. Basta a existência de um único microrganismo e de condições favoráveis (como temperatura adequada e alguma humidade) na superfície do equipamento, para que este se desenvolva e se multiplique originando uma contaminação considerável. Por serem patogénicos, a presença de microrganismos como *E. Coli*, *Salmonella* ou *Enterococcus* deve ser nula [22].

Deste modo, as condições de armazenagem do equipamento antes e depois da limpeza devem ser consideradas e avaliadas com o objetivo de garantir a não proliferação microbiana acima dos valores estabelecidos na legislação. Os limites recomendados para as superfícies dos equipamentos correspondem aos limites para placas de contacto com 55mm de diâmetro, para as classes C e D de áreas limpas durante a produção (*vide* Tabela 2-5) [31].

Tabela 2-5 - Limites recomendados para contaminação microbiológica em áreas limpas [31].

Classe	Limite recomendado para contaminação microbiana (UFC's / placa)
C	≤ 25
D	≤ 50

A amostragem microbiológica pode ser efetuada depois de uma limpeza de mudança de produto ou após a limpeza da produção de um outro produto que não seja o produto pior-caso A, pois neste caso, a existência ou não de resíduos de SA não irá interferir com os resultados desta análise.

Pesquisa de Resíduos de Substância Ativa

A determinação de resíduos de Substância Ativa é o parâmetro mais importante de uma validação de limpeza. Esta pesquisa assenta na procura de resíduos ínfimos que possam estar presentes nos equipamentos após a limpeza dos mesmos.

As amostras são efetuadas aos equipamentos com recurso a *swabs*, e a análise das mesmas é efetuada em um aparelho de HPLC, pois foi este o método de amostragem e o método analítico escolhidos para a validação do método analítico, verificar o ponto 2.4.1 e 2.4.2. A determinação da SA nas amostras é efetuada comparando os resultados das mesmas com o resultado de uma solução padrão de concentração igual ao limite analítico da substância a procurar. O que se pretende é que a pesquisa seja inferior ao limite analítico, pois caso contrário (*vide* seção 2.1) a existência de resíduos de SA pode influenciar negativamente o efeito que se espera do medicamento a produzir de seguida.

A amostragem para pesquisa de resíduos de SA deve ser efetuada obrigatoriamente após a limpeza dos equipamentos aquando da produção do produto pior-caso A, para que se possa avaliar com exatidão a existência ou não de resíduos de substância ativa.

Estes quatro testes são imprescindíveis a uma validação de limpeza, sem a sua execução em pelo menos 3 lotes em que ocorra de seguida mudança de produto, a validação de limpeza do equipamento não será considerada. Para além dos testes terem de ser realizados 3 vezes, os resultados dos mesmos deverão ser sempre inferiores aos limites pré-definidos para cada avaliação.

Qualquer uma das amostragens deve ser recolhida e analisada o mais rapidamente possível. A amostragem a um dos três lotes deve ser realizada após no mínimo 2 dias de ter sido limpo o equipamento, isto para que se possa avaliar qual a validade da limpeza efetuada. Em um outro lote deve ser criada a situação de pior limpeza, em que neste caso os equipamentos só devem ser limpos depois de a produção ter terminado à pelo menos 24h.

3.

Materiais e Métodos Utilizados

Neste trabalho foram estudados dois fármacos diferentes, ambos pertencentes à família das cefalosporinas e produzidos na seção FSO3 dos Laboratórios Atral. Por motivos de confidencialidade, não serão especificados os medicamentos envolvidos no estudo nem as substâncias ativas dos mesmos.

3.1. Equipamentos incluídos no estudo

Os equipamentos a testar neste estudo pertencem todos à seção do FSO3. Neste ponto, apresenta-se os sete equipamentos com uma pequena descrição dos mesmos e das suas instruções de limpeza no caso de mudança de produto. As descrições apresentadas de seguida para o Tamisador, Misturador Bicónico, Compactadora e Máquina de Comprimir são relativas à mudança de produto para o caso do primeiro produto estudado. No entanto para o segundo produto, o método de limpeza é o mesmo, diferindo apenas nas soluções de lavagem utilizadas ou seja, para este caso não é utilizada a solução de lavagem de lixívia eletrolítica a 2%.

O detergente utilizado na limpeza dos equipamentos é neutro, contendo na sua composição 5 a 15% de tensoativos aniônicos, menos de 5% de tensoativos não iônicos, agentes condicionadores e excipientes. A lixívia eletrolítica é composta essencialmente por hidróxido de sódio.

Câmara de Pesagem

A Câmara de Pesagem tem como principal função a pesagem das substâncias ativas e excipientes, necessários para produção dos lotes dos produtos farmacêuticos. É composta por uma balança de prato assente no chão, um registador de dados, uma bancada de apoio, tomadas, fluxo laminar e lamelas para resguardo da zona.

A limpeza inicia-se aspirando toda a câmara de pesagem. De seguida, na sala de lavagem, prepara-se uma solução de detergente diluindo 20mL de detergente em 20L de água. Com um pano adequado embebido na solução anterior e um utensílio extensível passa-se toda a câmara de pesagem, lavando-a de seguida com água quente. A mesa de apoio deve ser lavada com um pano embebido na solução de detergente e a balança com um pano embebido com água quente. O chão deve ser lavado com a solução de detergente e passado de seguida por água quente. No final todas as superfícies têm de ser passadas por água purificada e secas com um pano seco.



Figura 3-1 - Câmara de Pesagem.

Tamisador

O tamisador tem como função peneirar os pós que são necessários à produção do medicamento. É composto por uma parte cilíndrica por onde é introduzido o pó, seguidamente este passa por uma rede por forma a ser peneirado e sai por gravidade através do tubo de descarga.

A limpeza do tamisador inicia-se com a aspiração de todo o equipamento. Prepara-se de seguida uma solução de lixívia eletrolítica ~2% (cerca de 9L de água + 400mL lixívia eletrolítica) e uma solução de detergente (cerca de 9L de água quente com cerca de 30mL de detergente). Primeiramente lava-se todo o tamisador e respetivas peças com a solução de lixívia eletrolítica e um pano adequado. De seguida lava-se todo o equipamento e peças com um pano embebido com a solução de detergente. No final passa-se todo o tamisador e respetivas peças por água quente e por água purificada.



Figura 3-2 - Tamisador.

Misturador Bicónico

O misturador bicónico a validar serve essencialmente para misturar a substância ativa com os diversos excipientes que compõem uma formulação. Este foi construído para ter uma capacidade de 400L em aço-inox tipo 316L. Tem uma tampa movível na parte superior (carregamento) e outra na parte inferior (descarregamento).

A limpeza do misturador começa por um enxaguamento com água quente. De seguida, enche-se o mesmo com água quente até à marca branca assinalada na Figura 3-3, adiciona-se 6,320L de lixívia eletrolítica, fecham-se as tampas movíveis e coloca-se o misturador a rodar cerca de 10 minutos.

Com o misturador inclinado, retira-se a tampa maior e mergulha-se um pano nesta solução: limpa-se a tampa e a borracha da mesma. Seguidamente faz-se o escoamento da solução de lixívia eletrolítica e enxagua-se o misturador com água quente. Os passos seguintes são idênticos aos anteriores, mas em vez de se adicionar lixívia eletrolítica, adiciona-se cerca de 200mL de detergente. Após estes procedimentos, coloca-se 10L de água purificada no misturador, fecha-se o mesmo, e fica a rodar durante 5min. Efetua-se o escoamento da água e passa-se com um pano seco por fora do misturador, pela tampa maior e borracha para retirar o excesso de água.



Figura 3-3 - Misturador Bicónico.

Compactadora

A compactadora a validar é constituída por 2 rolos, uma tremonha de alimentação (com agitador), transporte do pó aos rolos por sem-fim, compactação em rolos e granulação. O princípio de funcionamento consiste na alimentação do pó ao sem-fim, o qual promove o transporte do pó até aos rolos. A distância muito pequena entre os 2 rolos promove a compactação do pó, formando placas de pó aglomerado compactado. Essas placas caem por gravidade no granulador, onde é feita a granulação e o pó é recolhido por gravidade.

Para a limpeza é necessária uma solução de lixívia eletrolítica~2% (cerca de 9L de água + 400mL lixívia eletrolítica) e uma solução de detergente (cerca de 9L de água quente com cerca de 30mL de detergente). Inicialmente aspira-se toda a máquina e respetivas peças. Lava-se toda a máquina com a solução de lixívia eletrolítica. Seguidamente lava-se com a solução de detergente, passa-se com água quente, de seguida com água purificada e seca-se a máquina com um pano seco.

Relativamente às peças da máquina, estas são lavadas com a solução de lixívia eletrolítica e de seguida com a solução de detergente. Após estes passos, as peças são passadas por água purificada, espera-se que sequem e são acondicionadas em sacos de polietileno bem rotulados.



Figura 3-4 - Compactadora.

Máquina de Comprimir e Despoeirador

A máquina de comprimir a validar é rotativa com 22 estações de compressão. A alimentação do pó é feita por gravidade à matriz de distribuição do pó (velocidade de distribuição do pó variável). A compressão é efetuada por dois rolos, de altura ajustável, em 2 estações - pré-compressão e compressão principal. Ainda contém uma rampa de descarga dos comprimidos com estação de rejeição.

A limpeza desta máquina começa pela aspiração da mesma e respetivas peças. De seguida prepara-se uma solução de lixívia eletrolítica~2% (cerca de 9L de água + 400mL lixívia eletrolítica) e uma solução de detergente (cerca de 9L de água quente com cerca de 30mL de detergente). Com um pano embebido na solução de lixívia eletrolítica lava-se a estrutura da máquina, o prato e respetivas peças, com exceção das matrizes e punções. Seguidamente passam-se os constituintes anteriores por álcool a 96%. As restantes peças da máquina, matrizes

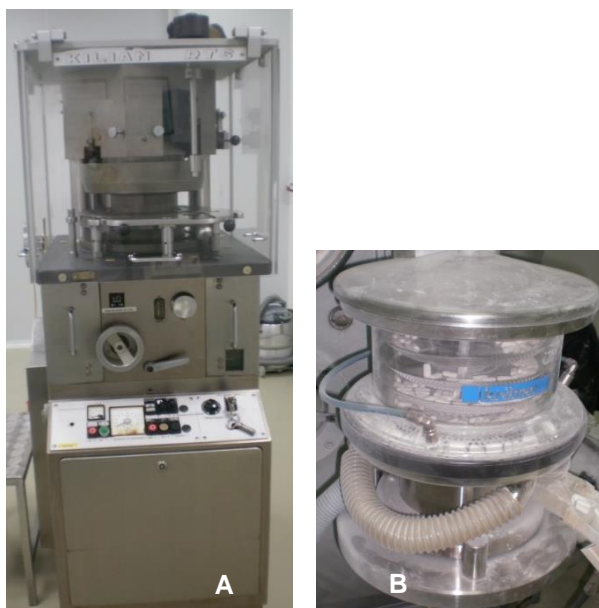


Figura 3-5 - Máquina de Comprimir (A) e Despoirador (B).

e punções são lavados com a solução de detergente, passados por água quente e no fim por água purificada. Após este ponto, os punções e matrizes são passados com um pano embebido em álcool a 96% e de seguida são lubrificadas com parafina. As restantes peças, depois de secas são colocadas em sacos de polietileno com rótulo adequado.

O despoirador a validar serve essencialmente para fazer o despoiramento dos comprimidos. Este equipamento regula a frequência e intensidade de vibração, fazendo com que os comprimidos sejam transportados através de uma rampa, em forma de hélice perfurada. A vibração permite a libertação do pó agregado ao comprimido, o qual é recolhido por um sistema de aspiração. A descarga dos comprimidos é feita diretamente para uma barrica de acondicionamento. Tal como para a máquina de comprimir, primeiramente o despoirador é aspirado. De seguida todas as peças são lavadas com uma solução de lixívia eletrolítica e posteriormente são lavadas com uma solução de detergente. Todas as peças são enxaguadas com água quente e passadas por água purificada. Depois de bem secas são acondicionadas em sacos de polietileno bem rotulados.

Bacias de Revestimento

As bacias de revestimento são de forma idêntica a uma esfera com uma abertura na parte superior, onde são revestidos os comprimidos. Na parte superior é por onde se introduzem os comprimidos a revestir. Também nesta zona é onde se encontra a pistola que aplica a suspensão/solução de revestimento em forma de *spray* e ainda uma entrada de ar quente e uma saída desse mesmo ar.

A limpeza das bacias começa por adicionar às mesmas 57,3L de água quente e cerca de 2,670L de lixívia eletrolítica, colocando a mesma a rodar cerca de 15min. De seguida despeja-se a bacia, adiciona-se mais 60L de água quente e coloca-se a rodar 10min. Repete-se este processo mais uma vez mas com 60L de água purificada. No final seca-se a bacia com um pano

adequado e cobre-se a mesma com um plástico para evitar contaminações. Relativamente aos tubos de extração e insuflação de ar quente, a limpeza dos mesmos depende do tipo de revestimento aplicado aos comprimidos se é do tipo *opatint* ou do tipo *opadry*. Para o primeiro tipo, os tubos são lavados com uma solução de lixívia eletrolítica a 2%, de seguida são passados por água quente e por água purificada. Para o segundo tipo de revestimento, apenas é utilizada água quente e água purificada.



Figura 3-6 - Bacia de Revestimento.

No final do processo de lavagem os tubos são bem secos com um pano adequado e são acondicionados em sacos de polietileno bem rotulados.

Máquina de Blisterar

Este equipamento tem por função enclausurar o produto (comprimidos ou cápsulas), por meio de blister, de modo a assegurar a sua proteção contra o meio exterior, facilitar a sua identificação e transporte.

A alimentação de produto é feita através do enchimento do distribuidor (não visível na Figura 3-7). Os comprimidos descem pelos tabuleiros e depositam-se nos alvéolos respetivos formados previamente na folha de formação. Posteriormente a folha de formação recebe uma película na parte superior – folha de cobertura – fazendo-se a selagem dos alvéolos por meio de compressão de placas recartilhadas aquecidas. As operações seguintes contemplam a codificação, pré-corte e corte dos blisters.

A limpeza da máquina de blisterar consiste em aspirar toda a máquina, passar todas as peças e máquina com um pano embebido em água e seguidamente com um pano embebido em álcool a 96%. No final, deve ser seca com um pano seco que não largue fios.



Figura 3-7 - Máquina de Blisterar.

3.1.1. Definição dos pontos críticos de cada equipamento

Os equipamentos acima descritos foram analisados no seu local de operação e a partir desta análise foram identificados os pontos críticos de cada um para a amostragem microbiológica, análise de resíduos de detergente e determinação de resíduos de SA.

Para a recolha das amostras para análise TOC foram escolhidas peças pelas quais fosse possível a passagem da água com baixo teor TOC e a amostra fosse recolhida diretamente. Em casos em que tal não será possível, escolhem-se determinadas peças que possam ser mergulhas em um recipiente que contenha água com baixo teor TOC e a partir deste faz-se a recolha da amostra. Relativamente às amostragens para determinação microbiológica e determinação de resíduos de SA, os pontos críticos foram escolhidos com base nos locais de mais difícil acesso para a limpeza que poderão por isso, ser sujeitas a mais acumulação de microrganismos e substância ativa.

Os pontos críticos escolhidos por equipamento encontram-se da Tabela 3-1 à Tabela 3-7, assinalados a preto os locais de recolha das amostras de substância ativa (linha a cheio corresponde à amostra A, enquanto que a linha a tracejado corresponde á amostra B) e a branco os locais de recolha das amostras para determinação de atividade microbiana.

Tabela 3-1 - Pontos críticos de amostragem da câmara de pesagem.
A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

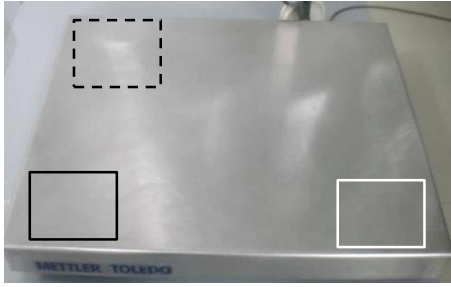
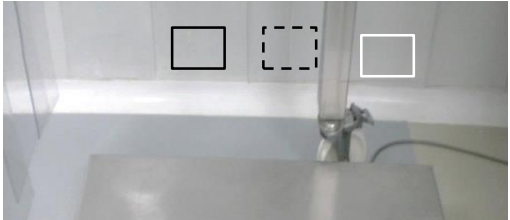
Ponto Crítico	Local de Amostragem
Câmara de Pesagem	
1 - Prato da Balança de Chão	
2 - Lamelas	

Tabela 3-2 - Pontos críticos de amostragem do tamisador.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

Ponto Crítico	Local de Amostragem
Tamisador	
<p>1 - Rede</p>	
<p>2 – Rebordo interno</p>	
<p>3 – Saída de pó (a amostragem para determinação de SA é realizada na zona inferior e a amostragem para a determinação de atividade microbiana é efetuada na zona superior)</p>	

Tabela 3-3 - Pontos críticos de amostragem para o misturador bicônico.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

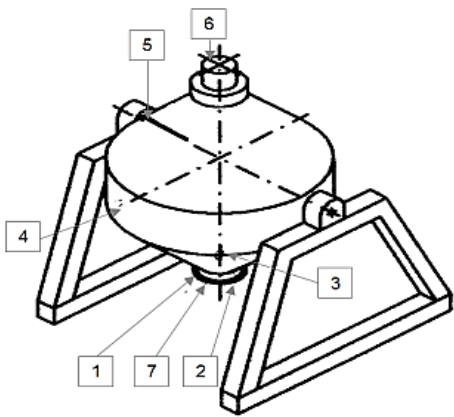

Ponto Crítico	Local de Amostragem
Misturador Bicônico	
1 – Rebordo interno da abertura larga com tampa amovível	
2 – Borracha amovível da tampa	
3 – Bisel a meio do equipamento (superfície lisa com uma curvatura)	
4 – Ponto central entre os biséis	
5 – Ponto central entre os biséis (do lado contrário ao ponto 4)	
6 – Tampa pequena	
7 – Tampa grande	
	

Tabela 3-4 - Pontos críticos de amostragem para a compactadora.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

Ponto Crítico	Local de Amostragem
Compactadora	
1 – Rolos	

Tabela 3-4 - Pontos críticos de amostragem para a compactadora (continuação).
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

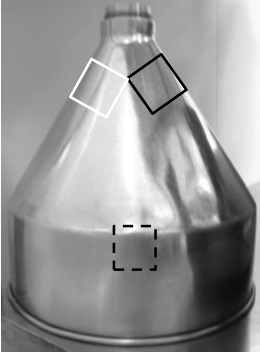
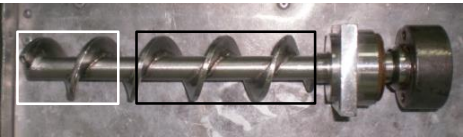
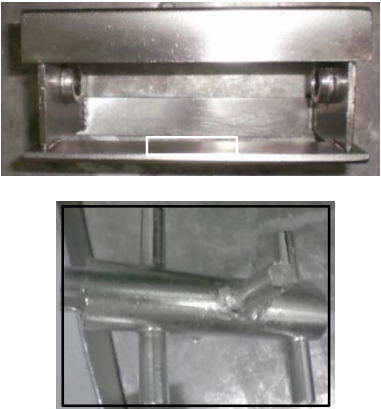
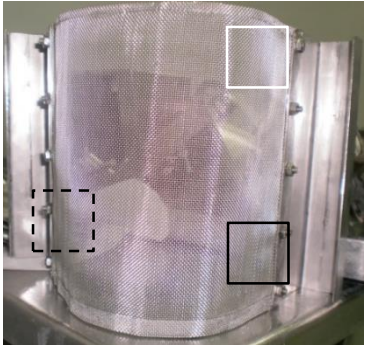
Ponto Crítico	Local de Amostragem
<p>2 – Depósito (todas as amostragens são efetuadas na parte interior)</p>	
<p>3 – Sem-Fim</p>	
<p>4 – Granulador (A amostragem microbiológica é efetuada na peça do granulador. A amostragem para pesquisa de substância ativa é efetuada em todo o granulador)</p>	
<p>5 – Rede</p>	

Tabela 3-5 - Pontos críticos de amostragem para a máquina de comprimir e despoeirador.
A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

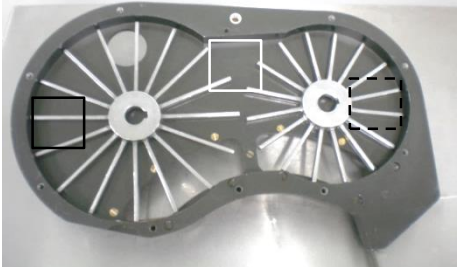
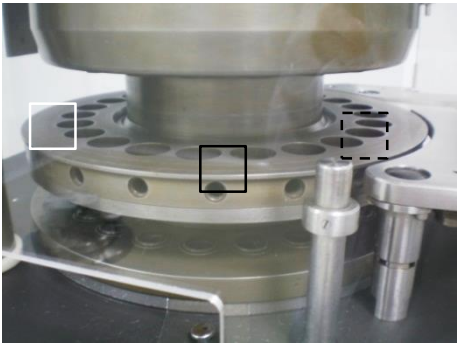

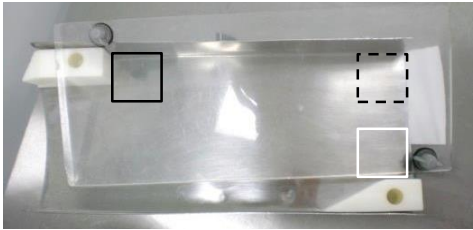
Ponto Crítico	Local de Amostragem
Máquina de Comprimir e Despoeirador	
<p>1 – Base do sistema de alimentação de aranhas</p>	
<p>2 – Prato da máquina</p>	
<p>3 – Depósito de carregamento (amostragens efetuadas no interior)</p>	
<p>4 – Rampa de saída dos comprimidos</p>	

Tabela 3-5 - Pontos críticos de amostragem para a máquina de comprimir e despoirador.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

Ponto Crítico	Local de Amostragem
<p>5 – Matrizes e Punções</p> <p>(A amostragem microbiológica é efetuada a duas matrizes. A amostragem para determinação de SA é efetuada a duas matrizes e dois punções.)</p>	
<p>6 – Disco intermédio</p>	
<p>7 – Disco inferior</p>	

Tabela 3-6 - Ponto crítico de amostragem para as bacias de revestimento.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

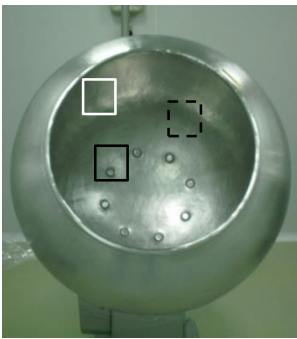
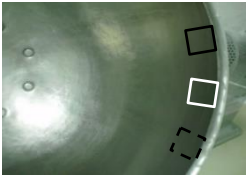


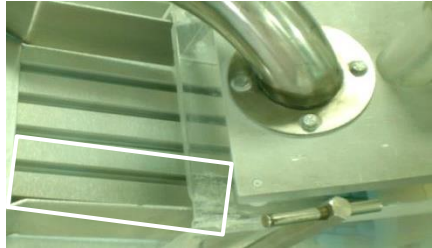
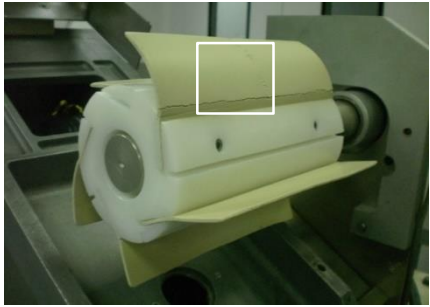
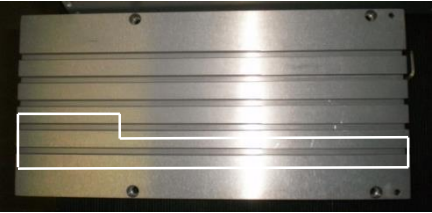
Ponto Crítico	Local de Amostragem
Bacias de Revestimento	
<p>1 – No interior da bacia</p>	
<p>2 – Rebordo da abertura</p>	

Tabela 3-7 - Pontos críticos de amostragem para a máquina de blisterar.
 A preto: amostragem para determinação de SA (linha a cheio para a amostra A e a linha a tracejado para a amostra B); a branco: amostragem microbiológica.

Ponto Crítico	Local de Amostragem
Máquina de Blisterar	
1 – Distribuidor (amostragem microbiológica efetuada na parte interior com placa de contato)	
2 - 1º Tabuleiro (amostragem microbiológica com placa de contato)	
3 - 2º Tabuleiro (amostragem microbiológica com zaragatoa)	
4 – Roda/Cilindro (amostragem microbiológica com placa de contato e zaragatoa - em locais diferentes)	
5 - 3º Tabuleiro (amostragem microbiológica com zaragatoa)	

Nota: na máquina de blisterar não é efetuada amostragem para determinação de resíduos de substância ativa porque este equipamento não contacta com substâncias ativas, isto porque os comprimidos ou cápsulas que aqui passam estão já revestidos.

3.2. Validação do Método Analítico

Para este estudo foi necessária a escolha de um método analítico apropriado (*vide* ponto 2.4.1). Como já foi referido anteriormente, o método escolhido foi a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), por ser um método bastante sensível e específico, visto que o que se pretende é pesquisar resíduos mínimos de substância ativa ou de outros possíveis contaminantes. No anexo A.1 apresenta-se os protocolos desenvolvidos para a validação do método analítico.

3.2.1. Determinação do Limite Analítico para o Primeiro Caso

Limite de Resíduo Aceitável

O primeiro caso a estudar foi o produto 1, cuja substância ativa, SA1, exige um procedimento de limpeza diferente dos outros fármacos produzidos no mesmo setor. A limpeza dos equipamentos onde passa o produto 1, quando ocorre mudança de produto, é feita de um modo específico utilizando um agente de limpeza também específico, a lixívia eletrolítica. Deste modo não foi feita a seleção do produto pior-caso A, pois o produto 1 é o único pior-caso.

Relativamente ao produto pior-caso B, este difere consoante o equipamento. Para o conjunto Câmara de Pesagem, Tamisador, Misturador Bicónico, Compactadora e Máquina de Blisterar, o produto pior-caso B será o Produto 8, enquanto que para o conjunto Máquina de Comprimir e Despoeirador e Bacias de Revestimento será o Produto 6.

Foi efetuada esta diferenciação pois durante o processo de fabrico dos produtos no FSO3, nem todos utilizam os mesmos equipamentos: os comprimidos revestidos passam em todos, enquanto por exemplo as suspensões orais ou cápsulas apenas passam no primeiro conjunto apresentado. Ambos os produtos pior-caso B foram escolhidos com base no menor tamanho de lote produzido, consoante o conjunto de equipamentos (*vide* Tabela 3-8 e Tabela 3-9).

Tabela 3-8 - Tamanho de lote de cada produto produzido no FSO3.

Produto				Tamanho de lote (g)
SA	Nome	Dosagem de SA	Forma galénica	
SA2	Produto 2	100mg/5ml - 120mL	Susp. Oral	108 000
SA2	Produto 3	400mg	Comp. revestido	110 000
SA2	Produto 4	100mg/5ml - 60mL	Susp.Oral	54 000
SA2	Produto 5	100mg/5ml - 60mL	Susp.Oral	79 500
SA2	Produto 6	400mg	Comp. revestido	88 000
SA3	Produto 7	250mg/5ml -120mL	Susp. Oral	156 000
SA3	Produto 8	500mg	Cápsulas	29 000
SA3	Produto 9	1g	Comp. revestido	130 000
SA4	Produto 10	250mg/5ml - 60mL	Susp. Oral	168 000
SA4	Produto 11	500mg	Cápsulas	168 000

Nota: O Produto 3 e 6 contêm ambos na formulação a mesma substância ativa, mas os processos de produção diferem ligeiramente. O mesmo acontece no caso do Produto 4 e 5.

Tabela 3-9 - Produto Pior-caso A e B por conjunto de equipamentos.

Câmara de Pesagem, Tamisador, Misturador Bicónico, Compactadora, Máquina de Blisterar	Máquina de Comprimir e Despoeirador, Bacias de Revestimento
Produto pior-caso A: Produto 1	Produto pior-caso A: Produto 1
Produto pior-caso B: Produto 8	Produto pior-caso B: Produto 6

O cálculo do limite de resíduo aceitável, LRA, baseia-se na posologia do produto, designadamente na mínima dose diária (mDd) da substância ativa SA1 e na máxima dose diária (MDd) do produto pior-caso B. Também tem em conta um fator de segurança, que para o caso das formas sólidas orais será de 0,001. A fórmula utilizada neste cálculo (Equação 2.2), bem como os dados e resultados obtidos por conjunto de equipamentos, encontram-se de seguida.

Câmara de Pesagem, Tamisador, Misturador Bicónico, Compactadora e Máquina de Blisterar

mDd (mínima dose diária) de SA1 = 250 mg (considerou – se a posologia mais baixa)

MDd (máxima dose diária) de B = 4640 mg

FS = 0,001 (fator de segurança para formas sólidas orais)

$$LRA = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{250 \text{ mg}}{4640 \text{ mg}} = 0,00005388 \text{ mg/mg} = 53,88 \times 10^{-6} \text{ mg/mg} = 54 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Como 54 $\mu\text{g/g}$ é superior a 10 $\mu\text{g/g}$ então assume – se LRA = 10 $\mu\text{g/g}$.

Máquina de Comprimir e Despoeirador, Bacias de Revestimento

mDd (mínima dose diária) de SA1 = 250 mg (considerou – se a posologia mais baixa)

MDd (máxima dose diária) de B = 880 mg $\times 1 = 880 \text{ mg}$

FS = 0,001 (fator de segurança para formas sólidas orais)

$$LRA = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{250 \text{ mg}}{880 \text{ mg}} = 0,00028409 \text{ mg/mg} = 284,09 \times 10^{-6} \text{ mg/mg} = 284 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Como 284 $\mu\text{g/g}$ é superior a 10 $\mu\text{g/g}$ então assume – se LRA = 10 $\mu\text{g/g}$.

Limite Residual de Superfície

Este cálculo serve essencialmente para contabilizar a área da superfície do equipamento que contacta com os produtos (SCEP). Para tal, é necessária a SCEP e também o tamanho de lote (TL) do produto B. A Equação 2.6 é a fórmula a aplicar neste cálculo.

O tamanho de lote para o Produto 8 é de 29 000 g; e para o Produto 6 é de 88 000g.

Como são vários os equipamentos presentes neste estudo, então determina-se a SCEP para cada um deles. Os cálculos e respetivos resultados apresentam-se na Tabela 3-10.

Tabela 3-10 - Resultados obtidos para o LRS.

	LRA (µg/g)	TL (g)	SCEP (cm ²)	LRS (µg/cm ²)
Misturador Bicónico	10,0	29 000	28155,0	10,3
Câmara de Pesagem	10,0	29 000	37497,7	7,7
Tamisador	10,0	29 000	7688,9	37,7
Compactadora	10,0	29 000	6430,2	45,1
Máquina de Comprimir e Despoeirador	10,0	88 000	13751,5	64,0
Bacias de Revestimento	10,0	88 000	36742,5	24,0
Máquina de Blisterar	10,0	29 000	10007,2	29,0

Limite Analítico

Após a definição dos limites anteriores, já é possível obter os limites analíticos para cada equipamento. Como irá ser utilizado o método de amostragem por *swab*, então tem de ser contabilizada a área da superfície de amostragem (ASA), que é cerca de 10cm x 10cm=100cm². Também é contabilizado o fator de recuperação (FR) para a extração do *swab*, da SA com o solvente usado (utiliza-se o valor de 1 para este parâmetro pois assume-se teoricamente que se tem uma recuperação de 100%). Consequentemente, também o volume de solvente de extração (VS), 50mL, usado nesta etapa tem de ser contabilizado no LA. A fórmula a utilizar é a Equação 2.7 e os resultados obtidos encontram na Tabela 3-11.

Tabela 3-11 - Resultados para o LA.

	LRS (µg/cm ²)	ASA (cm ²)	FR	VS (mL)	LA (µg/mL)
Misturador Bicónico	10,3	100	1,0	50,0	20,6
Câmara de Pesagem	7,7	100	1,0	50,0	15,5
Tamisador	37,7	100	1,0	50,0	75,4

Tabela 3-11 - Resultados para o LA.

	LRS ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	ASA (cm^2)	FR	VS (mL)	LA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Compactadora	45,1	100	1,0	50,0	90,2
Máquina de Comprimir e Despoeirador	64,0	100	1,0	50,0	128,0
Bacias de Revestimento	24,0	100	1,0	50,0	47,9
Máquina de Blisterar	29,0	100	1,0	50,0	58,0

O limite analítico é o limite da concentração que é necessária quantificar. Deste modo, o valor a escolher para o LA deve ser o valor mais baixo, pelo que se escolhe a câmara de pesagem para efetuar a validação do método analítico para o Produto 1. (LA = $15,5 \mu\text{g}/\text{mL} \approx 15 \mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.2. Determinação do Limite Analítico para o Segundo Caso

De modo a determinar qual o produto pior-caso do FSO3 (excluindo o produto 1, pois este tem a sua própria validação de limpeza), é necessário elaborar uma análise de risco. Esta análise de risco consiste na atribuição de índices de risco a determinados parâmetros relacionados com o produto. Os parâmetros a utilizar são a concentração de SA, toxicidade, frequência de produção, dificuldade de remoção e solubilidade. O modo como foi efetuada esta análise encontra-se no ponto 2.4.3 – Análise de Risco.

A determinação do produto pior-caso foi realizada com base no historial de produção de lotes no FSO3 de 2011 até 2014. Com base nisso foi possível a construção da Tabela 3-15, através da qual se pode apurar que tanto o Produto 9 como o Produto 11 são os piores-casos pelo fato de terem o índice de risco mais elevado. No entanto o Produto 11 é um produto que apenas começou a ser produzido em 2014 e por decisão dos Laboratórios Atral optou-se por efetuar a validação relativamente ao produto 9, por este ser produzido pelo menos desde 2011 em larga escala comparativamente aos outros produtos (mais de 9 lotes por ano).

Relativamente ao produto pior-caso B, para o conjunto de equipamentos Tamisador, Misturador Bicónico e Compactadora será o Produto 8, enquanto que para a Máquina de Comprimir e Despoeirador será o Produto 6. Esta escolha foi feita com base nos menores tamanhos de lote produzidos (*vide* Tabela 3-8) tendo em conta os produtos que passam em cada equipamento. Os produtos pior-caso A e B para o segundo caso em estudo encontram-se na Tabela 3-12.

Tabela 3-12 - Produtos Pior-Caso por conjunto de equipamentos.

Tamisador, Misturador Bicônico, Compactadora	Máquina de Comprimir e Despoeirador
Produto pior-caso A: Produto 9	Produto pior-caso A: Produto 9
Produto pior-caso B: Produto 8	Produto pior-caso B: Produto 6

Tal como para o Produto 1, os cálculos e determinações a efetuar para determinação do limite analítico são idênticos. Apresenta-se de seguida os mesmos.

Limite de Resíduo Aceitável

Os dados a usar no cálculo são a mínima dose diária (mDd) da substância ativa SA3 e a máxima dose diária (MDd) do produto pior-caso B consoante o equipamento. É utilizada a Equação 2.2 para este cálculo.

Tamisador, Misturador Bicônico, Compactadora

mDd (mínima dose diária) de A = 500 mg (considerou – se a posologia mais baixa)

MDd (máxima dose diária) de B = 4640 mg

FS = 0,001 (fator de segurança para formas sólidas orais)

$$LRA = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{500 \text{ mg}}{4640 \text{ mg}} = 0,00010776 \text{ mg/mg} = 107,76 \times 10^{-6} \text{ mg/mg} = 107,8 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Como 107,8 $\mu\text{g/g}$ é superior a 10 $\mu\text{g/g}$ então assume – se LRA = 10 $\mu\text{g/g}$.

Máquina de Comprimir e Despoeirador

mDd (mínima dose diária) de A = 500 mg (considerou – se a posologia mais baixa)

MDd (máxima dose diária) de B = 880 mg

FS = 0,001 (fator de segurança para formas sólidas orais)

$$LRA = FS \times \frac{mDd \text{ de A}}{MDd \text{ de B}} = 0,001 \times \frac{500 \text{ mg}}{880 \text{ mg}} = 0,00056818 \text{ mg/mg} = 568,18 \times 10^{-6} \text{ mg/mg} = 568,18 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Como 568,18 $\mu\text{g/g}$ é superior a 10 $\mu\text{g/g}$ então assume – se LRA = 10 $\mu\text{g/g}$.

Limite Residual de Superfície

Também neste caso os cálculos pela Equação 2.6 são iguais aos do Produto 1A, visto que os equipamentos são os mesmos.

O tamanho de lote para o Produto 8 é de 29 000 g; e para o Produto 6 é de 88 000g.

Tabela 3-13 - Resultados obtidos para o LRS.

	LRA (µg/g)	TL (g)	SCEP (cm ²)	LRS (µg/cm ²)
Misturador Bicónico	10,0	29 000	28155,0	10,3
Tamisador	10,0	29 000	7688,9	37,7
Compactadora	10,0	29 000	6430,2	45,1
Máquina de Comprimir e Despoeirador	10,0	88 000	13751,0	64,0

Limite Analítico

Os dados para o cálculo deste parâmetro através da Equação 2.7, também são iguais aos já apresentados anteriormente.

Tabela 3-14 - Resultados para o LA.

	LRS (µg/cm ²)	ASA (cm ²)	FR	VS (mL)	LA (µg/mL)
Misturador Bicónico	10,3	100	1,0	50,0	20,6
Tamisador	37,7	100	1,0	50,0	75,4
Compactadora	45,1	100	1,0	50,0	90,2
Máquina de Comprimir e Despoeirador	64,0	100	1,0	50,0	128,0

Observando os resultados obtidos na Tabela 3-14, e sabendo que o valor a escolher para o LA em uma validação deve ser o valor mais baixo, escolha-lhe o misturador bicónico para efetuar a validação do método analítico para o Produto 9. (LA = 20,6 µg/mL ≈ 20 µg/mL).

Tabela 3-15 - Análise de risco para determinação do produto pior-caso.

Produto				Concentração de SA	Solubilidade	Frequência de produção	Toxicidade	Dificuldade de remoção	Índice de risco
SA	Nome	Dosagem de SA	Forma galénica						
SA2	Produto 2	100mg/5ml - 120mL	Susp. Oral	2	3	3	2	2	72
SA2	Produto 3	400mg	Comp. revestido	3	3	2	2	2	72
SA2	Produto 4	100mg/5ml - 60mL	Susp.Oral	2	3	2	2	2	48
SA2	Produto 5	100mg/5ml - 60mL	Susp.Oral	2	3	1	2	2	24
SA2	Produto 6	400mg	Comp. revestido	3	3	1	2	2	36
SA3	Produto 7	250mg/5ml -120mL	Susp. Oral	2	2	2	2	2	32
SA3	Produto 8	500mg	Cápsulas	4	2	2	2	2	64
SA3	Produto 9	1g	Comp. revestido	4	2	3	2	2	96
SA4	Produto 10	250mg/5ml - 60mL	Susp. Oral	2	3	2	2	2	48
SA4	Produto 11	500mg	Cápsulas	4	3	2	2	2	96

3.2.3. Materiais Necessários ao Processo de Validação Analítica

Para ambas as validações do método analítico por HPLC foram necessários os materiais apresentados na Tabela 3-16: Optou-se por fazer esta apresentação pelo fato de a maior parte dos elementos necessários serem comuns a ambas.

Tabela 3-16 – Materiais, reagentes e condições cromatográficas necessários na validação do método analítico.

	Validação do método analítico para o Produto 1	Validação do método analítico para o Produto 9
Reagentes	<ul style="list-style-type: none"> - Água Milli-Q - Fosfato monobásico de amónio - Metanol HPLC grade - Metanol p.a. - Detergente e lixívia eletrolítica usados na limpeza dos equipamentos 	<ul style="list-style-type: none"> - Água Milli-Q - Acetato de sódio trihidratado - Ácido acético glacial - Metanol HPLC grade - Metanol p.a. - Detergente usado na limpeza dos equipamentos
Equipamento HPLC	Merck Hitachi Lachrom; Agilent 1100 Series	
Condições Cromatográficas	Coluna: Thermo, Betasil C1, 250x4mm, 5µm Fase móvel (620:380): <ul style="list-style-type: none"> - Solução tampão de fosfato monobásico de amónio - Metanol Caudal: 1,5 mL/min Comprimento de onda de detecção: 278nm Volume de Injeção: 10 µL Tempo de corrida: 20 minutos Temperatura da coluna: ambiente	Coluna: LiChrospher C18, 25cm x 4mm, 5µm Fase móvel (1564:400:30:6): <ul style="list-style-type: none"> - Água destilada - Metanol - Acetato de sódio 0,5M - Ácido acético 0,7N Caudal: 1,4 mL/min Comprimento de onda de detecção: 254nm Volume de Injeção: 20 µL Tempo de corrida: 15 minutos Temperatura da coluna: ambiente

Tabela 3-16 - Materiais, reagentes e condições cromatográficas necessários na validação do método analítico (continuação).

	Validação do método analítico para o Produto 1	Validação do método analítico para o Produto 9
Substâncias de referência	Padrão: SA1 Comprimidos: Produto 1	Padrão: SA3 Comprimidos: Produto 9
Vials	1,5mL, com septo e capsulados com alumínio	
Frascos para fase móvel	2000mL ; 2500mL	
Balões volumétricos	10mL, 20mL, 25mL, 50mL, 100mL, 200mL, 250mL, 1000mL	
Provetas	25mL, 50mL, 500mL, 1000mL	
Pipetas	Volumétricas diferenciais: 1mL, 2mL, 5mL Graduadas: 0,5mL, 2mL, 10mL	
Micropipetas	2-200 µL ; 100-1000 µL	
Filtros	0,45 µm	
Placas	Aço-inóx polido de 100cm ² (10cm x 10 cm)	
Frascos de Amostragem	150mL, com tampa Astra	
Material de amostragem	Swab ("large alpha swab" – Tx714A_Texwipe)	
Banho de ultrassons	Bandelin Sonorex RK 100; Brandson 5210	
Balanças	Mettler-Toledo AG 204 Mettler-Toledo MS105DU	Mettler-Toledo AG 204 Mettler-Toledo AT250

3.2.4. Processo de Validação do Método Analítico

Preparação das soluções e fase móvel utilizadas

- Para o caso do Produto 1:

Fase Móvel

Para a solução tampão de fosfato monobásico de amônio 0,2M, pesou-se 23,0g de fosfato monobásico de amônio para balão volumétrico de 1000mL, ao qual se adicionou água.

Para preparar a fase móvel, retirou-se 620mL da solução tampão anterior para um frasco de 1000mL e adicionou-se 380mL de metanol HPLC grade. Ao longo do estudo para este produto foi necessária a preparação de vários litros de fase móvel.

Soluções

Preparou-se uma solução inicial com a substância ativa padrão SA1 do seguinte modo: pesou-se 15mg do padrão para um balão volumétrico de 50mL ao qual foi adicionado metanol. A partir desta solução inicial, através de diluições, preparam-se as 5 soluções a testar. A quantidade a transferir da solução inicial para as outras soluções depende da concentração que se pretende, por exemplo, para a solução de concentração ao limite analítico (15µg/mL) transfere-se 5mL da solução inicial para balão volumétrico de 100mL, ao qual se adiciona metanol. Para as outras 4 soluções o método é idêntico. As quantidades a transferir consoante a concentração que se pretende estão indicadas na tabela seguinte.

Tabela 3-17 - Soluções a utilizar no processo de validação – produto 1.

Soluções	Peso da substância padrão (mg)	Volume do balão (mL)	Concentração (µg/mL)
Solução inicial	15,0	50,0	300,0
	Transferir da solução inicial (mL)		
LA 50%	5,0	200,0	7,5
LA 75%	7,5	200,0	11,3
LA	5,0	100,0	15,0
LA 150%	1,5	20,0	22,5
LA 200%	2,0	20,0	30,0

Também é necessária a preparação de uma solução de contaminação para as placas e *swabs*. Esta prepara-se pesando 93,75mg de padrão de SA1 para balão volumétrico de 25mL, ao qual se adicionou metanol. A quantidade a pesar é calculada com base na Equação 3.1, em que: LA – limite analítico, 15 µg/mL

V_a – volume de aplicação na placa ou *swab* ao nível do LA, 0,2 mL

V_s – volume de solvente na amostra, 50 mL

V_i – volume inicial do balão, 25 mL

$$Q(\text{mg}) = \frac{\text{LA} \times V_s \times V_i}{V_a \times 1000} \quad \text{Equação 3.1}$$

As 7 soluções apresentadas foram colocadas no frio durante o decorrer da validação com o objetivo de evitar que a substância ativa 1 degra-se.

- Para o caso do Produto 9:

Fase Móvel

Para a solução de acetato de sódio 0,5M, pesou-se 17,0g de acetato de sódio trihidratado para balão volumétrico de 250mL, ao qual se adicionou água.

Para a solução de ácido acético 0,7N, transferiu-se 4,2mL de ácido acético glacial para balão volumétrico de 100mL que já continha 50mL de água. Perfez-se o volume com água.

Para preparar a fase móvel colocou-se, em um frasco de 2500mL, 1564mL de água e 400mL de metanol HPLC grade. Transferiu-se 30mL da solução de acetato de sódio 0,5M e 6mL da solução de ácido acético 0,7N para este frasco. Ao longo do estudo para este produto foi necessária a preparação de mais litros de fase móvel.

Soluções

Preparou-se uma solução inicial com a substância ativa padrão SA3 do seguinte modo: pesou-se 20mg do padrão para um balão volumétrico de 50mL ao qual foi adicionado fase móvel. Tal como para o Produto 1, a partir da solução inicial preparam-se as 5 soluções a testar. O esquema das diluições efetuado encontra-se na Tabela 3-18.

Tabela 3-18 - Soluções a utilizar no processo de validação – produto 9.

Soluções	Peso da substância padrão (mg)	Volume do balão (mL)	Concentração (µg/mL)
Solução inicial	20,0	50,0	400,0
	Transferir da solução inicial (mL)		
LA 50%	5,0	200,0	10,0
LA 80%	8,0	200,0	16,0
LA	5,0	100,0	20,0
LA 150%	1,5	20,0	30,0
LA 200%	2,0	20,0	40,0

Também é necessária a preparação de uma solução de contaminação para as placas e swabs. Esta prepara-se pesando 62,5mg de padrão de SA3 para balão volumétrico de 25mL, ao qual se adicionou fase móvel. A quantidade a pesar é calculada com base na Equação 3.1, em que para o produto 11: LA – limite analítico, 20 µg/mL

Va – volume de aplicação na placa ou swab ao nível do LA, 0,4 mL

Vs – volume de solvente na amostra, 50 mL

Vi – volume inicial do balão, 25 mL.

As 7 soluções apresentadas foram protegidas da luz durante o decorrer da validação com o objetivo de evitar que a substância ativa 3 degrada-se, visto que é fotossensível.

Método de Amostragem

O modo de amostragem para os passos Seletividade, Repetibilidade do método, Exatidão e Estabilidade do analito nas soluções analíticas e equipamento foi realizado do seguinte modo: adicionou-se 0,4 mL de metanol a um swab (cerca de 0,2 mL em cada face). Numa placa de aço-

inox correspondente a 100 cm², esfregou-se horizontalmente, com uma das faces do *swab*, efetuando cerca de 10 movimentos em zig-zag (Figura 3-8). De seguida esfregou-se verticalmente, com a outra face do *swab*, efetuando outros 10 movimentos em zig-zag (Figura 3-8). O *swab* foi pressionado firmemente de encontro à superfície de forma a assegurar-se o contacto contínuo. De seguida coloca-se o *swab* fechado num frasco de amostragem de 150 mL, ao qual é adicionado para o caso do Produto 1, 50mL de metanol, e para o caso do Produto 9, 50 mL de fase móvel. Seguidamente coloca-se no ultrassons durante 45min.

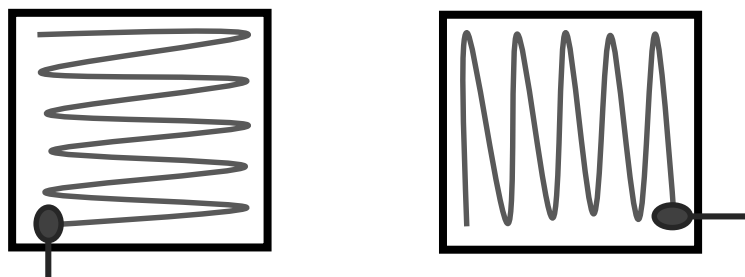


Figura 3-8 - Movimentos a efetuar com o *swab*, aquando da amostragem na placa.

Validação

Na validação serão testados os parâmetros já enunciados no ponto 2.4.4: Seletividade, Linearidade, Limite de Quantificação, Precisão, Repetibilidade, Exatidão, Estabilidade do analito nas soluções e equipamento. Como os parâmetros a testar são os mesmos para ambas as validações, apresenta-se apenas uma vez o processo efetuado, enunciando as diferenças existentes em apenas alguns pontos.

- **Seletividade**

Pretende-se verificar a capacidade do método para detetar a substância ativa em presença de possíveis interferentes existentes na amostra.

Foram efetuadas análises nos seguintes tipos de amostras:

- Substância ativa, preparadas de acordo com o descrito para as soluções utilizadas na validação; analisou-se uma vez as soluções padrão LA 50%, LA e LA 200 %;
- Solvente utilizado na preparação das amostras – para o caso do Produto 1 o solvente utilizado foi metanol, enquanto que para o Produto 9 foi fase móvel. Analisou-se uma vez cada e comparou-se a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA;
- Branco de *swab* – Esta solução foi preparada com um *swab* novo e o solvente nas mesmas condições da amostra. Neste caso, um *swab* contendo 0,4 mL de metanol foi colocado num frasco contendo 50 mL de solvente, procedeu-se a agitação em banho de ultrassons 45min

e analisou-se uma vez. Comparou-se a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA;

d) Branco de recuperação da placa – Preparou-se do seguinte modo: colocou-se um volume pré-definido, 0,4mL de solvente na placa, deixou-se secar e amostrou-se como descrito no método de amostragem. Analisou-se uma vez e comparou-se a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA;

e) Branco de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções – Neste parâmetro pretende-se analisar uma solução preparada nas mesmas condições que a amostra de recuperação da placa (*vide* parâmetro exatidão, mais à frente), quando se sobrecarregou a placa com uma solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas, numa quantidade em que considerando a recuperação 100% a solução final possuía 10 ppm de concentração.

Para o caso do Produto 1: prepararam-se duas soluções, uma de concentração 1000 ppm de detergente (pesou-se 10 mg de detergente para um balão volumétrico de 10 mL, e fez-se o volume com metanol) e outra de concentração 1000 ppm de lixívia eletrolítica (pesou-se 10 mg de lixívia eletrolítica para um balão volumétrico de 10 mL e fez-se o volume com metanol). De cada uma das soluções retirou-se 0,5 mL e colocou-se numa placa. Deixou-se secar, amostrou-se como descrito no método de amostragem e procedeu-se à análise.

Para o caso do Produto 9: preparou-se uma solução de concentração 1000 ppm de detergente (pesou-se 10 mg de detergente para um balão volumétrico de 10 mL, e fez-se o volume com fase móvel). Retirou-se 0,5 mL e colocou-se numa placa. Deixou-se secar, amostrou-se como referido no ponto método de amostragem e procedeu-se à análise.

Para ambos os casos, a resposta obtida foi comparada com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA;

f) Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm – Pretende-se analisar as soluções preparadas no solvente das amostras, a partir das soluções utilizadas na limpeza do equipamento considerando a sua pureza de 100 %.

a. Em caso de utilização de várias soluções de lavagem pode ser avaliada em soluções individuais ou em conjunto.

Para o Produto 1: neste caso a análise foi feita em separado. Da solução anterior de concentração 1000 ppm de detergente (ponto e)) retirou-se 0,1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com metanol. Fez-se o mesmo para a lixívia eletrolítica.

Para o Produto 9: Retirou-se 0,1 mL da solução anterior de concentração 1000 ppm de detergente (ponto e)) para balão volumétrico de 10 mL e completou-se com fase móvel. Analisou-se cada uma destas novas soluções uma vez e comparou-se as respostas obtidas com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

- b. Solução de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA 50%.

Para o Produto 1: retirou-se 0,1 mL de cada uma das soluções de concentração 1000 ppm (ponto e)) e colocou-se ambos num balão volumétrico de 10 mL. Perfez-se o volume com a solução de concentração padrão LA 50% e analisou-se.

Para o Produto 9: transferiu-se 0,1 mL da solução de concentração 1000 ppm de detergente (ponto e)) para balão volumétrico de 10 mL. Perfez-se o volume com a solução de concentração padrão LA 50% e analisou-se.

- g) Amostra de recuperação do swab – Para esta amostra, a um *swab* deve-se adicionar uma quantidade pré-definida correspondente ao LA, da solução para contaminação.

Para o Produto1 adiciona-se a um *swab* 0,2 mL da solução do analito para contaminação, enquanto que para o Produto 9 se adiciona 0,4mL, e coloca-se num frasco contendo 50 mL de metanol / fase móvel. De seguida vai ao banho de ultrassons 45min e analisa-se uma vez. Compara-se a resposta obtida com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

- h) Amostra de recuperação da placa - Para esta amostra, a uma placa deve-se adicionar uma quantidade pré-definida correspondente ao LA, da solução para contaminação.

Para o Produto1 adicionou-se a uma placa 0,2 mL da solução do analito para contaminação, enquanto que para o Produto 9 se adicionou 0,4 mL. Deixou-se secar e amostrou-se como indicado no método de amostragem. Analisou-se uma vez e comparou-se ambas as respostas obtidas com a resposta de uma solução do analito na concentração correspondente ao LA.

- **Linearidade**

Neste ponto pretende-se testar a linearidade do processo, para tal utilizaram-se as soluções de concentrações correspondentes a cerca de 50 % (LA 50%), 75 % (LA 75%), 100 % (LA), 150 % (LA 150%) e 200 % (LA 200 %) da concentração do limite analítico para o Produto 1, sendo que para o Produto 9 em vez da solução de concentração LA 75%, se utilizou a LA 80%. Efetuou-se duas leituras a cada solução.

Após a análise, constrói-se a curva de calibração entre concentrações e áreas; determina-se o declive e a ordenada na origem da reta obtida por regressão linear, além do respetivo coeficiente de correlação. Paralelamente também se determina o desvio observado entre o fator-resposta associado a cada solução e o fator-resposta associado à concentração alvo (concentração ao nível do LA).

- **Limite de Quantificação**

Consoante a reta de calibração obtida, assim se terá o valor do limite de quantificação. Como já foi referido em 2.4.4-Limite de Deteção e Limite de Quantificação, ambos os limites são calculados com base na curva de calibração obtida no parâmetro linearidade.

Deste modo, após obter o valor do LQ, prepara-se uma solução de concentração ao nível do LQ (*vide* Tabela 3-19) e analisa-se seis vezes.

Tabela 3-19 - Preparação das soluções ao nível LQ.

Soluções	Concentração obtida através da curva de calibração (µg/mL)	Transferir da solução LA50% (mL)	Volume do balão (mL)	Concentração real (µg/mL)
LQ (Produto 1)	2,978	2	20	0,75 (*)
LQ (Produto 9)	1,075	1	10	1

(*) esta solução foi analisada num aparelho de HPLC que tem uma sensibilidade melhor que o HPLC utilizado no restante processo de validação do método analítico para o produto 1. Deste modo optou-se por analisar uma solução em que a concentração do analito fosse mais baixa que o obtido teoricamente.

- **Precisão do sistema**

Para avaliar este parâmetro, coloca-se para analisar uma amostra da solução de concentração ao nível LA50%, LA e LA200%. As amostras de concentração LA50% e LA200% foram analisadas seis vezes, enquanto que a amostra de concentração ao nível LA foi analisada dez vezes.

- **Repetibilidade do método**

Para avaliar a repetibilidade do método, realizou-se 2 conjuntos de 6 determinações para amostragem com *swabs*:

- Contaminou-se 6 *swabs* com uma quantidade de analito que seja após preparação da amostra o correspondente ao LA.

Para o Produto 1 a cada *swab* adicionou-se 0,2 mL da solução do analito para contaminação, e para o caso do Produto 9 adicionou-se 0,4mL. De seguida colocou-se o *swab* num frasco contendo 50 mL de metanol / fase móvel e foi ao banho de ultrassons cerca de 45 min. Analisou-se duas vezes;

- Contaminou-se 6 placas com uma quantidade de analito que seja após preparação da amostra o correspondente ao LA.

Para o Produto 1 a cada placa adicionou-se 0,2 mL da solução do analito para contaminação e para o produto 9 adicionou-se a cada placa 0,4 mL. Deixou-se secar e amostrou-se como indicado no método de amostragem. Analisou-se duas vezes.

- **Exatidão**

A exatidão foi verificada a dois níveis:

1 – Recuperação *Swab* → Solvente

Adicionou-se aos *swabs* em triplicado, quantidades de solução do analito para contaminação, correspondentes aos níveis LA 50 %, LA e de LA 200%.

No caso do Produto 1 para o nível LA adicionou-se 0,2 mL da solução para contaminação ao *swab* e de seguida colocou-se o *swab* contaminado num frasco. Fez-se o mesmo para os outros 2 *swabs*. Introduziu-se em cada frasco 50 mL de metanol e de seguida agitou-se em banho de ultrassons 45 min. Fez-se os mesmos passos para o nível LA 50% (adicionou-se 0,1 mL ao *swab*) e para o nível LA 200% (adicionou-se 0,4 mL ao *swab*).

No caso do Produto 9, os passos foram os mesmos, mas para o nível LA adicionou-se 0,4 mL, para o nível LA50% 0,2 mL e para o nível LA200% adicionou-se 0,8 mL.

2 – Recuperação do método de amostragem Placa → *Swab* → Solvente

Adicionou-se às placas em triplicado, quantidades de solução do analito para contaminação, correspondentes aos níveis LA 50 %, LA e de LA 200% (0,1 mL, 0,2 mL e 0,4 mL respetivamente para o Produto 1, e 0,2 mL, 0,4 mL e 0,8 mL respetivamente para o Produto 9). Após secagem, procede-se como indicado no método de amostragem, e introduz-se cada *swab* em 50mL de metanol ou fase móvel (consoante o produto) e agita-se durante 45min em banho de ultrassons.

Procedeu-se à quantificação dos analitos face às soluções padrão de concentração correspondente ao LA, LA 50% e LA 200%, respetivamente.

- **Estabilidade do analito nas soluções e no equipamento**

- Estabilidade da solução problema e padrão

Pretende-se avaliar a estabilidade da solução padrão de concentração ao nível LA e da solução problema (solução de contaminação) no momento e após 24h.

A primeira solução padrão ao nível LA foi preparada conforme descrito anteriormente. Desta solução foi guardada uma amostra que ficou à temperatura ambiente e exposição à luz e outra amostra que ficou guardada no frio e ao abrigo da luz. A avaliação da solução problema, foi efetuada a partir de uma amostra da sobrecarga de uma placa ao nível LA (uma das amostras

do ponto 2 do parâmetro exatidão), à qual se retirou do frasco de amostragem duas amostras, sendo que uma ficou à temperatura ambiente e exposição da luz 24h, enquanto que a outra ficou no frio e resguardada da luz também por 24h.

Determinou-se o teor das soluções obtidas imediatamente após a sua preparação e após 24 horas de conservação nas condições já especificadas. Após as 24h, ou seja no dia seguinte, foi preparada no dia uma solução ao nível do LA para ser utilizada como padrão do dia. Neste segundo dia foram analisadas para além da solução ao nível do LA, todas as soluções que ficaram guardadas por 24h. Todas as análises deste ponto foram efetuadas em duplicado.

- Estabilidade da substância no equipamento

Neste ponto pretende-se verificar qual a estabilidade da substância ativa no equipamento. Para tal, sobrecarrega-se uma placa ao nível LA com a solução de contaminação, tal como no parâmetro de repetibilidade, recuperação placa → *swab* → solvente. Esta placa ficou 24h exposta à temperatura ambiente e com exposição da luz. No dia seguinte, fez-se a amostragem com o *swab* e analisou-se duas vezes. Neste ponto a estabilidade é determinada pela diferença do resultado médio obtido na repetibilidade e o resultado obtido após 24h.

- Estabilidade do produto no equipamento

Neste estudo avalia-se a estabilidade do pó (granulado) exposto em placas. Uma placa é contaminada com o granulado (pó intermédio correspondente ao produto final) e é armazenada em condições de temperatura ambiente e exposição à luz conforme o equipamento em estudo. A determinação da estabilidade é efetuada pela diferença do resultado do tempo inicial (tempo 0 dias), do resultado obtido após X dias.

Para o Produto 1:

Preparam-se as seguintes soluções:

- Solução padrão *stock*: pesou-se, 62 mg de padrão da SA1 para balão volumétrico de 50 mL. Dissolveu-se em cerca de 35 mL de metanol, com o auxílio do ultrassons, e completou-se o volume com metanol.

- Solução padrão: pipetou-se 10 mL de solução padrão *stock* e 3,8 mL de metanol para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com solvente (solução tampão fosfato monobásico de amónio 0,2M) e misturou-se. Filtrou-se cerca de 2 mL através de filtro de 0,45 µm.

- Solução amostra: A 5 comprimidos do Produto 1A, retirou-se o revestimento e reduziu-se a pó num almofariz. Este pó foi espalhado aleatoriamente por uma placa de aço-inox. Transferiu-se cerca de 92 mg do pó (granulado) da placa, para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 13 mL de metanol e levou-se ao banho de ultrassons 30 minutos. Deixou-se atingir a temperatura ambiente e completou-se o volume com metanol. Centrifugou-se cerca de 10 mL desta solução a 2500 r.p.m. durante 10 min.

Pipetou-se cerca de 5 mL da solução centrifugada para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 8,8 mL de metanol, diluiu-se o volume com solvente (solução tampão fosfato monobásico de amônio 0,2M) e misturou-se. Filtrou-se cerca de 2 mL através de filtro de 0,45 µm.

Avaliou-se através de 2 injeções a solução padrão e a solução amostra. Nos dias em se efetuaram análises ao pó exposto na placa, são refeitas estas três soluções, sendo que para a solução amostra as 92 mg de Produto1 foram retiradas da placa exposta à temperatura ambiente e exposição da luz.

Para o Produto 9:

Preparam-se as seguintes soluções:

- Solução padrão: Para balão volumétrico de 50 mL, transferiu-se cerca de 25 mg de padrão da SA3, pesado com exatidão; juntou-se cerca de 40 mL de fase móvel e dissolveu-se durante 15 minutos, alternando a agitação mecânica e o banho de ultrassons; completou-se o volume com o mesmo solvente. Tomou-se 5,0 mL da solução obtida atrás para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel.

- Solução amostra: A 5 comprimidos do Produto 9, retirou-se o revestimento, e trituraram-se num almofariz até obter um pó fino. Este pó foi espalhado aleatoriamente por uma placa de aço-inox. Transferiu-se 32,5 mg da placa, para balão volumétrico de 25 mL; adicionou-se cerca de 20 mL de fase móvel e agitou-se durante 15 minutos alternando a agitação mecânica e o banho de ultrassons; completou-se o volume com fase móvel. Filtrou-se 5,0 mL desta solução por filtro de 0,45 µm para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com fase móvel.

Avaliou-se através de 2 injeções a solução padrão e a solução amostra. Nos dias em que foram efetuadas análises, são refeitas estas duas soluções, sendo que para a solução amostra as 32,5 mg de Produto 9 foram retiradas da placa exposta.

3.3. Validação de Limpeza dos Equipamentos

No anexo A.1 apresenta-se os protocolos/relatórios desenvolvidos para a validação de limpeza de cada equipamento..

3.3.1. Testes a Efetuar a Cada Equipamento

A validação de limpeza consiste na avaliação da existência de resíduos após a limpeza dos equipamentos, em quantidades que não comprometam a qualidade do produto seguinte. Assim, uma validação é constituída por quatro testes (Tabela 3-20) que se apresentam de seguida.

Tabela 3-20 - Testes a realizar no processo de Validação da Limpeza.

Teste n.º	Descrição
VL01	Inspeção Visual
VL02	Determinação de Resíduos de Agente de Limpeza
VL03	Determinação da Atividade Microbiana
VL04	Determinação de Resíduos da Substância Ativa

Teste de Validação de Limpeza nº 1 – Inspeção Visual

Material Utilizado

Para este teste não foram necessários materiais, no entanto caso existissem zonas de difícil acesso e mais escuras poder-se-ia utilizar uma lanterna.

Amostragem

Este teste foi realizado sempre em primeiro lugar e após a secagem total do equipamento.

Inicialmente verificou-se que a área de trabalho estava limpa, arrumada e sem odores. De seguida verificou-se se o equipamento apresentava todos os seus componentes desmontados, limpos e secos, verificando-se a ausência de resíduos de pó e manchas em toda a área, bem como ausência de escoriações mecânicas, fibras, borracha, restos de gordura e humidade.

Critério de Aceitação

Caso algum dos pontos anteriores não se verifique, implica a não conformidade do teste e por consequência impede a continuação da validação de limpeza. Teria de ser efetuada uma limpeza do equipamento/zona e só depois se procederia a uma nova inspeção visual.

Teste de Validação de Limpeza nº 2 – Determinação de Resíduos de Agente de Limpeza

Material Utilizado

Para cada equipamento foram necessários 3 frascos previamente tratados para análise TOC (amostra A, B e Branco, ver Figura 3-9) e devidamente rotulados da seguinte forma: designação “Amostra para validação de limpeza – Resíduo de Detergente”, designação do equipamento e produto, identificação da amostra e data da amostragem. Também foi necessário máscara, luvas e um recipiente de recolha devidamente higienizado. Consoante o número de peças ou equipamento a amostrar a quantidade de água com baixo nível TOC necessária varia entre os 5L e os 6L.

Amostragem

Para a amostragem colocou-se máscara e luvas, utilizou-se sempre água corrente e evitou-se mergulhar os frascos no recipiente. Colocou-se um pouco de água no recipiente de recolha de modo a lavar o seu interior e descartou-se a água no final. Colocou-se novamente água no recipiente. Encheu-se o frasco destinado ao Branco três vezes consecutivas, descartando as águas da primeira e segunda vez. Recolheu-se a 3ª água e fechou-se o frasco. De seguida, mergulharam-se as peças a amostrar no recipiente. Nos casos em que não foi

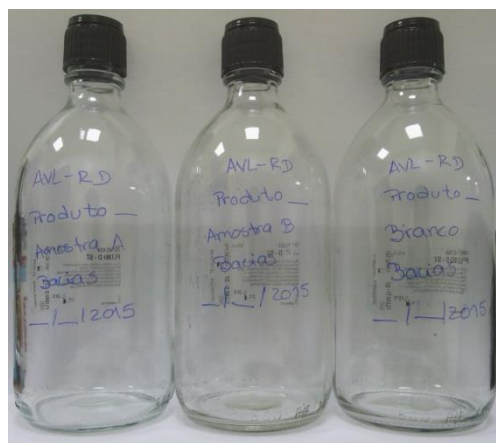


Figura 3-9 - Frascos para análise TOC.

possível mergulhar as peças, quando estas eram maiores que o recipiente por exemplo, optou-se por verter a água sobre a área selecionada, recolhendo-se a água do recipiente de recolha. Os frascos destinados às amostras, foram cheios duas vezes consecutivas e descartou-se estas águas, apenas a terceira água foi recolhida tal como na amostra Branco.

As amostras foram analisadas no aparelho de análise TOC Shimadzu TOC-V CSH do Departamento de Química da FCT-UNL e também no aparelho de análise TOC LabToc da Cipan.

Critério de Aceitação

Tendo em conta trabalhos já efetuados sobre este tipo de pesquisa de resíduos, o limite analítico da análise TOC não deverá exceder os 10 ppm.

Se os resultados obtidos se revelarem superiores ao esperado ou caso o valor do Branco seja superior ao valor da Amostra, então está-se perante uma não-conformidade e o teste tem de ser repetido.

Teste de Validação de Limpeza nº 3 – Determinação de Atividade Microbiana

Material Utilizado

Para a realização desta amostragem utilizou-se máscara, luvas, um pano esterilizado, álcool a 70% (Ipasept 70, Gamma-irradiated 15kGy, VWR Chemicals Prolabo), fita-cola, marcador de acetato, placas de contato descartáveis com 25 cm² (*Thermo Scientific, Oxoid - Contact I Tryptic Soy Agar com Lecithin*) contendo meio de cultura TSA, zaragatoas estéreis embebidas em tampão fosfato pH=7,0 e estufas.

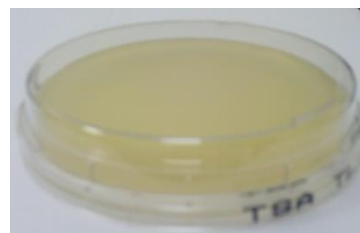


Figura 3-10 - Placa de contato da Oxoid.

Para os ensaios laboratoriais relativos às zaragatoas, também foi necessário: placas de petri com meio de cultura TSA preparadas no laboratório de microbiologia, solução de lavagem DFA, filtros de 0,45 µm e câmara de fluxo laminar.

Amostragem

Para a recolha das amostras microbiológicas colocou-se máscara e luvas. Para o caso das placas de contato, abriu-se uma placa colocando o meio de cultura em contato com a área a amostrar (pontos críticos, ponto 3.1.1) durante cerca de 10 seg. Fechou-se logo de seguida e identificou-se a placa. Para o caso das zaragatoas, retirou-se a mesma da embalagem que continha o algodão embebido na solução tampão fosfato pH=7,0 e passou-se nas superfícies a amostrar fazendo pressão ao longo das mesmas numa área de cerca de 25 cm².

Após todas as amostragens limpou-se o local de recolha de amostra com um pano esterilizado embebido em álcool a 70%.

Para o processo de contagem da atividade microbiana para as zaragatoas procedeu-se do seguinte modo: colocou-se na estufa cerca de 30 min a 35-37°C. De seguida, já na câmara de fluxo laminar, filtrou-se o tampão fosfato a pH=7,0 que estava na embalagem da zaragatoa. Lavou-se o filtro com a solução de DFA (solvente de fluido A de peptona) 3 vezes com 100 mL. Colocou-se o filtro sobre uma placa de Petri com TSA.

As placas de contato e as placas de Petri são colocadas entre 5-7 dias numa estufa a 20-25°C e posteriormente são colocadas noutra estufa 5-7 dias a 30-35°C.

Critério de Aceitação

Tal como já foi descrito (ponto 2.5 - Pesquisa de Atividade Microbiológica), para este teste o limite de UFCs por placa é de 50, isto para cumprir com a especificação das GMPs para salas estéreis. Caso, por algum motivo, o limite for ultrapassado ou a contagem seja impercetível tem de ser avaliado o valor obtido e determinada a possível causa. Consoante o resultado dessa investigação, poderá ou não ser necessária uma nova amostragem.

Teste de Validação de Limpeza nº 4 – Determinação de Resíduos de Substância Ativa

Material Utilizado

Para este teste foram necessários os seguintes materiais: balança analítica (Mettler-Toledo AG 204; Mettler-Toledo AT250), banho de ultrassons (Bandelin Sonorex RK 100; Brandson 5210), equipamento HPLC com detetor de UV (Merck Lanchrom Hitachi; Agilent 1100), frascos de amostragem de 150 mL com tampa e devidamente rotulados (ver Figura 3-12), *swabs*

(*large alpha swab* – Tx714A_Texwipe, Figura 3-11), metanol (reagente p.a.), micropipeta de 2-200µL e respectivas pontas, janela de silicone de 100cm² limpa e desinfetada.



Figura 3-12 - Frascos de amostragem de 150mL com tampa Astra devidamente rotulados.



Figura 3-11 - Swab.

Amostragem

Para a realização desta amostragem foi necessário o uso de luvas e da janela de silicone de 100cm². Nos locais de amostragem (pontos críticos, ponto 3.1.1) onde não era possível a aplicação da janela, a amostragem foi efetuada numa área semelhante a 100cm². O processo de amostragem foi idêntico ao já apresentado no ponto 3.2.4 Processo de Validação – Método de Amostragem.

Análise das amostras

As condições cromatográficas e os materiais utilizados na análise das amostras de validação de limpeza encontram-se na Tabela 3-21.

Tabela 3-21 - Condições cromatográficas e materiais usados na análise das amostras de validação de limpeza.

	Para o Produto 1	Para o Produto 9
Equipamento HPLC	Agilent 1100 Series	Agilent 1100 Series; Merck Hitachi Lachrom
Condições Cromatográficas	Coluna: Thermo, Betasil C1, 250x4mm, 5µm Fase móvel (620:380): - Solução tampão de fosfato monobásico de amónio - Metanol	Coluna: LiChrospher C18, 25cm x 4mm, 5µm Fase móvel (1564:400:30:6): - Água destilada - Metanol - Acetato de sódio 0,5M - Ácido acético 0,7N

Tabela 3-21 - Condições cromatográficas e materiais usados na análise das amostras de validação de limpeza (continuação).

	Para o Produto 1	Para o Produto 9
Condições Cromatográficas	Coluna: Thermo, Betasil C1, 250x4mm, 5µm Fase móvel (620:380): - Solução tampão de fosfato monobásico de amônio - Metanol Caudal: 1,5 mL/min Comprimento de onda de detecção: 278nm Volume de Injeção: 10 µL Tempo de corrida: 20 minutos Temperatura da coluna: ambiente	Coluna: LiChrospher C18, 25cm x 4mm, 5µm Fase móvel (1564:400:30:6): - Água destilada - Metanol - Acetato de sódio 0,5M - Ácido acético 0,7N Caudal: 1,4 mL/min Comprimento de onda de detecção: 254nm Volume de Injeção: 20 µL Tempo de corrida: 15 minutos Temperatura da coluna: ambiente
Substâncias de referência	Padrão: SA1	Padrão: SA3
Vials	1,5mL, com septo e capsulados com alumínio	
Frascos para fase móvel	2500mL	
Balões volumétricos	20mL, 25mL, 50mL	
Provetas	50mL, 500mL, 1000mL	
Pipetas	Volumétricas diferenciais: 1mL, 2mL, 5mL ; Graduadas: 10mL	
Banho de ultrassons	Bandelin Sonorex RK 100; Brandson 5210	
Balanças	Mettler-Toledo AG 204 ; Mettler-Toledo AT250	

A preparação das fases móvel já foi descrita no ponto 3.2.4-Processo de Validação. Relativamente à preparação das soluções padrão e amostra para análise, o modo de proceder é o seguinte:

Para o Produto 1:

Solução amostra – Adicionou-se 50 mL de metanol a cada amostra. Colocou-se as amostras em agitação no banho de ultrassons durante 45 min. No final deste tempo arrefeceu à temperatura ambiente.

Solução padrão – Pesou-se 15 mg de padrão de SA1 para balão volumétrico de 50 mL e adicionou-se 40 mL de metanol. Agitou-se até completa dissolução e completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se 1 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL com metanol. (Concentração próxima do limite analítico (LA) de 15 µg/mL).

Para o Produto 9:

Solução amostra – Adicionou-se 50 mL de fase móvel a cada amostra e colocou-se as mesmas em agitação no banho de ultrassons durante 45 min. No final deste tempo arrefeceu-se à temperatura ambiente.

Solução padrão – Pesou-se 20 mg de padrão de SA3 para balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 40 mL de fase móvel e agitou-se até completa dissolução. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se 1 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL com fase móvel. (Concentração próxima do limite analítico (LA) de 20 µg/mL).

Em ambos os casos, a solução padrão e as amostras foram colocadas em *vials* e colocaram-se os mesmos no HPLC para análise: a solução padrão foi a analisar duas vezes e cada amostra também foi analisada duas vezes.

Após obter os resultados das amostras analisadas no HPLC, o objetivo é determinar o teor da substância ativa presente e compará-lo com o valor do padrão. Deste modo a fórmula a utilizar é,

$$T = \frac{T_p \times P \times A_a \times 1000}{V_p \times A_p} \quad \text{Equação 3.2}$$

em que:

T – Teor de SA1 ou SA3, em µg/mL

T_p – Toma de ensaio padrão, em mg (para a SA1 15mg, para a SA3 20mg)

P – Atividade do padrão de SA (0,83 para a SA1 - 83% - e 0,938 para a SA3 – 93,8%)

A_a – Área do pico correspondente a SA1 ou SA2 no cromatograma da solução amostra

V_p – Volume total de diluição do padrão, em mL (1000mL, tanto para a SA1 como para a SA3)

A_p – Área do pico correspondente a SA1 ou SA2 no cromatograma da solução padrão

Critério de Aceitação

O critério de aceitação para este teste baseia-se no limite analítico calculado para cada equipamento, com base no valor encontrado para o fator de recuperação na validação do método analítico (os cálculos dos fatores de recuperação são apresentados no capítulo seguinte: Resultados e Discussão). O teor encontrado em cada amostra, seja para a SA1 como para a SA3, tem de ser inferior ao limite analítico.

Deste modo, para os dois produtos estudados, os limites analíticos impostos são os apresentados na Tabela 3-22.

Tabela 3-22 - Critérios de aceitação para a determinação de substância ativa.

	LA (µg /mL)	
	Para o Produto 1	Para o Produto 9
Misturador Bicónico	17,0	19,8
Câmara de Pesagem	12,8	-
Tamisador	62,2	72,3
Compactadora	74,4	86,5
Máquina de Comprimir e Despoeirador	105,5	117,3
Bacias de Revestimento	39,5	-

4.

Resultados e Discussão

4.1. Validação do Método Analítico

Os resultados e respectiva discussão apresentam-se de seguida para cada produto estudado separadamente.

4.1.1. Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico Validado para o Produto 1

Seletividade:

Os cromatogramas obtidos nos vários pontos de estudo da seletividade para o produto 1, encontram-se de seguida da Figura 4-1 à Figura 4-11.

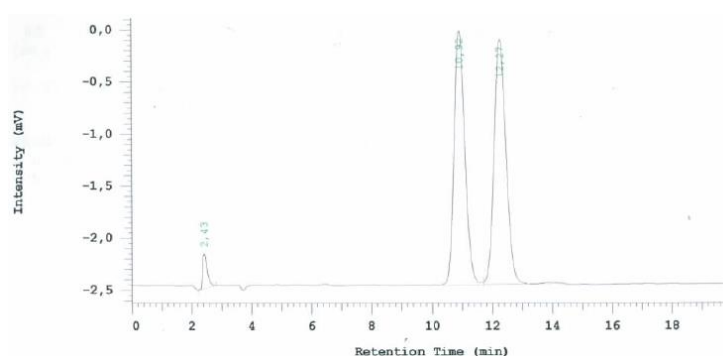


Figura 4-1 - Cromatograma correspondente à solução a 50% do limite analítico (substância ativa).

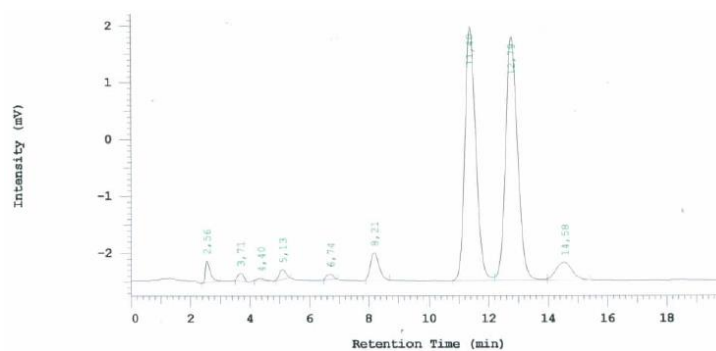


Figura 4-2 - Cromatograma correspondente à solução ao limite analítico (substância ativa).

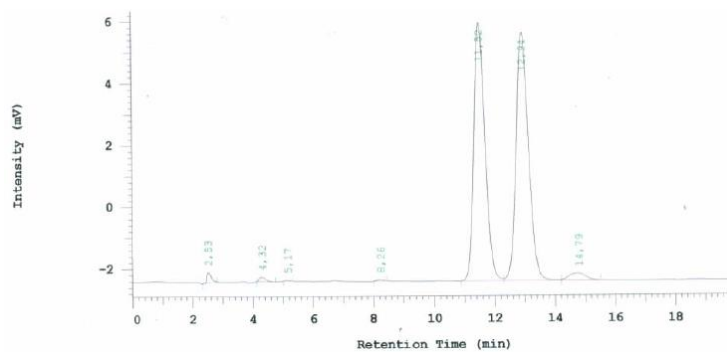


Figura 4-3 - Cromatograma correspondente à solução a 200% do limite analítico (substância ativa).

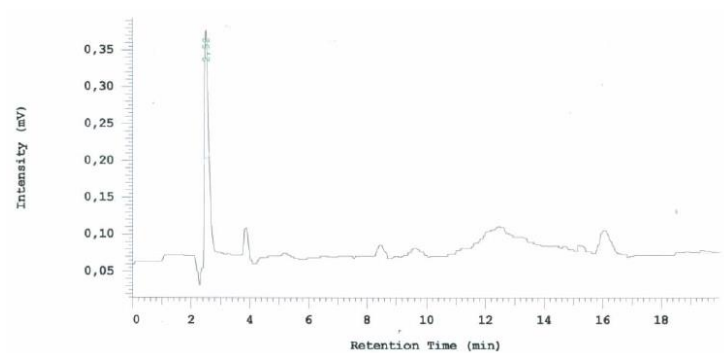


Figura 4-4 - Cromatograma correspondente ao solvente utilizado na preparação das amostras (metanol).

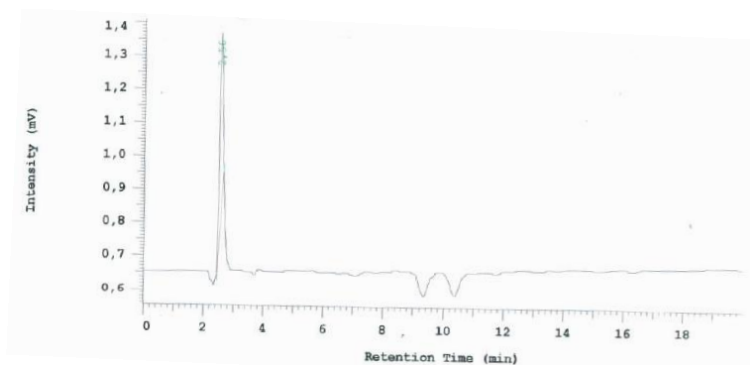


Figura 4-5 - Cromatograma correspondente ao "branco" de swab.

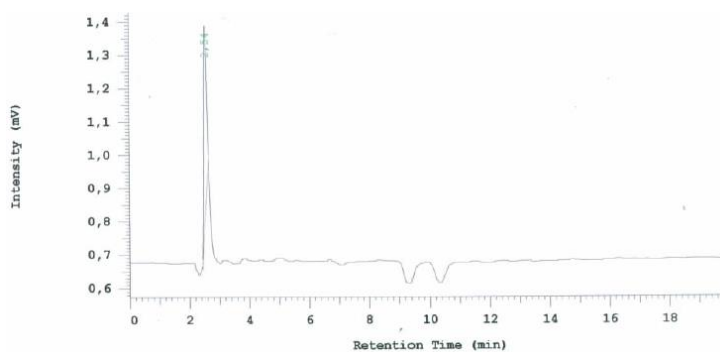


Figura 4-6 - Cromatograma correspondente ao "branco" de recuperação da placa.

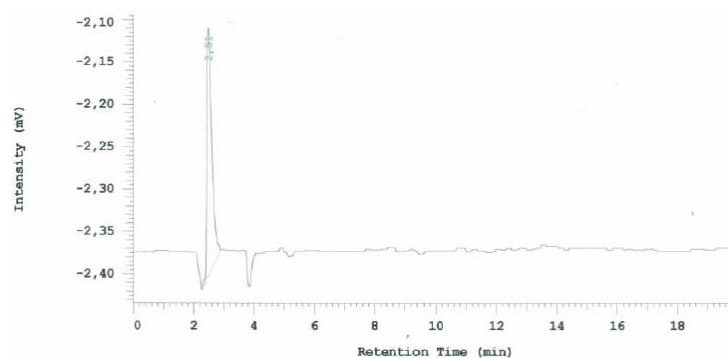


Figura 4-7 - Cromatograma correspondente ao "branco" de recuperação da placa e/ou outras soluções.

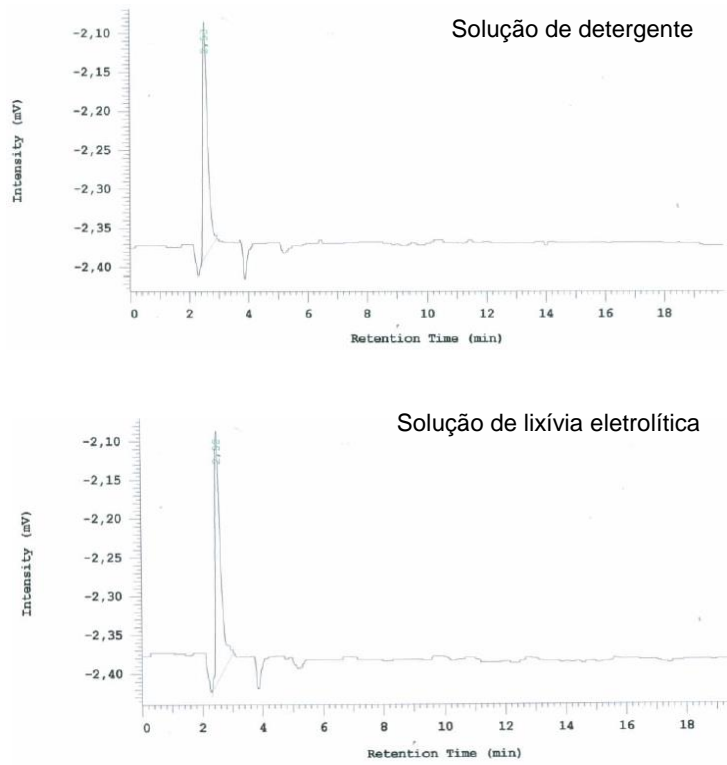


Figura 4-8 - Cromatogramas correspondentes às soluções de detergente e/ou de outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm.

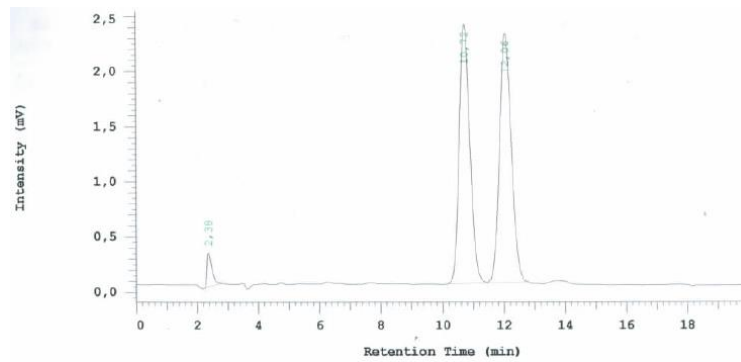


Figura 4-9 - Cromatograma correspondente à solução de detergente e/ou outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA50%.

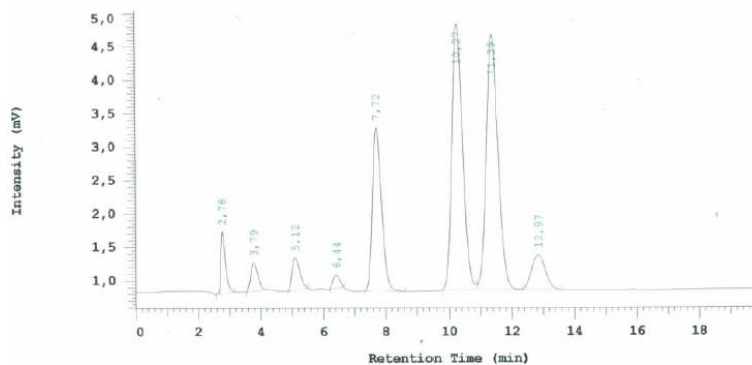


Figura 4-10 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do swab.

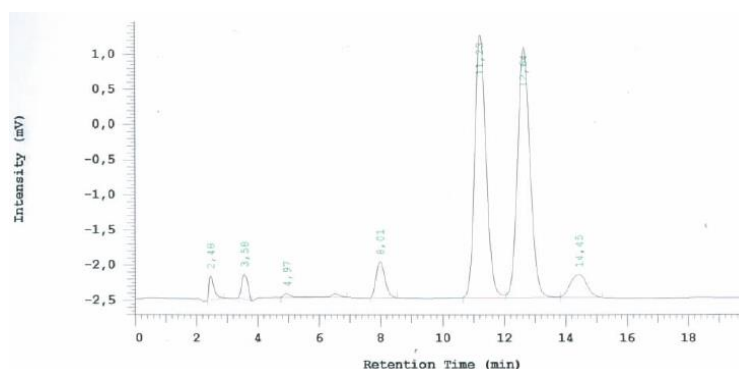


Figura 4-11 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa.

As soluções padrão LA 50%, LA e LA 200% (Figura 4-1, Figura 4-2, Figura 4-3) apresentam os mesmos picos que vão aumentando conforme a concentração também aumenta, tal como esperado.

Comparando o solvente utilizado na preparação das amostras (Figura 4-4) com o branco de swab (Figura 4-5) e o branco de recuperação da placa (Figura 4-6) verifica-se que têm o mesmo pico cromatográfico, sendo que no branco de swab e no branco de recuperação da placa o pico é maior. No entanto pode-se concluir que não existem possíveis interferências com os picos cromatográficos de SA1, visto que este pico aparece perto dos 2,3 min e os dois picos de SA1 aparecem perto dos 11 e 12 min.

Relativamente ao detergente e/ou outras soluções de lavagem, observando o branco (Figura 4-7) e as soluções de detergente e lixívia (Figura 4-8) verifica-se que todas apresentam um pico semelhante, de modo a que se pode concluir que nem o detergente nem a lixívia electrolítica interferem com o aparecimento do analito. Analogamente, ao se comparar a solução de detergente e/ou outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm contendo o analito na concentração LA 50% (Figura 4-9) com a solução padrão de LA 50% (Figura 4-1), verifica-se que os picos cromatográficos existentes no cromatograma da solução LA50% são idênticos aos que aparecem no cromatogramas da Figura 4-9.

A solução amostra de recuperação do swab (Figura 4-10) e a solução amostra de recuperação da placa (Figura 4-11) apresentam respostas semelhantes às da solução padrão LA (Figura 4-2) tal como era esperado. Deste modo, pode-se concluir que o método analítico por HPLC tem uma boa seletividade.

Precisão do sistema:

Este parâmetro é avaliado através dos valores obtidos para os coeficientes de variação (CV). Os resultados obtidos para a precisão do sistema encontram-se na Tabela 4-1 e os CV obtidos para as três soluções analisadas são inferiores os limites máximos estipulados, pelo que se conclui que o sistema tem uma boa precisão e é adequado. O valor máximo de CV para o nível do LA50% é de 15%, enquanto que para o nível LA e LA200% o valor máximo é de 10%.

Tabela 4-1 - Resultados da precisão do sistema – Validação do método analítico para a SA1.

Leitura	LA 50% (Área)	LA (Área)	LA 200% (Área)
1	87 151	223 648	381 958
2	87 338	218 984	399 072
3	87 561	196 578	383 882
4	85 934	202 862	411 527
5	87 925	202 816	393 993
6	93 533	203 159	387 288
7	-	199 832	-
8	-	188 318	-
9	-	198 759	-
10	-	197 142	-
Média	88 240	203 210	392 953
Máximo	93 533	223 648	411 527
Mínimo	85 934	188 318	381 958
DP	2 679	10 544	11 125
CV (%)	3,04	5,19	2,83

Repetibilidade do método:

Também este parâmetro é avaliado através dos coeficientes de variação. Os CV's obtidos encontram-se abaixo do limite máximo estipulado (15%) para este parâmetro, sendo que deste modo é possível concluir que este método tem uma repetibilidade adequada para a finalidade. As áreas dos picos dos cromatogramas, bem como os teores em SA1 calculados encontram-se na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Resultados da repetibilidade do método - Validação do método analítico para a SA1.

Amostras	Recuperação dos Swabs		Recuperação das Placas	
	Área	Teor (%)	Área	Teor (%)
LA				
Padrão (inj 1)	237 087	-	231 961	-
Padrão (inj 2)	235 537	-	215 749	-
1	193 593	81,96	196 534	87,83
2	162 125	68,64	193 863	86,64
3	156 477	66,24	196 939	88,01
4	147 227	62,33	203 414	90,91
5	153 363	64,93	217 781	97,33
6	171 304	72,52	186 924	83,54
Média	-	69,44	-	89,04
Máximo	-	81,96	-	97,33
Mínimo	-	62,33	-	83,54
DP	-	7,04	-	4,71
CV (%)	-	10,14	-	5,29

Exatidão:

Como já foi referido anteriormente, a exatidão do método é testada de duas formas. Os resultados obtidos para este parâmetro estão na Tabela 4-3 e Tabela 4-4.

1 – Recuperação Swab → Solvente

Tabela 4-3 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico para a SA1.

Nível	Toma (mg)	Área	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA em %
LA 50%	0,0062	87 372	91,22	91,32	26,34
	0,0062	77 182	80,59		
	0,0062	97 827	102,14		
LA	0,0124	193 593	81,96	72,28	-
	0,0124	162 125	68,64		
	0,0124	156 477	66,24		
LA 200%	0,0248	309 949	88,15	88,43	22,34
	0,0248	340 005	96,70		
	0,0248	282 836	80,44		
Média	-	-	84,01	-	-
Máximo	-	-	102,14	-	-
Mínimo	-	-	66,24	-	-
DP	-	-	11,93	-	-
CV (%)	-	-	14,21	-	-

Na recuperação *Swab* → Solvente os valores médios obtidos para o conjunto de percentagens de recuperação das amostras analisadas ao nível LA 50%, LA e LA 200% foram de 91,32%, 72,28% e 88,43%, respetivamente. A percentagem de recuperação para o LA 50% deverá encontrar-se entre 80-120%, o que se verifica. A percentagem de recuperação para o LA e LA 200% deverá estar entre 90-110%, o que não acontece. De qualquer modo para este estudo, o importante é avaliar qual a percentagem de recuperação da Placa → *Swab* → Solvente, pois na fase de amostragem nos equipamentos após limpeza será este o método aplicado.

2 – Recuperação do método de amostragem Placa → *Swab* → Solvente

Tabela 4-4 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico para a SA1.

Nível	Toma (mg)	Área	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA em %
LA 50%	0,0062	97 960	74,35	85,31	-2,49
	0,0062	106 162	80,58		
	0,0062	133 088	101,01		
LA	0,0124	196 534	87,83	87,50	-
	0,0124	193 863	86,64		
	0,0124	196 939	88,01		
LA 200%	0,0248	372 401	78,63	74,53	-14,82
	0,0248	353 160	74,57		
	0,0248	333 385	70,39		
Média	-	-	82,45	-	-
Máximo	-	-	101,01	-	-
Mínimo	-	-	70,39	-	-
DP	-	-	9,44	-	-
CV (%)	-	-	11,45	-	-

Na recuperação Placa → *Swab* → Solvente, os valores médios obtidos para as amostragens efetuadas ao nível do LA 50%, LA e LA 200% foram, respetivamente, 85,31%, 87,50% e 74,53%. O desvio do LA 50% relativamente ao LA foi de 2,49, inferior ao limite máximo de 25%. O desvio do LA 200% relativamente ao LA foi de 14,82, que apesar de estar perto do limite máximo, se encontra baixo deste, 15%.

Tendo em conta estes resultados, a percentagem de recuperação encontrada foi de 82,45%, o que implica que o fator de recuperação é de 0,8245. Deste modo o LA real será de 12,3675 µg/ml.

Linearidade:

Os resultados para o parâmetro da linearidade apresentam-se na Tabela 4-5 e o respetivo gráfico com a curva de linearidade na Figura 4-12.

Tabela 4-5 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA1.

Diluição	C (µg/ml)	Áreas (média)	Áreas corrigidas	Cc (µg/ml)	Viés	Fatores Resposta	Desvio %
D1	6,203	116 118,0	114 612,647	6,276	1,19	18 721,16	-6,49
D2	9,304	170 410,0	178 082,552	8,929	-4,03	18 316,27	-8,51
D3	12,405	248 361,0	241 552,457	12,738	2,68	20 021,04	0,00
D4	18,608	369 540,5	368 492,267	18,659	0,28	19 859,76	-0,81
D5	24,810	493 742,5	495 432,078	24,727	-0,33	19 900,95	-0,60
				Média	-0,04	19 363,84	-3,28
				D.P	---	786,89	---
				C.V.	---	4,06	---

C = Concentração da solução final (µg/ml)

Cc = Concentração corrigida da solução final (µg/ml)

Viés = (Cc-C) x 100 / C

Fatores resposta = Áreas / C

D.P. = Desvio padrão

Desvio = (fact.resp. – fact.resp.alvo) x 100 / fact.resp.alvo.

C.V. = coeficiente de variação

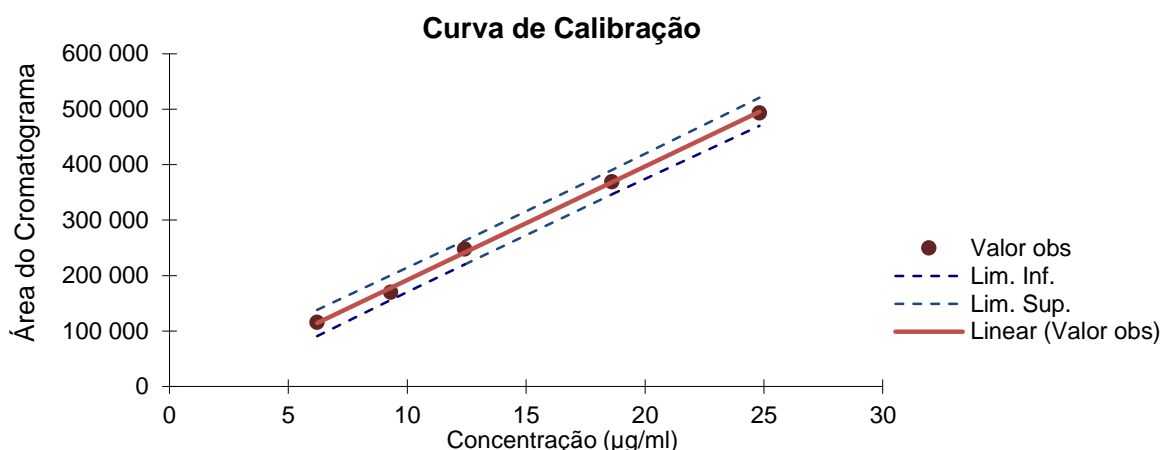


Figura 4-12 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA1.

Pela observação da tabela e curva de calibração, pode-se concluir que o método aplicado tem uma linearidade adequada à sua finalidade, tendo em conta as concentrações estudadas. O valor do coeficiente de correlação da reta de regressão linear é de 0,9994, valor este superior ao limite mínimo para este parâmetro (0,99); os pontos representados na curva de calibração encontram-se bem alinhados com a reta, verificando-se que apenas um ponto (D2) se encontra ligeiramente afastado.

Limite de Quantificação e Limite de Detecção:

O limite de quantificação e o limite de deteção foram ambos estimados com base na curva de calibração do analito (parâmetro da linearidade), através da Equação 2.9 e da Equação 2.10:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} = 0,9831 \mu\text{g/mL}$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{S} = 2,978 \mu\text{g/mL}$$

A análise confirmatória do LQ não foi efetuada para a concentração de 2,978 µg/mL como era suposto mas para uma concentração menor, de 0,75 µg/mL, valor inferior ao limite de deteção. Esta análise de confirmação foi realizada num aparelho de HPLC com uma sensibilidade melhor que o HPLC utilizado na restante validação do método analítico, pelo que se optou por analisar uma solução em que a concentração fosse mais baixa que o obtido através da curva de calibração. Deste modo foi possível identificar que o aparelho HPLC consegue detetar uma concentração ainda mais baixa que o valor teórico do LD. Os resultados para a análise confirmatória do LQ encontram-se na Tabela 4-6.

Tabela 4-6 - Resultados do limite de quantificação- Validação do método analítico para a SA1.

Leitura	Área
1	10,48923
2	10,00762
3	10,41475
4	10,04603
5	10,42378
6	10,35534
Média	10,28946
Máxima	10,48923
Mínima	10,00762
DP	0,20817
CV (%)	2,02

Com esta concentração, verifica-se que o método possui um grau de precisão adequado, pois o coeficiente de variação obtido, 2,02%, é inferior ao valor máximo estipulado de 15%.

Estabilidades:

- Estabilidade da solução problema e padrão

Os resultados da estabilidade da solução problema e solução padrão encontram-se na Tabela 4-7.

Tabela 4-7 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico para a SA1.

A - Temperatura ambiente com exposição à luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	97,00	-
	24	103,45	6,65
Problema	0	78,18	-
	24	51,11	-34,63

Tabela 4-7 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico para a SA1 (continuação).

B - Temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	97,00	-
	24	101,81	4,96
Problema	0	78,18	-
	24	79,73	1,97

No estudo efetuado à temperatura ambiente com exposição à luz foi verificado que tanto a solução padrão como a solução problema não são estáveis durante as 24h, pois a variação de ambas as respostas são superiores ao limite máximo para este parâmetro (5%).

No estudo efetuado à temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz verifica-se que ambas as soluções são estáveis durante pelo menos 24h, visto que o limite máximo para este parâmetro é de 5% e ambas as variações são inferiores a este valor.

- Estabilidade da substância no equipamento

Os resultados obtidos para este estudo de estabilidade estão indicados na Tabela 4-8. A variação encontrada para este caso foi superior ao limite de 15%, pelo que se conclui que a substância ativa 1 não é estável durante 24h. Deste modo a amostragem para validação de limpeza para cada equipamento terá de ser efetuada logo após a limpeza do mesmo.

Tabela 4-8 - Resultados da estabilidade da substância no equipamento - Validação do método analítico para a SA1.

Amostras / Nível	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
LA	0	89,04	-
	24	66,13	-25,73

- Estabilidade do produto no equipamento

O estudo para esta estabilidade foi efetuado durante 67 dias, sendo que foram realizadas quatro análises ao longo deste tempo. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4-9.

Tabela 4-9 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA1.

	Dia 0	Dia 7	Dia 20	Dia 67
A - soma das áreas dos picos de SA1 na solução amostra	5 187 865	4 386 797	3 224,850	3 268,473
B - média da soma das áreas dos picos de SA1 na solução padrão	5 064 711	4 252 690	3 511,424	3 434,519

Tabela 4-9 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA1 (continuação).

	Dia 0	Dia 7	Dia 20	Dia 67
Ws - peso padrão de SA1, em mg	62,06	62,06	62,90	62,00
Wt- peso da amostra, em mg	92,29	92,33	92,26	92,05
L - Quantidade de SA1 rotulada, em mg/comp.	500	500	500	500
Aw - massa média dos comprimidos de SA1	921,7	921,7	921,7	921,7
P - potência de padrão de SA1	0,827	0,827	0,827	0,830
Teor em SA1 (%)	105,007	105,701	95,453	98,072
Varição de teor em relação ao dia 0 (%)	-	0,661	-9,098	-6,604

Durante a realização deste estudo foi possível verificar que com o passar do tempo o produto vai perdendo teor em SA1. A última análise efetuada ao pó exposto na placa revelou uma variação de teor menor do que a análise realizada aos 20 dias possivelmente devido a um erro no método, pois teoricamente a amostra deveria ir perdendo teor ao longo do tempo e não mantendo ou reduzindo essa variação.

No entanto, apesar desta variação de teor ter ficado abaixo do limite estipulado de 20%, ao longo deste estudo constatou-se que após a análise dos 20 dias, o produto exposto na placa tornou-se amarelo (*vide* Figura 4-13).



Figura 4-13 - Estudo da estabilidade do produto no equipamento (dia 67).

4.1.2. Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico Validado para o Produto 9

Seletividade:

Os cromatogramas obtidos nos vários pontos de estudo da seletividade para o produto 9, encontram-se de seguida da Figura 4-14 à Figura 4-24.

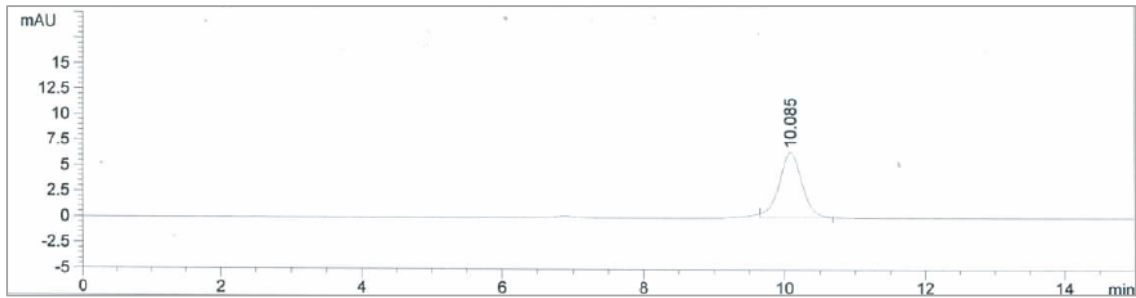


Figura 4-14 - Cromatograma correspondente à solução a 50% do limite analítico (substância ativa).

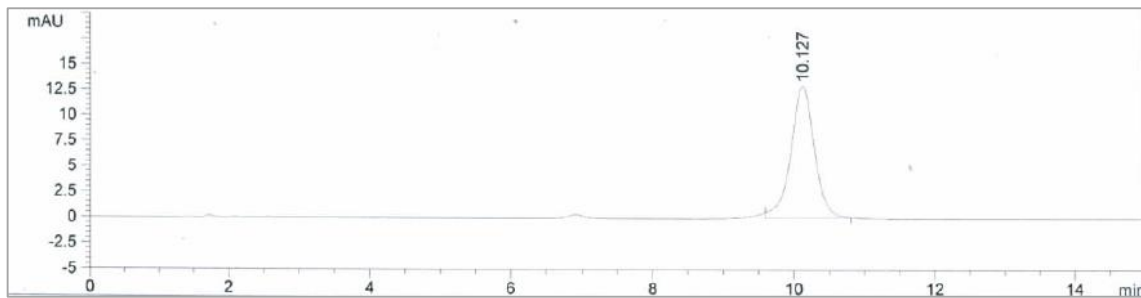


Figura 4-15 - Cromatograma correspondente à solução ao limite analítico (substância ativa).

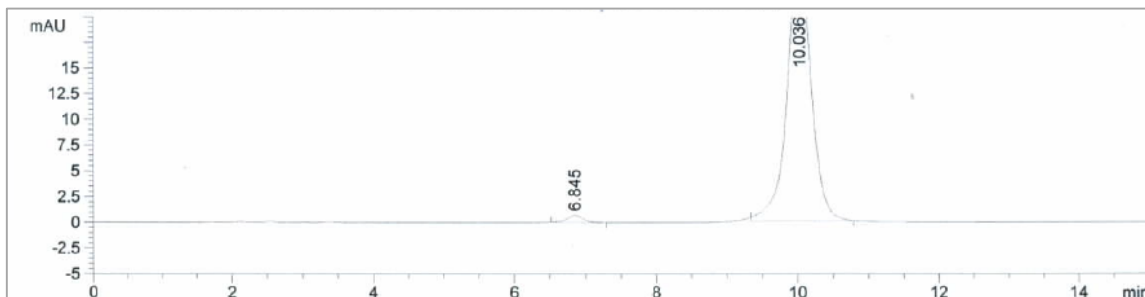


Figura 4-16 - Cromatograma correspondente à solução a 200% do limite analítico (substância ativa).

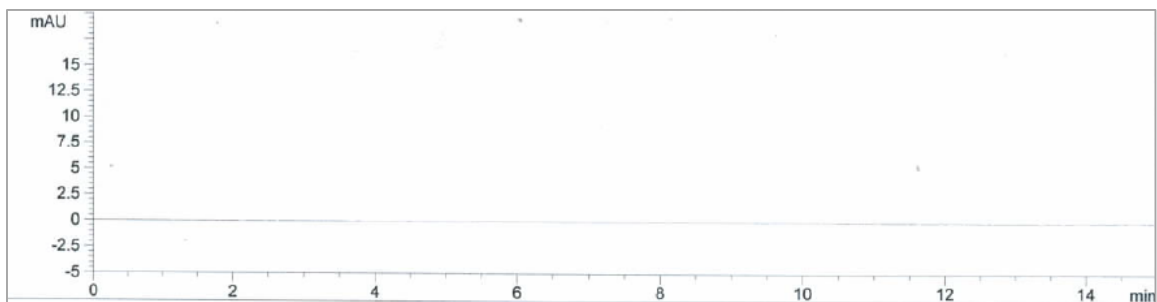


Figura 4-17 - Cromatograma correspondente ao solvente utilizado na preparação das amostras (fase móvel).

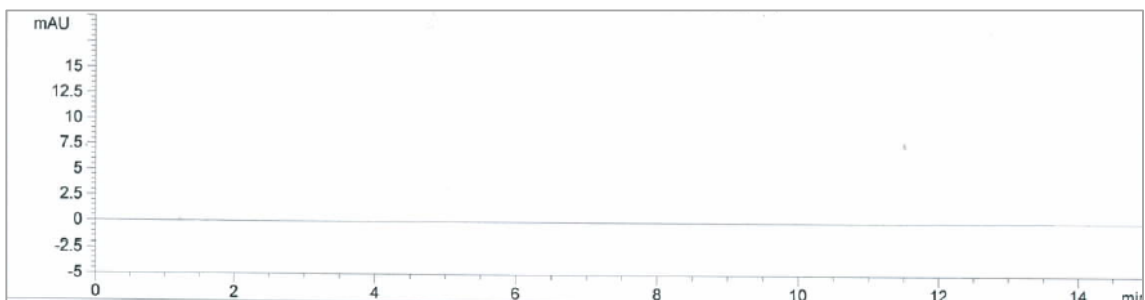


Figura 4-18 - Cromatograma correspondente “branco” de swab.

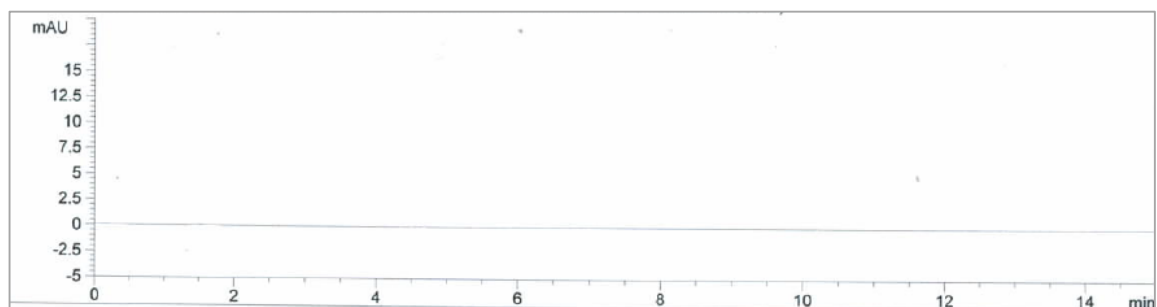


Figura 4-19 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa.

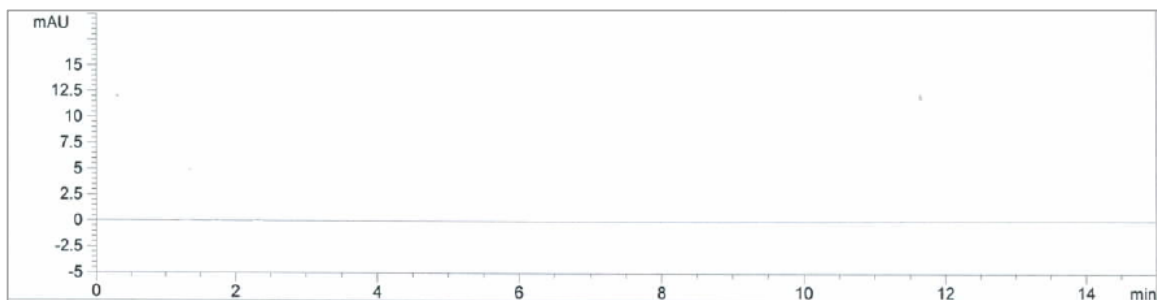


Figura 4-20 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10 ppm.

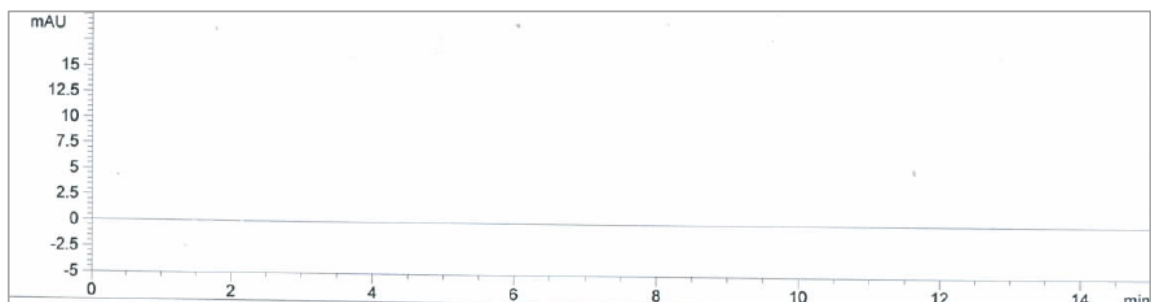


Figura 4-21 - Cromatograma correspondente ao “branco” de recuperação da placa de detergente e/ou de outras soluções de lavagem.

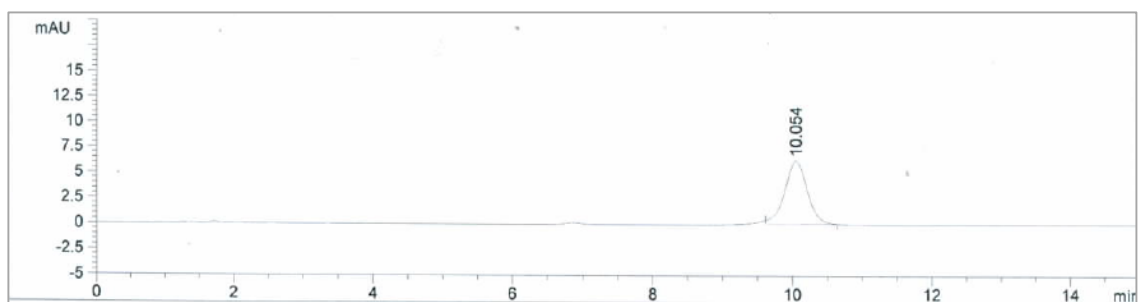


Figura 4-22 - Cromatograma correspondente à solução de detergente a 10 ppm contendo o analito na concentração correspondente ao LA50%.

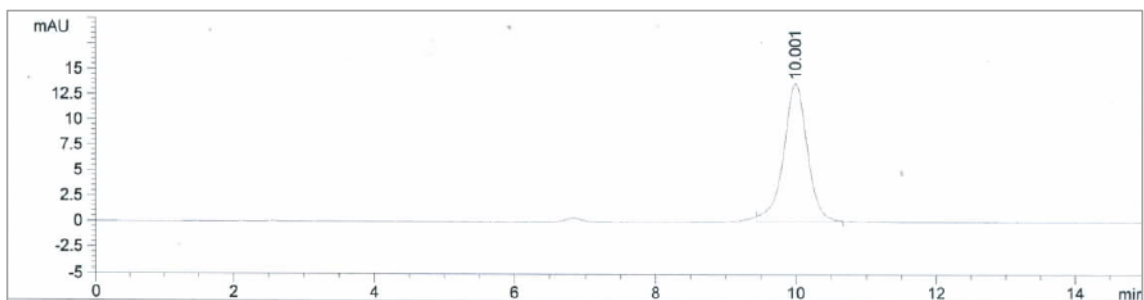


Figura 4-23 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação do swab.

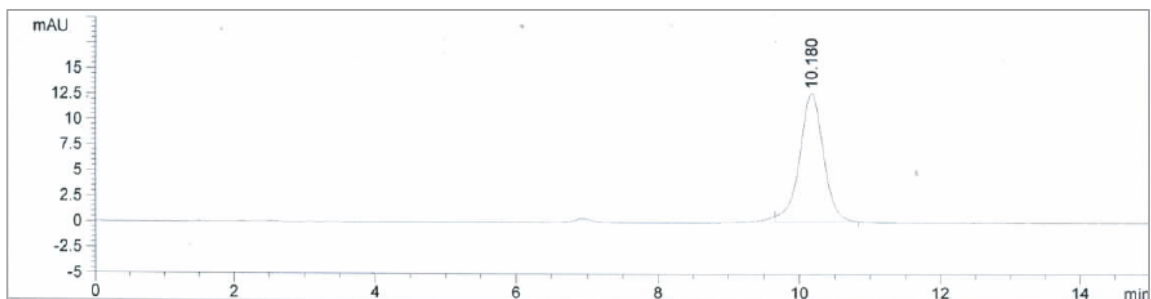


Figura 4-24 - Cromatograma correspondente à amostra de recuperação da placa.

As soluções padrão LA 50% (Figura 4-14), LA (Figura 4-15) e LA 200% (Figura 4-16) apresentam os mesmos picos que vão aumentando conforme a concentração também aumenta, tal como era esperado. Relativamente aos resultados obtidos na análise ao solvente utilizado na preparação das amostras - fase móvel (Figura 4-17), branco de *swab* (Figura 4-18) e branco de recuperação da placa (Figura 4-19) verifica-se a inexistência de resposta, pelo que é possível concluir que nem o solvente, nem o *swab* ou o processo de recuperação da placa intervêm com o pico cromatográfico da SA3.

No que diz respeito ao detergente, observando o branco (Figura 4-21) e a solução de detergente (Figura 4-20) pode-se concluir que o mesmo não interfere com o analito. Igualmente, ao se comparar a solução de detergente e/ou outras soluções de lavagem utilizadas a 10 ppm contendo o analito na concentração LA 50% (Figura 4-22) com a solução padrão de LA 50% (Figura 4-14), verifica-se que o pico cromatográfico de SA3 existente no cromatograma da solução LA50% é idêntico ao que aparece no cromatograma da Figura 4-22.

A solução amostra de recuperação do *swab* (Figura 4-23) e a solução amostra de recuperação da placa (Figura 4-24) apresentam respostas semelhantes às da solução padrão LA (Figura 4-15).

Por observação dos cromatogramas apresentados, verifica-se que o método é seletivo para a substância ativa relativamente aos outros possíveis interferentes existentes na amostra. Nas condições cromatográficas apresentadas, o pico correspondente à SA3 é obtido com tempo de retenção de cerca de 10 min.

Precisão do sistema:

Como já referido anteriormente, este parâmetro é avaliado através dos valores obtidos para os coeficientes de variação (CV). Os resultados deste parâmetro estão na Tabela 4-10.

Tabela 4-10 - Resultados da precisão do sistema - Validação do método analítico para a SA3.

Leitura	LA 50% (Área)	LA (Área)	LA200% (Área)
1	142,8933	296,8210	608,9684
2	143,0051	296,0605	608,0243
3	142,7025	296,9167	608,1215
4	142,7703	295,9903	606,9311
5	142,4669	296,1890	607,0380
6	142,4691	295,7706	607,2499
7	-	295,4157	-
8	-	295,6689	-
9	-	295,6976	-
10	-	295,5578	-
Média	142,7179	296,0088	607,7222
Máximo	143,0051	296,9167	608,9684
Mínimo	142,4669	295,4157	606,9311
DP	0,22	0,51	0,79
CV (%)	0,15	0,17	0,13

Os CV obtidos na precisão do sistema para as três soluções analisadas são inferiores os limites máximos estipulados. Deste modo para o nível do LA 50% o valor máximo para o CV é de 15%, enquanto que para o nível LA e LA200% o valor máximo é de 10%. Conclui-se assim, tendo em conta os bons resultados, que o sistema tem uma boa precisão, e que é adequada à finalidade do método.

Repetibilidade do método:

A repetibilidade do método é avaliada através da percentagem de recuperação obtida para os *swabs* e para as placas. Os resultados estão na Tabela 4-11.

Tabela 4-11 - Resultados da repetibilidade do método - Validação do método analítico para a SA3.

Amostras LA	Recuperação dos Swabs		Recuperação das Placas	
	Área	Teor (%)	Área	Teor (%)
Padrão (inj1)	292,79770	-	294,56537	-
Padrão (inj2)	292,56439	-	-	-
1	316,01582	109,34	293,88165	101,04
2	316,81432	109,62	297,39626	102,24
3	315,51488	109,17	278,92497	95,89
4	308,32991	106,69	282,73169	97,20
5	313,66851	108,53	284,07590	97,66
6	315,05026	109,01	237,38007	81,61
Média	-	108,73	-	95,94
Máximo	-	109,62	-	102,24
Mínimo	-	106,69	-	81,61
DP	-	1,06	-	7,42
CV (%)	-	0,98	-	7,74

Os valores obtidos encontram-se abaixo do limite sendo que se obteve para os *swabs* um CV de 0,98%, e para as placas um CV de 7,74%, valores inferiores a 15%. Deste modo é possível concluir que este método tem uma repetibilidade adequada para a finalidade.

Exatidão:

Os resultados obtidos para o parâmetro da exatidão estão presentes na Tabela 4-12 e Tabela 4-13.

1 – Recuperação *Swab* → Solvente

Na recuperação *Swab* → Solvente os valores médios obtidos para o conjunto de percentagens de recuperação das amostras analisadas ao nível LA 50%, LA e LA 200% foram de 110,94%, 109,38% e 106,92%, respetivamente. A percentagem de recuperação para o LA 50% deverá encontrar-se entre 80-120%, e a percentagem de recuperação para o LA e LA 200% deverá estar entre 90-110%, o que aconteceu como se pode ver na Tabela 4-12.

Tabela 4-12 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico para a SA3.

Nível	Toma (mg)	Área	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA em %
LA 50%	0,00939	152,208	110,18	110,94	1,43
	0,00939	155,436	112,51		
	0,00939	152,147	110,13		
LA	0,01878	316,016	109,34	109,38	0
	0,01878	316,814	109,62		
	0,01878	315,515	109,17		
LA 200%	0,03757	654,725	110,47	106,92	-2,25
	0,03757	607,000	102,42		
	0,03757	639,351	107,88		
Média	-	-	109,08	-	-
Máximo	-	-	112,51	-	-
Mínimo	-	-	102,42	-	-
DP	-	-	2,79	-	-
CV (%)	-	-	2,56	-	-

2 – Recuperação do método de amostragem Placa → *Swab* → Solvente

Tabela 4-13 - Resultados da exatidão - Validação do método analítico para a SA3.

Nível	Toma (mg)	Área	Teor (%)	Média por nível	Desvio do LA em %
LA 50%	0,00939	140,19	100,59	101,54	1,82
	0,00939	145,13	104,76		
	0,00939	142,34	99,27		
LA	0,01878	293,88	101,04	99,72	0
	0,01878	297,40	102,24		
	0,01878	278,92	95,89		
LA 200%	0,03757	507,13	84,78	86,43	-13,33
	0,03757	607,30	101,53		
	0,03757	436,64	73,00		
Média	-	-	95,90	-	-
Máximo	-	-	104,76	-	-
Mínimo	-	-	73,00	-	-
DP	-	-	10,36	-	-
CV (%)	-	-	10,80	-	-

Na recuperação Placa → *Swab* → Solvente, os valores médios obtidos para as amostragens efetuadas ao nível do LA 50%, LA e LA 200% foram, respetivamente, 101,54%, 99,72% e 86,43%. O desvio do LA 50% relativamente ao LA foi de 1,82, inferior ao limite máximo de 25%. O desvio do LA 200% relativamente ao LA foi de -13,33, que também se encontra abaixo do limite deste, 15%.

Tendo em conta os resultados obtidos, a percentagem de recuperação encontrada foi de 95,90%, o que implica que o fator de recuperação é de 0,9590. Deste modo o LA real será de 19,18 µg/ml.

Relativamente a alguns dos valores obtidos serem superiores a 100%, tal pode ser justificado pelo fato de os volumes a medir serem muito baixos o que pode ter introduzido algum erro na contaminação dos *swabs* e das placas.

Linearidade:

Os dados utilizados e os resultados obtidos para o parâmetro de linearidade estão presentes na Tabela 4-14 e na Figura 4-25.

Tabela 4-14 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA3.

Diluição	C (µg/mL)	Áreas (média)	Áreas corrigida	Cc (µg/mL)	Viés	Fatores Resposta	Desvio %
D1	9,511	141,805	141,658	9,520	0,09	14,91	-4,33
D2	15,218	235,819	234,729	15,285	0,44	15,50	-0,56
D3	19,023	296,441	296,776	19,002	-0,11	15,58	0,00
D4	28,534	449,507	451,894	28,388	-0,51	15,75	1,09
D5	38,045	608,496	607,012	38,136	0,24	15,99	2,63
				Média	0,03	15,55	-0,23
				D.P.	---	0,40	---
				C.V.	---	2,60	---

C = Concentração da solução final (µg/mL)

Cc = Concentração corrigida da solução final (µg/mL)

Viés = $(C_c - C) \times 100 / C$

Fatores resposta = $\text{Áreas} / C$

Desvio = $(\text{fact. resp.} - \text{fact. resp. alvo}) \times 100 / \text{fact. resp. alvo}$

D.P. = Desvio padrão

C.V. = Coeficiente de variação

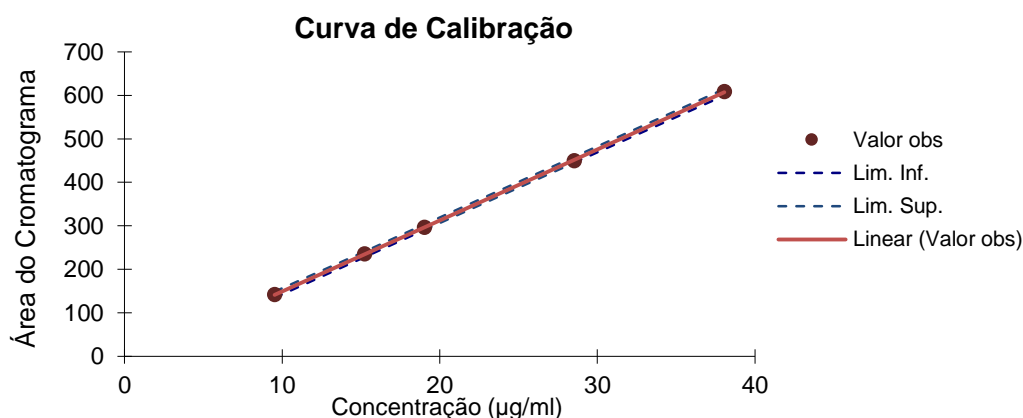


Figura 4-25 - Resultados da linearidade - Validação do método analítico para a SA3.

Pela observação da tabela e curva de calibração anteriores, pode-se concluir que o método aplicado tem uma linearidade adequada à sua finalidade, tendo em conta as concentrações estudadas. Esta conclusão é sustentada pelo valor do coeficiente de correlação da reta de regressão linear é de 0,99996, valor este superior ao limite mínimo para este

parâmetro (0,99); os pontos representados na curva de calibração encontram-se bem alinhados com a reta e o rigor da linearização é de 99,96954.

Limite de Quantificação e Limite de Detecção:

O limite de quantificação e o limite de detecção foram ambos estimados com base na curva de calibração do analito (parâmetro da linearidade), através da Equação 2.9 e da Equação 2.10:

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} = 0,3548 \mu\text{g/mL} \qquad LQ = \frac{10\sigma}{S} = 1,0751 \mu\text{g/mL}$$

Este parâmetro é avaliado com base na análise confirmatória do limite de quantificação. Esta análise foi efetuada 6 vezes para uma concentração de 1 µg/ml e os resultados encontram-se na Tabela 4-15.

Tabela 4-15 - Resultados do Limite de Quantificação - Validação do método analítico para a SA3

Leitura	Área
1	13,58720
2	13,69031
3	13,69944
4	13,66995
5	13,57852
6	13,88265
Média	13,68468
Máxima	13,88265
Mínima	13,57852
DP	0,10994
CV (%)	0,80336

Mais uma vez, os resultados são avaliados com base no coeficiente de variação. Para esta concentração, verifica-se que o método possui um grau de precisão adequado, pois o coeficiente de variação obtido, 0,80%, é bastante inferior ao valor máximo admitido para o CV (≤ 15%).

Estabilidades:

- Estabilidade da solução problema e padrão

A estabilidade da solução problema e da solução padrão foram avaliadas e os resultados encontram-se na Tabela 4-16.

Tabela 4-16 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico para a SA3.

A - Temperatura ambiente com exposição à luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	98,92	-
	24	101,56	2,67
Problema	0	99,31	-
	24	82,60	-16,83

Tabela 4-16 - Resultados da estabilidade da solução problema e padrão - Validação do método analítico para a SA3 (continuação).

B - Temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz			
Tipo de solução	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
Padrão	0	98,92	-
	24	103,10	4,23
Problema	0	99,31	-
	24	84,50	-14,92

No estudo efetuado verificou-se que a solução padrão é estável tanto à temperatura ambiente com exposição à luz como à temperatura de frigorífico e ao abrigo da luz, visto que o limite para a variação é de 5% e os resultados obtidos foram inferiores a este valor.

Relativamente à solução problema, esta não é estável em ambos os ambientes testados, pois as variações de teor encontradas são superiores ao limite máximo estipulado de 5%.

- Estabilidade da substância no equipamento

A avaliação da estabilidade da substância no equipamento revelou que a SA3 é estável durante pelo menos 24h no equipamento. Os resultados estão na Tabela 4-17, onde se verifica que a variação para este caso foi inferior ao limite de 15%.

Tabela 4-17 - Resultados da estabilidade da substância no equipamento - Validação do método analítico para a SA3.

Amostras / Nível	Tempo (h)	Teor (%)	Variação (%)
LA	0	95,94	-
	24	96,57	0,66

- Estabilidade do produto no equipamento

Para o estudo desta estabilidade foram efetuadas quatro análises ao longo do tempo. A análise 1 corresponde ao dia 0 da placa exposta à temperatura ambiente mas sem exposição à luz. A análise 2 e a análise 3 foram realizadas passados 15 e 21 dias, respetivamente. Após estes 21 dias, expôs-se a placa à luz, sendo a análise 4 efetuada após 41 dias da placa exposta à temperatura ambiente e exposição à luz. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4-18.

Tabela 4-18 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA3.

	Placa à temperatura ambiente mas sem exposição à luz			Placa à temperatura ambiente mas com exposição à luz
	Análise 1	Análise 2	Análise 3	Análise 4
Tp – Toma de ensaio da substância química de referência utilizada, expressa em mg	25,37	25,50	25,14	24,61
P – Conteúdo de SA3 na substância química de referência utilizada (%)	0,938	0,938	0,938	0,938

Tabela 4-18 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA3.

	Placa à temperatura ambiente mas sem exposição à luz			Placa à temperatura ambiente mas com exposição à luz
	Análise 1	Análise 2	Análise 3	Análise 4
PM – Peso médio do comprimido, em mg	1 374,9	1 374,9	1 374,9	1 374,9
Aa – Área do pico correspondente a SA3 nos cromatogramas obtidos com a solução problema	1 555,556	1 409 745	1 543,007	1 238 667
Ap – Área do pico correspondente a SA3 nos cromatogramas obtidos com a solução padrão	1 567,559	1 405 716	1 519,461	1 273 593
Ta – Toma de ensaio da amostra, expressa em mg	32,48	32,67	32,52	32,66
D – Dosagem da forma farmacêutica em análise, expressa em mg	1 000	1 000	1 000	1 000
Teor em SA3 (%)	99,963	100,950	101,243	94,513
Varição de teor em relação ao dia 0 (%)	-	0,988	1,281	-6,647 (*)

(*) Variação de teor em relação à análise 3.

Durante a realização da primeira parte deste estudo (análise 1, 2 e 3) foi possível verificar que com o passar do tempo, 21 dias, o produto perde pouco teor em SA3. Durante a segunda parte do estudo, identificou-se que após 41 dias de exposição à luz a perda de teor de SA3 é cerca de 6,6%, no entanto este valor ainda se encontra dentro do limite estipulado de 20% para a variação de teor.

No entanto, apesar desta variação de teor ter ficado abaixo do limite constatou-se que após a análise 4, ou seja após a exposição da placa à luz, o produto exposto na placa tornou-se ligeiramente amarelado (vide Figura 4-26).

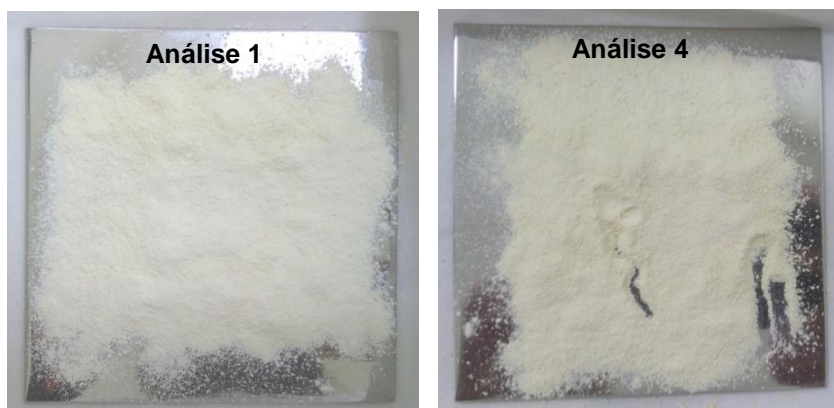


Figura 4-26 - Resultados da estabilidade do produto no equipamento - Validação do método analítico para a SA3.

4.2. Validação de Limpeza dos Equipamentos

4.2.1. Apresentação de Resultados

No seguimento de todas as amostragens efetuadas a todos os equipamentos mencionados anteriormente, apresentam-se de seguida os resultados obtidos. A partir da Tabela 4-19 até à Tabela 4-25 encontram-se as datas de produção, limpeza e amostragem para cada caso estudado e respetivos lotes de cada produto. Também são apresentados os resultados obtidos após as análises efetuadas às amostras recolhidas para cada teste de validade de limpeza.

No anexo A.2 mostram-se os resultados da cromatografia em HPLC. Neste anexo são apresentados os resultados obtidos por equipamento e por produto das análises efetuadas no HPLC.

Tabela 4-19 - Resultados obtidos para a Câmara de Pesagem.

Nº da Amostragem		1	2
Produto		Produto 1	
Lote		C004	D001
Data	Produção	06/12/2014	18/02/2015
	Limpeza	06/12/2014	19/02/2015
	Inspeção Visual	09/12/2014	20/02/2015
	Amostragem microbiológica	09/12/2014	20/02/2015
	Amostragem de resíduos de SA	09/12/2014	20/02/2015
Inspeção Visual			
Teste			
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C
Ausência de odores		C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura		C	C
Ausência de humidade		C	C
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)			
Ponto da amostragem			
Prato da balança de chão		0	8
Lamelas		7	6
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)			
Ponto da amostragem			
Prato da balança de chão		0,78985	ND
Lamelas		ND	ND

Tabela 4-20 - Resultados obtidos para o Tamisador.

Nº da Amostragem		1	2	1	2
Produto		Produto 1		Produto 9	
Lote		C004	D001	D003	D006
Data	Produção	05/12/2014	18/02/2015	07/01/2015	02/03/2015
	Limpeza	06/12/2014	19/02/2015	08/01/2015	03/03/2015
	Inspeção Visual	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem microbiológica	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de SA	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
Inspeção Visual					
Teste					
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de odores		C	C	C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C	C	C
Ausência de pedacinhos ou restos de gordura		C	C	C	C
Ausência de umidade		C	C	C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)					
Amostra: Branco		0,3476	0,11662	0,85066	0,11132
Amostra: A		0,3952	0,37873	3,17200	0,50772
Resultado TOC (Amostra A – Branco)		0,0476	0,26211	2,32134	0,39640
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)					
Ponto da amostragem					
Rede		0	4	1	1
Rebordo interno do cone cilíndrico		7	0	0	8
Saída de pó		0	0	2	0
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)					
Ponto da amostragem					
Rede		ND	ND	ND	ND
Rebordo interno do cone cilíndrico		ND	ND	ND	ND
Saída de pó		ND	ND	ND	ND

Tabela 4-21 - Resultados obtidos para o Misturador Bicônico.

Nº da Amostragem		1	2	1	2
Produto		Produto 1		Produto 9	
Lote		C004	D001	D003	D006
Data	Produção	05/12/2014	18/02/2015	07/01/2015	03/03/2015
	Limpeza	06/12/2014	19/02/2015	07/01/2015	05/03/2015

Tabela 4-21 - Resultados obtidos para o Misturador Bicônico (continuação).

Nº da Amostragem		1	2	1	2
Produto		Produto 1		Produto 9	
Lote		C004	D001	D003	D006
Data	Inspeção Visual	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem microbiológica	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de SA	09/12/2014	20/02/2015	09/01/2015	06/03/2015
Inspeção Visual					
Teste					
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de odores		C	C	C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C	C	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura		C	C	C	C
Ausência de humidade		C	C	C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)					
Amostra: Branco		0,2823	0,50947	0,58852	0,69569
Amostra: A		44,4967	1,49831	4,84800	2,67300
Resultado TOC (Amostra A – Branco)		44,2144	0,98884	4,25948	1,97731
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)					
Ponto da amostragem					
Rebordo interno da abertura larga com tampa amovível		0	10	0	1
Borracha amovível da tampa		0	1	0	5
Bisel a meio do equipamento (superfície lisa com uma curvatura)		0	5	0	0
Ponto central entre os biséis (lado esquerdo)		0	0	0	0
Ponto central entre os biséis (lado direito)		0	0	0	0
Tampa pequena		0	8	2	1
Tampa grande		0	0	0	2
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)					
Ponto da amostragem					
Rebordo interno da abertura larga com tampa amovível		ND	ND	ND	ND
Borracha amovível da tampa		ND	ND	ND	ND
Bisel a meio do equipamento (superfície lisa com uma curvatura)		ND	ND	ND	ND
Ponto central entre os biséis (lado esquerdo)		ND	ND	ND	ND
Ponto central entre os biséis (lado direito)		ND	ND	ND	ND
Tampa pequena		ND	ND	ND	ND
Tampa grande		ND	ND	ND	ND

Tabela 4-22 - Resultados obtidos para a Compactadora.

Nº da Amostragem		1	2	1	2
Produto		Produto 1		Produto 9	
Lote		C004	D001	D003	D006
Data	Produção	04/12/2014	18/02/2015	13/01/2015	03/03/2015
	Limpeza	12/12/2014	24/02/2015	14/01/2015	05/03/2015
	Inspeção Visual	15/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	15/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	06/03/2015
	Amostragem microbiológica	15/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	06/03/2015
	Amostragem de resíduos de SA	15/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	06/03/2015
Inspeção Visual					
Teste					
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de odores		C	C	C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C	C	C
Ausência de pedacinhos ou restos de gordura		C	C	C	C
Ausência de umidade		C	C	C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)					
Amostra: Branco		0,2628	0,00305	0,54883	0,13900
Amostra: A		1,0297	0,21844	2,47800	0,30561
Resultado TOC (Amostra A – Branco)		0,7669	0,21539	1,92917	0,16661
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)					
Ponto da amostragem					
Rolos		66	1	11	0
Depósito		26	0	0	8
Sem-fim		3	0	0	0
Granulador		12	0	0	0
Rede		2	0	0	0
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)					
Ponto da amostragem					
Rolos		ND	14,33505	ND	ND
Depósito		ND	ND	ND	ND
Sem-fim		ND	ND	ND	ND
Granulador		ND	ND	ND	ND
Rede		ND	ND	ND	ND

Tabela 4-23 - Resultados obtidos para a Máquina de Comprimir e Despoeirador.

Nº da Amostragem		1	2	1	2
Produto		Produto 1		Produto 9	
Lote		C004	D001	D003	D006
Data	Produção	11/12/2014	20/02/2015	13/01/2015	04/03/2015
	Limpeza	17/12/2014	23/02/2015	21/01/2015	06/03/2015
	Inspeção Visual	18/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	09/03/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	18/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	09/03/2015
	Amostragem microbiológica	18/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	09/03/2015
	Amostragem de resíduos de SA	18/12/2014	25/02/2015	28/01/2015	09/03/2015
Inspeção Visual					
Teste					
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C	C	C
Ausência de odores		C	C	C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C	C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C	C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C	C	C
Ausência de pedacinhos ou restos de gordura		C	C	C	C
Ausência de humidade		C	C	C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)					
Amostra: Branco		1,0297	0,00305	0,47321	0,00130
Amostra: A		1,9130	0,08197	1,91050	0,06340
Resultado TOC (Amostra A – Branco)		0,8833	0,07892	1,43729	0,06210
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)					
Ponto da amostragem					
Base do sistema de alimentação das aranhas		NA	NA	22	0
Prato da máquina		2	7	4	14
Depósito de carregamento		10	0	2	0
Rampa de saída dos comprimidos		8	3	28	0
Duas matrizes		1	1	3	21
Disco intermédio		4	3	29	1
Disco inferior		19	11	22	4
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)					
Ponto da amostragem					
Base do sistema de alimentação das aranhas		NA (*)	NA (*)	ND	ND
Prato da máquina		ND	ND	2,88449	3,85849
Depósito de carregamento		ND	ND	ND	ND
Rampa de saída dos comprimidos		ND	ND	ND	ND
Duas matrizes		ND	ND	ND	ND
Disco intermédio		ND	ND	ND	ND
Disco inferior		ND	ND	ND	ND
(*) Estes lotes foram amostrados numa máquina de comprimir que não tinha esta base.					

Tabela 4-24 - Resultados obtidos para as Bacias de Revestimento.

Nº da Amostragem		1	2
Produto		Produto 1	Produto 1
Lote		C004	D001
Data	Produção	12/12/2014	23/02/2015
	Limpeza	15/12/2014	25/02/2015
	Inspeção Visual	17/12/2014	26/02/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	17/12/2014	26/02/2015
	Amostragem microbiológica	17/12/2014	26/02/2015
	Amostragem de resíduos de SA	17/12/2014	26/02/2015
Inspeção Visual			
Teste			
Se os componentes desmontados foram lavados e secos		C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos		C	C
Ausência de odores		C	C
A área de trabalho (sala) está limpa e arrumada		C	C
Ausência de escoriações mecânicas		C	C
Ausência de fibras, borracha ou tecidos		C	C
Ausência de dedadas ou restos de gordura		C	C
Ausência de humidade		C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)			
Amostra: Branco		0,2445	0,00305
Amostra: A		0,9383	0,40005
Resultado TOC (Amostra A – Branco)		0,6938	0,39700
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)			
Ponto da amostragem			
No interior da bacia de revestimento		0	5
Rebordo da abertura da bacia de revestimento		0	0
Determinação de Resíduos de Substância Ativa (µg/mL)			
Ponto da amostragem			
No interior da bacia de revestimento		ND	ND
Rebordo da abertura da bacia de revestimento		ND	ND

Tabela 4-25 - Resultados obtidos para a Máquina de Blisterar.

Nº da Amostragem		1	2	3
Produto		Produto 1	Produto 11	Produto 1
Lote		C004	C006	D001
Data	Produção	19/12/2014	10/02/2015	27/02/2015
	Limpeza	19/12/2014	10/02/2015	27/02/2015
	Inspeção Visual	05/01/2015	11/02/2015	09/03/2015
	Amostragem de resíduos de detergente	06/01/2015	11/02/2015	09/03/2015
	Amostragem microbiológica	05/01/2015	11/02/2015	09/03/2015

Tabela 4-25 - Resultados obtidos para a Máquina de Blisterar (continuação).

Nº da Amostragem	1	2	3
Produto	Produto 1	Produto 11	Produto 1
Lote	C004	C006	D001
Inspeção Visual			
Teste			
Se os componentes desmontados foram lavados e secos	C	C	C
Ausência de resíduos de pó em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de manchas em toda a área, nas soldaduras, nos rebordos e sulcos	C	C	C
Ausência de odores	C	C	C
A área de trabalho (sala) está 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 ou restos de gordura	C	C	C
Ausência de humidade	C	C	C
Determinação de Resíduos de Agentes de Limpeza (ppm)			
Amostra: Branco	0,40288	1,21629	0,0013
Amostra: A	3,6335	2,2685	0,20685
Resultado TOC (Amostra A – Branco)	3,23062	1,05221	0,20555
Determinação da Atividade Microbiana (nº de UFCs)			
Ponto da amostragem			
Distribuidor	32	5	15
1º Tabuleiro	88	4	5
2º Tabuleiro	>50	5	3
Roda/Cilindro	127 / 30	4 / 1	11 / 1
3º Tabuleiro	9	0	0

4.2.2. Interpretação dos Resultados

A interpretação dos resultados encontra-se dividida pelos diferentes testes efetuados a cada equipamento. Optou-se por discutir os resultados separadamente, de modo a que fosse mais fácil a interpretação dos testes por produto. Com base nas tabelas apresentadas no ponto anterior, construíram-se diversos gráficos nos quais é possível identificar os resultados obtidos em cada amostragem por equipamento, ponto de amostragem e produto.

A validade de limpeza determinada para cada equipamento é resultado de apenas duas amostragens para validação. No entanto, como já referido anteriormente, o processo de validação de limpeza e respetiva validade da mesma apenas podem ser identificados após a amostragem a três lotes.

Intervalo de Dias entre a Produção, Limpeza e Amostragens

Para o Produto 1:

Observando a Figura 4-27 verifica-se que maioritariamente a limpeza dos equipamentos foi efetuada no próprio dia em que terminou a produção ou nos dias seguintes ao término desta. Apenas no caso da Compactadora, Máquina de Comprimir e Despoeirador é que a limpeza foi efetuada uns dias após a produção, sendo de 8 e 6 dias para a Compactadora – lote C004 e D001, e de 6 dias para a Máquina de Comprimir e Despoeirador – lote C004. Com este intervalo pode-se identificar estas limpezas como as piores, visto que são o intervalo máximo entre a produção e respetiva limpeza destes dois equipamentos.

Relativamente às amostragens e inspeção visual, estas foram todas realizadas no mesmo dia à exceção das recolhas das amostras para determinação de resíduos de detergente na Máquina de Blisterar. A amostragem para determinação do TOC para o lote C004 teve de ser realizada no dia seguinte às outras amostragens pelo fato de naquele dia não ser possível a utilização da água visto que estava em fase de sanitização. As recolhas das diferentes amostras foram efetuadas após 2/3 dias da limpeza, sendo que para a Máquina de Blisterar o tempo de recolha foi de 17/18 dias para o lote C004.

Para o Produto 9:

Cada equipamento foi limpo no próprio dia ou no dia seguinte à finalização da produção com exceção da Máquina de Comprimir e Despoeirador – lote D003. Assim, para a Máquina de Comprimir e Despoeirador – lote D003, os 8 dias de intervalo entre a utilização e a limpeza são contabilizados como sendo a pior-caso de limpeza.

As amostragens foram efetuadas no dia seguinte à limpeza ou passados 2/3 dias, excetuando para a Compactadora e Máquina de Comprimir – ambos para o lote D003.

Os resultados podem ser visualizados na Figura 4-28.

Teste de Validação de Limpeza nº 1 – Inspeção Visual

No que diz respeito à inspeção visual efetuada a cada equipamento antes da realização dos testes de validação seguintes, os resultados obtidos foram excelentes na medida em que para todos os lotes, independentemente do produto, o resultado de cada teste de inspeção visual foi conforme. O ser conforme indica a ausência de manchas, odores, escoriações mecânicas, fibras, borracha, mas também indica que os componentes do equipamento e a área de trabalho se encontravam limpos.

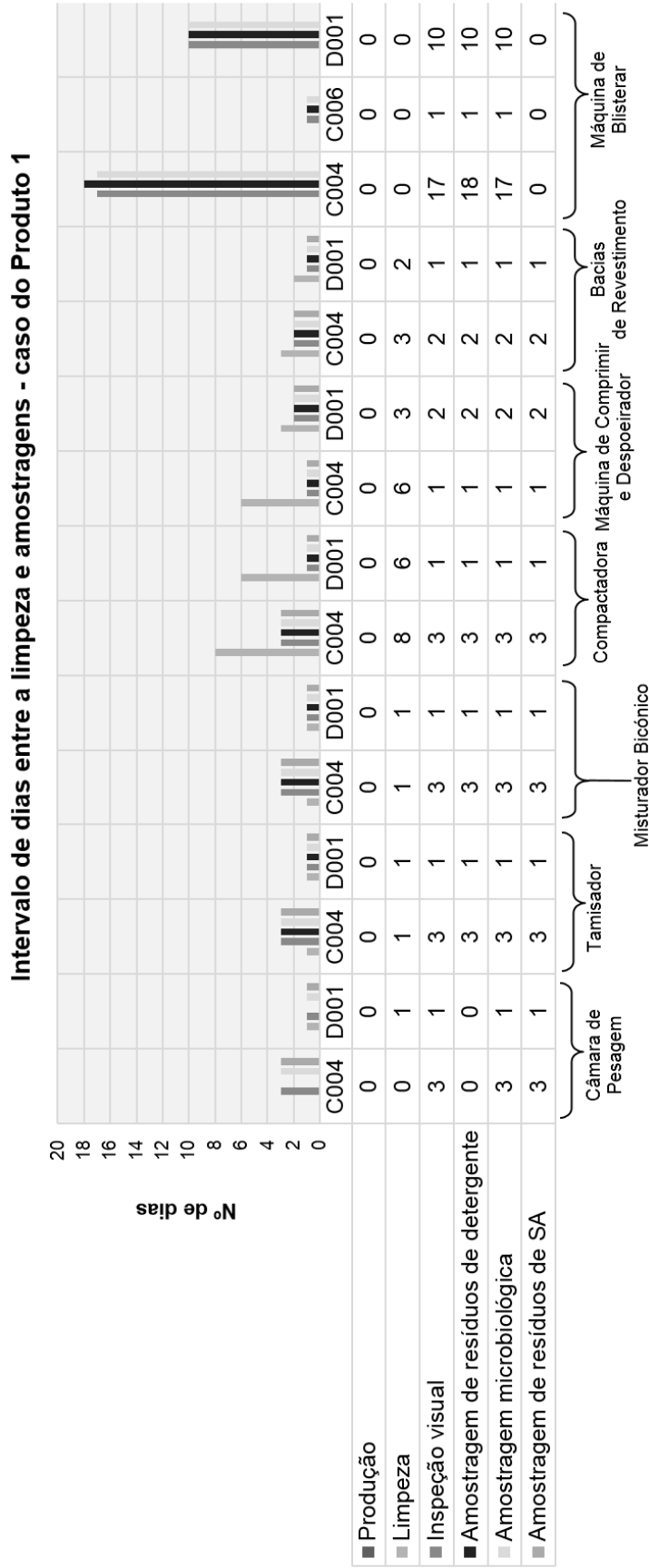


Figura 4-27 - Intervalo de dias entre a limpeza e amostragens - Produto 1.

Intervalo de dias entre a limpeza e amostragens - caso do Produto 9

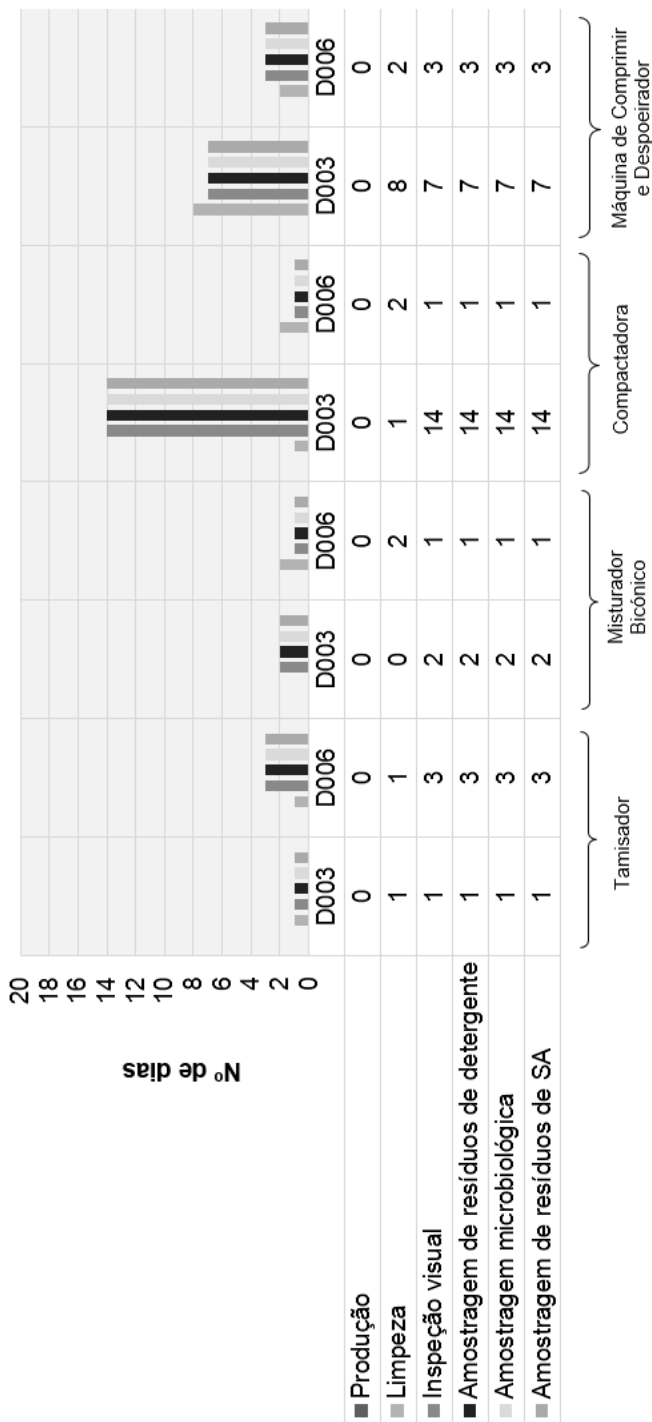


Figura 4-28 - Intervalo de dias entre a limpeza e amostragens - Produto 9.

Teste de Validação de Limpeza nº 2 – Determinação de Resíduos de Agente de Limpeza

Para o Produto 1:

A análise efetuada a cada amostra demonstrou que na maioria dos casos, a quantidade de carbono orgânico total presente nos equipamentos após a limpeza é baixa.

No caso do lote C004 do misturador bicônico, identificou-se uma quantidade elevada de TOC ultrapassando o limite de aceitação de 10 ppm. Os elevados resíduos presentes podem ser justificados com um mau enxaguamento, ou seja o tempo de rotação do misturador com água purificada ou mesmo a quantidade de água adicionada pode ter sido insuficiente. No entanto na análise ao lote seguinte, o valor obtido já foi mais baixo e aceitável.

Observando a Figura 4-29 verifica-se que para o lote C004 da máquina de blisterar o valor de TOC, apesar de estar bastante abaixo do limite, se destaca. A amostragem para este caso foi efetuada após a paragem da máquina durante 18 dias, pelo que durante este tempo existiu crescimento microbiano (como especificado na Tabela 4-25) e conseqüentemente produção carbono.

De um modo geral, avaliando todos os outros resultados é possível concluir que a presença de resíduos de limpeza é baixa, não comprometendo a produção do medicamento seguinte.

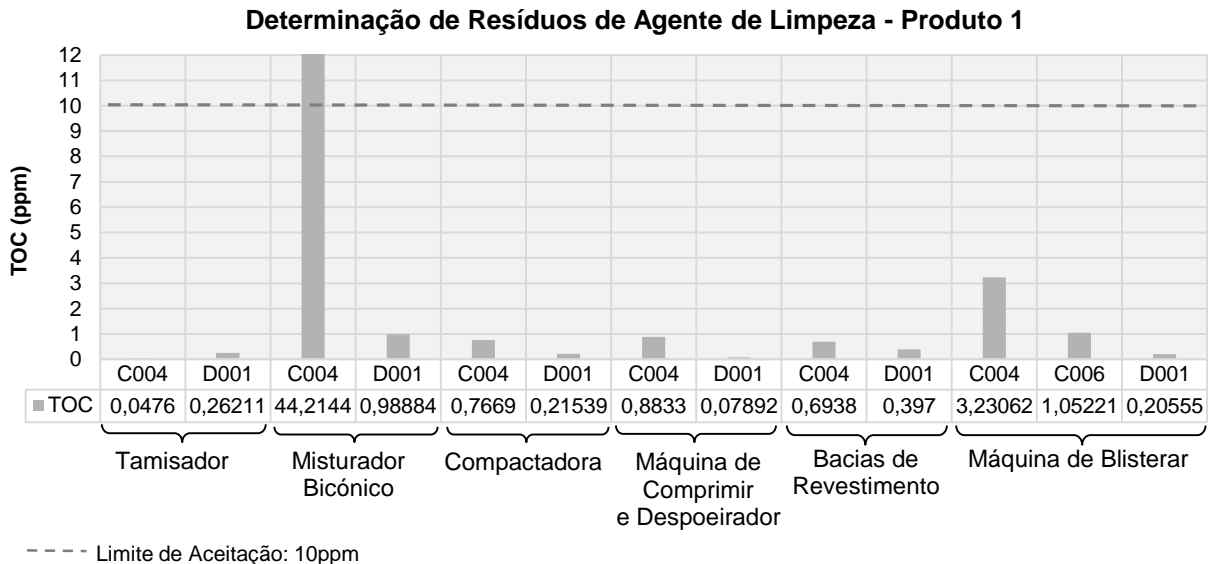


Figura 4-29 - Análise dos resultados da pesquisa de resíduos de agente de limpeza – Produto 1.

Para o Produto 9:

Observando a Figura 4-30, são notórios os baixos níveis de TOC obtidos em cada amostragem.

Verifica-se que nas quatro amostragens efetuadas após a produção do lote D003, os valores de TOC foram mais elevados do que se estaria à espera. No entanto, estas amostragens foram realizadas com um cheiro intenso a acetato de etilo, o que influenciou os resultados finais. Apesar desta influência, os resíduos de agente de limpeza encontrados ficaram longe do limite de aceitação de 10ppm, sendo que o valor mais elevado corresponde ao lote D003 do misturador bicónico e o valor mais baixo corresponde ao lote D006 da máquina de comprimir e despoeirador.

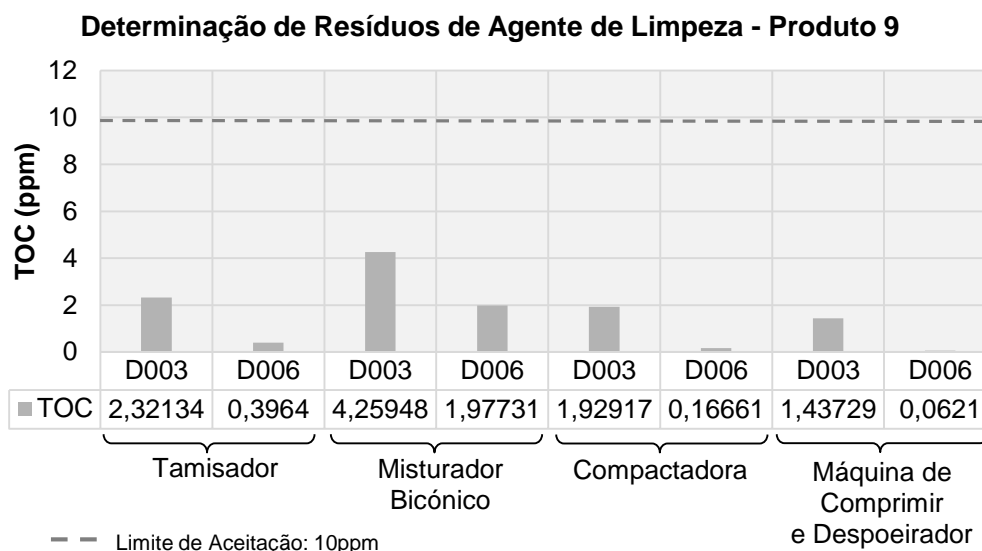


Figura 4-30 - Análise dos resultados da pesquisa de resíduos de agente de limpeza – Produto 9.

Teste de Validação de Limpeza nº 3 – Determinação de Atividade Microbiana

Primeiramente é importante referir que neste setor os dias de paragem dos equipamentos entre produções são poucos, pelo que nem sempre se conseguiu fazer a amostragem microbiológica após vários dias da realização da limpeza do equipamento.

Para o Produto 1:

Na determinação da atividade microbiana, verificou-se que para a amostragem após a produção do lote C004 da compactadora e também da máquina de blisterar as colónias encontradas em algumas placas excedem o valor de aceitação de 50 UFC's.

No caso da compactadora, identificaram-se 66 colónias no ponto crítico de amostragem 1. Este ponto corresponde aos rolos de compactação e como a zona onde se efetua a amostragem é uma zona rugosa pode levar à proliferação microbiana.

Relativamente à máquina de blisterar, os valores obtidos em 3 dos 5 pontos críticos excederam o limite de 50 UFC's. Esta amostragem foi realizada após 17 dias de paragem da máquina o que leva a concluir que neste intervalo de tempo o ambiente da sala proporcionou o crescimento microbiano. Deste modo, a validade de limpeza deste equipamento terá de ser inferior a 17 dias.

Para os restantes equipamentos, os resultados obtidos por placa por ponto crítico foram conformes, permanecendo o número de colónias abaixo do limite de aceitação (*vide* Figura 4-31).

Assim, avaliando todos os resultados microbiológicos e também o intervalo de dias entre a limpeza e amostragens é possível concluir que a validade de limpeza para a câmara de pesagem, tamisador e misturador biconico é de 3 dias, para a máquina de comprimir e despoeirador e bacias de revestimento é de 2 dias, para a máquina de blisterar é de 10 dias. Para a compactadora não foi possível concluir sobre a validade da sua limpeza.

Análise de Atividade Microbiológica – Produto 1

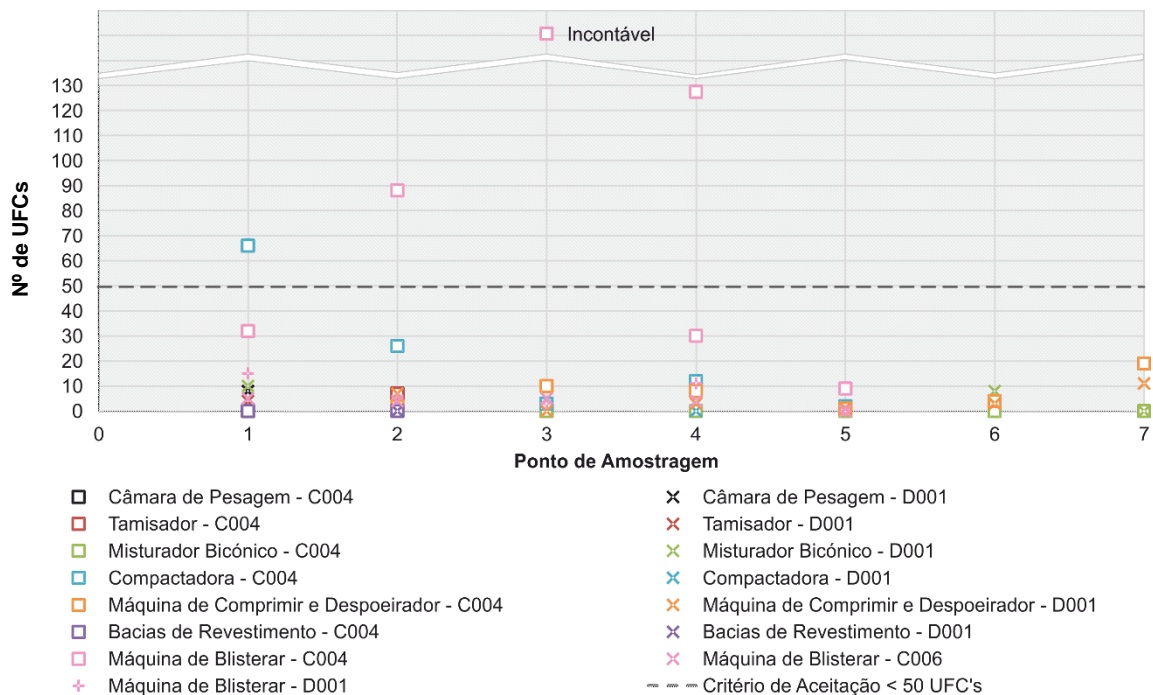


Figura 4-31 - Análise dos resultados da atividade microbiana - caso do produto 1.

Análise de Atividade Microbiológica - Produto 9

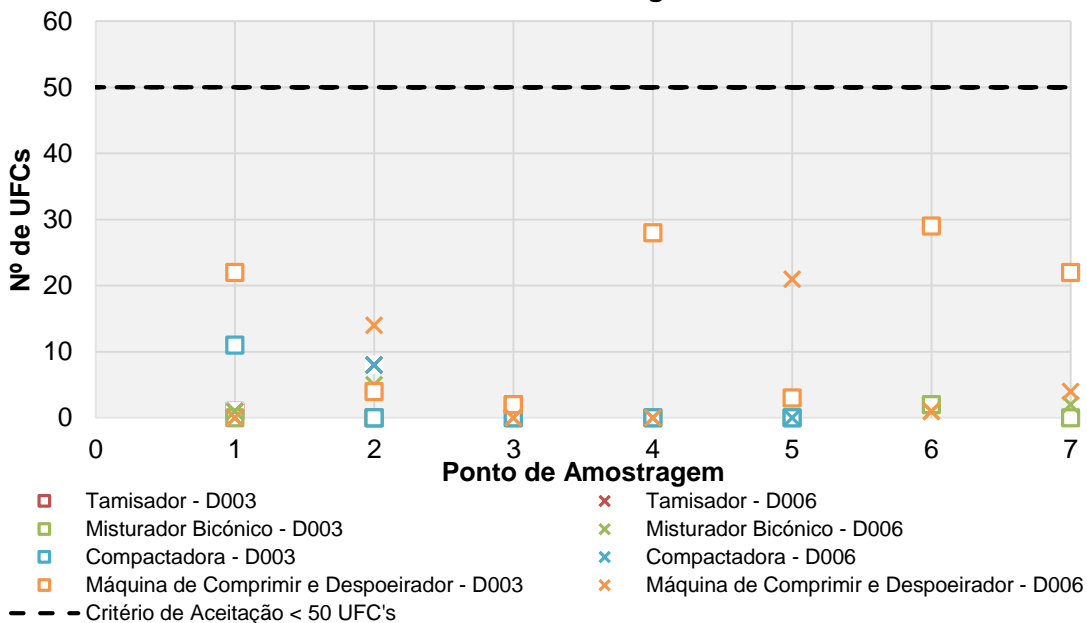


Figura 4-32 - Análise dos resultados da atividade microbiana - caso do produto 9.

Para o produto 9:

Relativamente às amostragens efetuadas para este produto verificou-se que os resultados foram conformes visto que nenhum caso excedeu o limite de 50 UFC's por placa.

Deste modo, pode-se concluir sobre a validade de limpeza dos equipamentos amostrados: para o tamisador será de 3 dias, para o misturador bicônico será 2 dias, para a compactadora serão 14 dias e para a máquina de comprimir e despoeirador serão 7 dias.

Teste de Validação de Limpeza nº 4 – Determinação de Resíduos de Substância Ativa

Para o Produto 1:

Na determinação de resíduos de substância ativa após a produção do produto 1, foi encontrada a SA em apenas dois pontos críticos. Na câmara de pesagem foi detetada uma pequena concentração de substância ativa no prato da balança de chão na amostragem após a produção do lote C004. O aparecimento desta deve-se ao fato de após a limpeza da câmara de pesagem, os operadores terem utilizado a balança para a pesagem de barricas, barricas essas que podiam ter no fundo ou nas laterais resíduos da substância ativa em pesquisa. No ponto de amostragem 1 da compactadora foi identificada uma quantidade de SA que ficou muito perto do limite analítico de 15 µg/mL. No entanto este ponto corresponde ao rolo da compactadora que tem uma superfície rugosa e por esse motivo torna a sua limpeza um pouco mais difícil.

No geral, verifica-se a não existência de substância ativa na maior parte dos pontos críticos amostrados, o que é bastante satisfatório visto que esta SA é de difícil limpeza mesmo em superfícies mais planas. Todos os resultados obtidos através da análise em HPLC encontram-se na Figura 4-33.

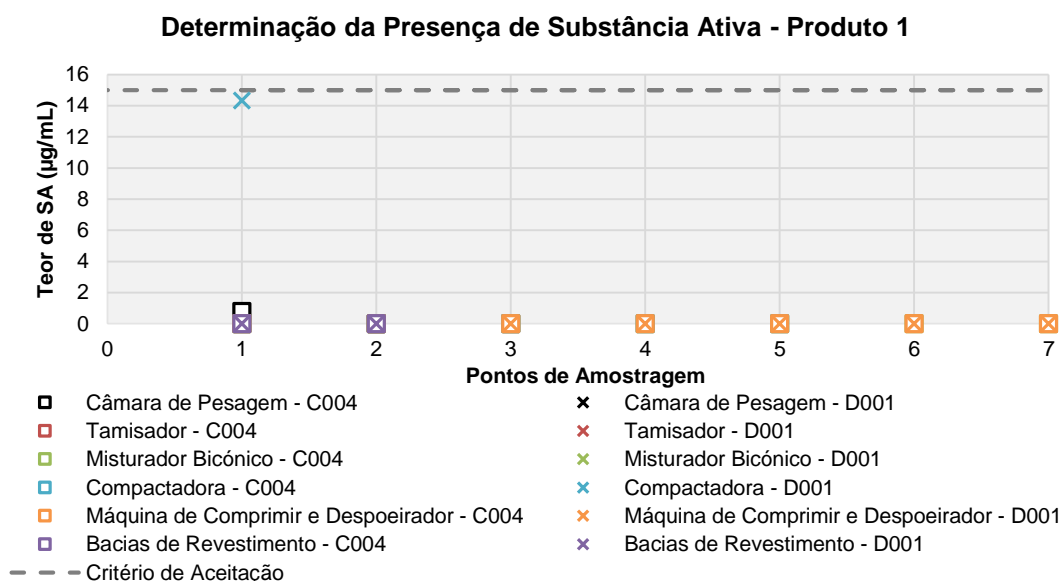


Figura 4-33 - Análise dos resultados da pesquisa de substância ativa – caso do Produto 1

5.

Conclusões

Face aos resultados obtidos nas duas validações do método analítico, é possível concluir que o método de determinação de resíduos de substância ativa por HPLC é adequado e fiável em ambos os casos testados. No entanto tal só pode ser garantido quando: os equipamentos possuem superfície de aço inoxidável, o produto 1 ou o produto 9 sejam o pior-caso e os LA estejam incluídos na gama de trabalho das validações (6,203 a 24,810 µg/ml para a SA1 e 9,511 a 38,045 µg/ml para a SA3). Validado o método analítico, passou-se às amostragens para avaliar a limpeza dos equipamentos.

Para realizar com sucesso a validação de limpeza, deveriam ter sido efetuadas três amostragens para cada teste de validação. Devido aos planos de produção não foi possível realizar as terceiras amostragens para a validação durante o decorrer desta dissertação.

Foram então efetuadas duas amostragens por produto para cada teste: inspeção visual, determinação de resíduos de agente de limpeza, determinação de atividade microbiana e determinação de resíduos de substância ativa. Estes testes foram aplicados a todos os equipamentos em validação, câmara de pesagem, tamisador, misturador bicónico, compactadora, máquina de comprimir e despoeirador, bacias de revestimento e máquina de blisterar.

Tendo em conta os resultados obtidos, pode-se concluir que os equipamentos estão a ser bem limpos, verificando-se deste modo que as instruções técnicas de limpeza são adequadas e que estão a ser bem aplicadas pelos operadores. Após toda a análise efetuada anteriormente, verifica-se que a maior parte dos resultados estão conformes, situando-se abaixo dos limites de aceitação impostos.

Relativamente aos desvios encontrados, para a análise ao TOC para o misturador bicónico não foi possível identificar qual a causa mais provável do elevado valor encontrado na amostragem ao lote C004 do produto 1, talvez se devesse a um mau enxaguamento. Comparativamente, para o desvio encontrado na análise microbiológica, o número elevado de colónias na amostragem ao lote C004 da compactadora e máquina de blisterar para o Produto 1 pode ser justificado com o intervalo de dias entre a limpeza e a amostragem. Para o caso da pesquisa de resíduos de substância ativa, foi encontrado um valor elevado para a amostragem do lote D001 da compactadora para o Produto 1. Apesar de o valor se encontrar bastante próximo do limite analítico, mas abaixo deste, irá ser efetuada uma ação corretiva interna e será transmitido aos operadores o resultado obtido neste teste. Como forma de aperfeiçoar a limpeza deste equipamento, a instrução de limpeza da compactadora irá ser revista e a limpeza da mesma será acompanhada por um elemento da Garantia da Qualidade para verificar *in loco* os passos efetuados.

As amostragens efetuadas possibilitaram ao setor da Garantia da Qualidade verificar que o modo de limpeza dos seus equipamentos é adequado, o que previne as contaminações cruzadas que possam existir e conseqüentemente permita que a qualidade exigida pelas entidades reguladoras continue.

Trabalho Futuro

Após a realização desta dissertação, ficam alguns pontos por concluir, pelo que poderão ser realizados no futuro:

- Para que a validação de limpeza a este setor fique terminada é necessário realizar pelo menos mais uma amostragem após a limpeza dos equipamentos para cada um dos produtos estudados. Com essa última amostragem já será possível concluir com certeza sobre a validade da limpeza em cada equipamento para cada produto;

- Como forma de revalidar o trabalho desenvolvido, pode-se posteriormente realizar uma revalidação de limpeza para avaliar se todos os parâmetros testados anteriormente continuam conformes;

- No caso em que o setor venha a sofrer alterações, como por exemplo aquisição de novos equipamentos, poderá e deverá ser efetuada uma nova validação de limpeza para apurar a conformidade da mesma;

- Também se poderá avaliar ou reavaliar a limpeza dos equipamentos de outros setores de produção do Atral, através da realização dos mesmos testes efetuados no setor do FSO3.

Referências Bibliográficas

- [1] AtralCipan, “História do grupo AtralCipan,” *AtralCipan*, 2014. [Online]. Available: <http://www.atral.pt/index.asp?mn=historia>. [Accessed: 26-Oct-2014].
- [2] Infarmed, “Autorização de Introdução no Mercado (AIM),” 2014. [Online]. Available: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AUTORIZACAO_DE_INTRODUCAO_NO_MERCADO. [Accessed: 28-Oct-2014].
- [3] C. European, “Guidelines for GMP for Medicinal Products for Human and Veterinary Use,” vol. 4, no. 1. pp. 1–8, 2012.
- [4] C. Europeia, “Normas orientadoras sobre BPF, Anexo 20 - Gestão dos Riscos de Qualidade,” *Eudralex*, pp. 1–26, 2008.
- [5] Infarmed, “Amostras de referência e de retenção - Vol.4 Anexo 19.” pp. 1–5, 2006.
- [6] EMA, “European Medicines Agency - What we do,” 2014. [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000091.jsp&mid=WC0b01ac0580028a42. [Accessed: 28-Oct-2014].
- [7] FDA, “FDA Basic for industry - About us,” 2014. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/ForIndustry/FDABasicsforIndustry/ucm234629.htm>. [Accessed: 28-Oct-2014].
- [8] FDA, “cGMP for finished pharmaceuticals - Equipment 211.67,” *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*, 2014. [Online]. Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.67>. [Accessed: 06-Nov-2014].
- [9] P. D. Bharadia and J. A. Bhatt, “A review of a current implementation strategies for validation of cleaning processes in the pharmaceutical industry,” *J. Valid. Technol.*, vol. 12, no. 3, pp. 218–231, 2006.
- [10] FDA, “Quality System Regulation - Production and Process Controls,” *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*, 2014. [Online]. Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=820.70>. [Accessed: 06-Nov-2014].
- [11] E. Beyssac and C. J-M, “Standardized Cleaning Approach For A New Pharmaceutical Compound,” pp. 1–12, 2008.

- [12] PDA, "Point to Consider for Cleaning Validation," no. 29. PDA - International association for pharmaceutical science and technology, pp. 1–51, 1998.
- [13] W. E. Hall, "Validation and Verification of Cleaning Processes," in *Pharmaceutical process validation*, 3ª ed., R. A. Nash and A. H. Wachter, Eds. Suiça e Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc, 2003, p. 883.
- [14] B. M. Nassani and D. Ph, "Cleaning Validation in the Pharmaceutical Industry," *Inst. Valid. Technol.*, pp. 38–58, 2004.
- [15] P. Yang, K. Burson, L. Leung, D. Feder, and F. Macdonald, "Cleaning Validation Assay - Qualification of Cleaning Procedures for a Small-molecule Residual Active Pharmaceutical Ingredient (API)," *J. Valid. Technol.*, vol. 10, no. 4, pp. 280–299, 2004.
- [16] S. W. Harder, "The validation of cleaning procedures," *Pharm. Technol.*, pp. 29–34, 1984.
- [17] M. Montalvo and J. Fuge, "Effective master planning for cleaning validation including protocol development," *J. Valid. Technol.*, vol. 13, no. 3, pp. 264–271, 2007.
- [18] G. A. Shabir, "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration , the US Pharmacopeia and the International Conf," *J. Chromatogr. A*, vol. 987, pp. 57–66, 2003.
- [19] H. J. Kaiser and B. Ritts, "Validation of analytical methods used in cleaning validation," *J. Valid. Technol.*, vol. 10, no. 3, pp. 219–234, 2004.
- [20] APIC, "Cleaning Validation in Active pharmaceutical Ingredient manufacturing plants," no. September. p. 26, 1999.
- [21] B. Lodhi, P. Padamwar, and A. Patel, "Cleaning validation for the pharmaceuticals , biopharmaceuticals , cosmetic and nutraceuticals industries," *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 27–38, 2014.
- [22] D. A. LeBlanc, "Establishing Scientifically Justified Acceptance Criteria for Cleaning Validation of Finished Drug Products," *Pharm. Technol. Eur.*, pp. 18–23, 1999.
- [23] D. W. Layton, B. J. Mallon, D. H. Rosenblatt, and M. J. Small, "Deriving allowable daily intakes for systemic toxicants lacking chronic toxicity data," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 7, no. 1, pp. 96–112, Mar. 1987.
- [24] ICH, "ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures - Q2(R1)," vol. 1994, no. November 1996, pp. 1–17, 2005.
- [25] "{ 1225 } Validation Of Compendial Procedures," *United States Pharmacopeia*. pp. 1–5.
- [26] FDA, "cGMP for Finished Pharmaceuticals - Laboratory Controls 211.165 (e)," *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*, 2014. [Online]. Available: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=211.165>. [Accessed: 11-Nov-2014].
- [27] L. Huber, "Validation of Analytical Methods," vol. 2. Agilent Technologies, pp. 1–76, 2010.

- [28] M. Queralt, E. Garcia-Montoya, P. Pérez-Lozano, J. M. Suné-Negre, M. Minarro, and J. R. Ticó, "TOC and HPLC for cleaning validation in a pharmaceutical pilot plant," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 63, no. 1, pp. 42–57, 2009.
- [29] USP, "643 - TOTAL ORGANIC CARBON." The United States Pharmacopeial Convention, pp. 310–311, 2014.
- [30] G. L. Fourman and M. V. Mullen, "Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations.pdf," *Pharm. Technol. Int.*, pp. 46–49, 1993.
- [31] C. European, "EudraLex - Guidelines to GMP Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1 - Manufacture of Sterile Medicinal Products," vol. 2008, no. November. pp. 1–16, 2008.



A.

Anexos

A.1. Protocolos e Relatórios Desenvolvidos

Neste anexo, apresentam-se todos os protocolos e respetivos relatórios elaborados para as validações de método analítico tanto para o Produto 1 como para o Produto 9 (para cada um dos produtos foi elaborado um protocolo e um relatório da validação do método analítico). Também se apresenta de seguida todos os protocolo/relatório de validação de limpeza gerados para cada produto estudado (para o Produto 1 foram elaborados 7 protocolo/relatório, enquanto que para o Produto 9 foram elaborados 4).

Por motivos de confidencialidade, estes protocolos e protocolos/relatórios não ficarão disponíveis.

A.2. Resultados da cromatografia em HPLC

Da tabela A.2-1 até à tabela A.2-4 apresentam-se os resultados obtidos por equipamento e por produto das análises efetuadas no HPLC para determinação de resíduos de substância ativa. Apresenta-se as áreas dos cromatogramas, bem como os dados utilizados para efetuar o cálculo do teor de substância ativa.

Tabela A.2-1 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 1 lote C004.

Equipamento	Produto - Lote	Análise	Leitura	Áreas do pico	Médias das áreas	Toma	Atividade	Volume total de diluição
Câmara de Pesagem	Produto 1 - C004	Padrão	1	197,23205	198,53326	15	0,83	1000
			2	199,83447				
		Amostra 1	1	12,74725	12,59544			
			2	12,44362				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Tamisador	Produto 1 - C004	Padrão	1	197,23205	198,53326	15	0,83	1000
			2	199,83447				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Misturador Bicónico	Produto 1 - C004	Padrão	1	197,23205	198,53326	15	0,83	1000
			2	199,83447				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 6	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Amostra 7	1	0,00000	0,00000					
	2	0,00000						
Compactadora	Produto 1 - C004	Padrão	1	184,39197	185,69857	15	0,83	1000
			2	187,00516				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				

**Tabela A.2-2 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor -
Produto 1 lote C004 (continuação).**

Máquina de Comprimir e Despoeirador	Produto 1 - C004	Padrão	1	184,54113	184,43576	15	0,83	1000
			2	184,33039				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 6	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 7	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Bacias de Revestimento	Produto 1 - C004	Padrão	1	184,54113	184,43576	15	0,83	1000
			2	184,33039				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				

**Tabela A.2-3 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor -
Produto 1 lote D001.**

Equipamento	Produto - Lote	Análise	Leitura	Áreas do pico	Médias das áreas	Toma	Atividade	Volume total de diluição
Câmara de Pesagem	Produto 1 - D001	Padrão	1	171,69294	171,85099	14,97	0,83	1000
			2	172,00903				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Tamisador	Produto 1 - D001	Padrão	1	174,54531	173,17988	14,97	0,83	1000
			2	171,81444				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Misturador Bicónico	Produto 1 - D001	Padrão	1	171,25105	172,23960	14,97	0,83	1000
			2	173,22815				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				

**Tabela A.2-4 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor -
Produto 1 lote D001 (continuação).**

		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 6	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 7	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Compactadora	Produto 1 - D001	Padrão	1	170,56393	172,64480	14,97	0,83	1000
			2	174,72567				
		Amostra 1	1	199,95361	199,18325			
			2	198,41289				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Máquina de Comprimir e Despoeirador	Produto 1 - D001	Padrão	1	174,59072	173,26842	14,97	0,83	1000
			2	171,94612				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 6	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
Amostra 7	1	0,00000	0,00000					
	2	0,00000						
Bacias de Revestimento	Produto 1 - D001	Padrão	1	178,14983	174,77916	14,97	0,83	1000
			2	171,40849				
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000			
			2	0,00000				

**Tabela A.2-5 - Resultados da cromatografia e respectivos dados para o cálculo de teor -
Produto 9 lote D001.**

Equipamento	Produto - Lote	Análise	Leitura	Áreas do pico	Médias das áreas	Toma	Atividade	Volume total de diluição					
Tamisador	Produto 9 - D001	Padrão	1	283,34274	283,66965	20,28	0,938	1000					
			2	283,99655									
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Misturador Bicônico	Produto 9 - D001	Padrão	1				283,37436	283,33646	20,28	0,938	1000
					2				283,29855				
Amostra 1	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 2	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 3	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 4	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 5	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 6	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Amostra 7	1			0,00000	0,00000								
	2			0,00000									
Compactadora	Produto 9 - D001			Padrão	1	292,30353	291,39014	20,28	0,938	1000			
					2	290,47675							
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 2	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 3	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 4	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 5	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
Máquina de Comprimir e Despoeirador	Produto 9 - D001	Padrão	1	289,56015	289,56015	20,28	0,938	1000					
			2	289,56015									
		Amostra 1	1	0,00000	0,00000								
			2	0,00000									
		Amostra 2	1	43,93561	43,82091								
			2	43,70621									

Anexos

Amostra 3	1	0,00000	0,00000
	2	0,00000	
Amostra 4	1	0,00000	0,00000
	2	0,00000	
Amostra 5	1	0,00000	0,00000
	2	0,00000	
Amostra 6	1	0,00000	0,00000
	2	0,00000	
Amostra 7	1	0,00000	0,00000
	2	0,00000	

Tabela A.2-6 - Resultados da cromatografia e respetivos dados para o cálculo de teor - Produto 9 lote D006.

Equipamento	Produto - Lote	Análise	Leitura	Áreas do pico	Médias das áreas	Toma	Atividade	Volume total de diluição
Tamisador	Produto 9 - D006	Padrão	1	273878,0	275970,5	20,47	0,938	1000
			2	278063,0				
		Amostra 1	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 2	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
Amostra 3	1	0,0	0,0					
	2	0,0						
Misturador Bicónico	Produto 9 - D006	Padrão	1	273454,0	273037,0	20,47	0,938	1000
			2	272620,0				
		Amostra 1	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 2	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 3	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 4	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 5	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 6	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
Amostra 7	1	0,0	0,0					
	2	0,0						
Compactadora	Produto 9 - D006	Padrão	1	283072,0	274568,5	20,47	0,938	1000
			2	266065,0				
		Amostra 1	1	0,0	0,0			
			2	0,0				
		Amostra 2	1	0,0	0,0			

Tabela A.2-7 - Resultados da cromatografia e respectivos dados para o cálculo de teor - Produto 9 lote D006 (continuação).

			2	0,0					
		Amostra 3	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 4	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 5	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
Máquina de Comprimir e Despoeirador	Produto 9 - D006	Padrão	1	267332,0	266961,5				
			2	266591,0					
		Amostra 1	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 2	1	52169,0	53721,5				
			2	55274,0					
		Amostra 3	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 4	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 5	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 6	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
		Amostra 7	1	0,0	0,0				
			2	0,0					
							20,47	0,938	1000