



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA

JESSICA ISABEL CABRITA REIS CUNHA

Licenciado em Química

Validação de Limpeza na Indústria Farmacêutica

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa

Setembro, 2022



Validação de Limpeza na Indústria Farmacêutica

JESSICA ISABEL CABRITA REIS CUNHA

Licenciado em Química Aplicada

Orientadora: Carla Loureiro,
Técnico Superior de Laboratório, Labiagro

Coorientadores: Ana Lourenço,
Professor Auxiliar, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Luísa Ferreira,
Professora Auxiliar com Agregação, FCT-NOVA

Arguentes: Luz Fernandes,
Técnica Superior, REQUIMTE

Orientador: Carla Loureiro,
Técnico Superior de Laboratório, Labiagro
Ana Lourenço
Professora Auxiliar, FCT-NOVA

Validação de Limpeza na Indústria Farmacêutica

Copyright © Jessica Isabel Cabrita Reis Cunha, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

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

AGRADECIMENTOS

Num tempo de pandemia os planos mudaram. Este estágio curricular não teria sido como foi senão fossem as circunstâncias vividas. Foi uma aprendizagem para a minha vida em que foi possível conjugar a parte académica com a parte profissional e evoluir em ambos os sentidos. Deste modo, tenho a agradecer a diversas pessoas, não só àquelas que deram a sua contribuição para que este trabalho final de mestrado fosse realizado, como também a todos os que me apoiaram ao longo da minha vida, para que chegasse até este nível académico:

À coordenadora de curso e professora Paula Branco, que me orientou nos primeiros passos para fazer este estágio numa empresa. E foi a professora que colocou em mim o gosto da química orgânica e a perceber de uma maneira simples os processos.

À professora Ana Lourenço que aceitou ser minha orientadora e auxiliou-me em todo o processo de escrita da tese e de entrega de documentos necessários.

Ao Engenheiro Ivo, chefe do Controlo da Qualidade da IBERFAR, pela disponibilidade e oportunidade para fazer este estágio. E por durante todo o estágio me ter acompanhado, por todos os ensinamentos e pelo tempo que disponibilizado mesmo estando com muito trabalho em mãos.

À minha orientadora Carla Loureiro, um grande obrigado pela confiança depositada em mim! Pelas várias revisões da tese e por mesmo mudando de emprego continuar sempre disponível para me ajudar e esclarecer dúvidas. Obrigada por toda a disponibilidade.

À minha colega de trabalho Neuza Saraiva, muito obrigada que mesmo no meio de outros trabalhos esclarecia-me dúvidas da parte prática do trabalho e que me acolheu e explicou o trabalho que já tinha desenvolvido até ao momento.

À minha colega de trabalho Margarida obrigada pelo companheirismo, pela amizade, por me apoiar, guiar-me e ouvir-me. Um grande obrigada por toda ajuda, foi um grande suporte para mim.

À minha colega de trabalho Catarina Portelada, que se disponibilizou em auxiliar-me em todas as questões técnicas de equipamentos. Obrigada por toda a ajuda não só em questões técnicas, como também por seres divertida.

À minha chefe Catarina, um obrigado por toda ajuda na escrita do protocolo e relatório relativamente à validação e por me ajudares a conciliar o trabalho com a parte prática da tese.

A todos os meus amigos, mas em especial, a dois amigos que começaram por ser apenas colegas de faculdade: Ana Carolina Costa por me ter ajudado nos trabalhos e a dar-me a conhecer novas músicas e ao Pedro Vieira por me ajudar a não stressar e a ser menos ansiosa. A vocês os dois um obrigado enorme foi um gosto fazer este percurso acompanhada com vocês.

À minha família. Nomeadamente aos meus pais que estiveram sempre presentes neste percurso e que fizeram que fosse possível chegar até aqui e ao meu marido por ajudar a conciliar a minha vida pessoal com a minha vida profissional e vida académica. Obrigada pelo vosso apoio incondicional e por me erguerem nas situações mais difíceis.

"Curiosity is more important than knowledge." (Albert Einstein).

RESUMO

A indústria farmacêutica é uma indústria de grande dimensão e que exige um elevado grau de qualidade. Na IBERFAR, essa exigência é um requisito obrigatório a todos os níveis. Esta dissertação de mestrado incide na avaliação da limpeza dos equipamentos da produção, um controlo imprescindível, para impedir contaminações cruzadas. O laboratório de controlo da qualidade da IBERFAR tem 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 a qualidade dos produtos.

A presente dissertação visa a validação de um método analítico aplicado à validação de limpeza de quatro APIs, através de cromatografia líquida (HPLC). Houve uma importância adicional de elaborar um método analítico para os quatro APIs diferentes de forma a pensar numa futura capacidade de produção mais alargada.

Com base nas áreas dos equipamentos e posologia dos produtos, calculou-se o limite analítico para cada produto "pior-caso".

No que diz respeito à validação do método, foram avaliados os parâmetros: especificidade, exatidão, linearidade, repetibilidade, precisão do sistema, precisão intermédia, teste limite e estabilidade.

Os resultados das validações demonstraram que a gama de trabalho entre 0.25ppm e 125ppm é adequada e que em análises de rotina não é necessário injetar o system suitability apenas é necessário conferir que o sistema está a dar resposta no limite de LOQ (0.25ppm).

Palavas chave: validação de método analítico, validação de limpeza, produto pior-caso, HPLC, substância ativa

ABSTRACT

The pharmaceutical industry is a large-scale industry that requires a high degree of quality. At IBERFAR, this requirement is a mandatory requirement at all levels. My master's thesis focused on evaluating the cleanliness of production equipment, an essential control to prevent cross-contamination. Over the years, IBERFAR's laboratory quality control has carried out cleaning validations with the aim of showing and verifying that the cleaning carried out on the equipment and respective rooms are effective, not compromising the quality of the products.

The present dissertation aims at the validation of an analytical method applied to the cleaning validation of four APIs, through liquid chromatography (HPLC). There was an additional importance of elaborating an analytical method for the four different APIs to think about a wider future production capacity.

Based on the areas of equipment and product dosage, the analytical limit was calculated for each "worst case" product.

Regarding the validation of the method, the following parameters were evaluated: specificity, accuracy, linearity, repeatability, system precision, intermediate precision, limit test and stability.

The validation results showed that the working range between 0.25ppm and 125ppm is adequate and that in routine analysis it is not necessary to inject system suitability, it is only necessary to check that the system is responding within the LOQ limit (0.25ppm).

Keywords: Analytical method validation, cleaning validation, worst-case product, HPLC, Active substance

ÍNDICE

1	A QUALIDADE.....	1
1.1	IBERFAR.....	1
1.2	A Qualidade na Indústria Farmacêutica.....	2
1.2.1	Requisitos Legais da Qualidade.....	3
1.2.2	Boas Práticas de Fabrico.....	3
1.2.3	Gestão de Risco da qualidade.....	4
1.2.4	Garantia da Qualidade e Controlo da Qualidade	5
2	LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS DE PRODUÇÃO FARMACÊUTICA.....	7
2.1	Contaminação de equipamentos.....	7
2.2	Validação de Limpeza dos equipamentos.....	8
2.3	Plano Mestre de Validação de Limpeza.....	9
2.4	Escolha do Método Analítico.....	10
2.5	Métodos de Amostragem	10
2.6	Escolha do “Pior Caso” na validação de limpeza.....	11
2.7	Parâmetros da validação do Método Analítico.....	16
2.8	Limpeza de Equipamentos.....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Equipamentos da produção.....	23
3.2	Determinação do Valor Máximo Admissível de API	25
3.2.1	Determinação do VMA para API 1.....	25

3.2.2	Determinação do VMA para API 2.....	27
3.2.3	Determinação do VMA para API 3.....	29
3.2.4	Determinação do VMA para API 4.....	30
3.3	Materiais utilizados.....	35
3.4	Preparação das Soluções e Fase Móvel.....	36
3.5	Validação do Método Analítico	39
3.6	Validação do Método Analítico com taxas de recuperação	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	Validação do método Analítico.....	45
4.1.1	Cálculos para os ensaios	45
4.1.2	Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico.....	47
4.1.3	Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico com taxas de recuperação	71
4.2	Correção dos VMAs.....	77
5	CONCLUSÃO	79
6	TRABALHOS FUTUROS.....	81
7	BIBLIOGRAFIA.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Organograma da empresa IBERFAR. [6].....	2
Figura 3.1- Equipamento HPLC.....	36
Figura 3.2- Movimento a efetuar com o <i>Swab</i> , aquando da amostragem na placa.....	41
Figura 4.1- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 1 (linha a preto) aos 266nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2.....	48
Figura 4.2- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 2 (linha a preto) aos 222nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2.....	48
Figura 4.3- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 3 (linha a preto) aos 216nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2.....	49
Figura 4.4- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 4 (linha a preto) aos 236nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2.....	49
Figura 4.5- Regressão linear do API 1 da concentração vs área. R=1.000.....	56
Figura 4.6- Regressão linear do API 2 da concentração vs área. R=1.000.....	57
Figura 4.7- Regressão linear do API 3 da concentração vs área. R=1.000.....	57
Figura 4.8- Regressão linear do API 4 da concentração vs área. R=1.000.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Descrição dos diferentes tipos de contaminações[29].....	8
Tabela 2.2- Métodos analíticos específicos e não-específicos. [33],[34]	10
Tabela 3.1- Equipamentos onde cada API em estudo é o “pior caso” e os materiais que o compõem.....	24
Tabela 3.2- Valores de todos os produtos que passam na Integra com alimentador de rampas e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.....	26
Tabela 3.3 - Valores do API 2 e valor de VMA obtido.....	27
Tabela 3.4- Valores do outro produto que passa no BIN 150L e valor de VMA obtido.	27
Tabela 3.5- Tamanho de lote e quantidade de lotes produzidos ao ano que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal)	28
Tabela 3.6- Valores de todos os APIs que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal) e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o API que para os cálculos é o produto B.....	29
Tabela 3.7- Valores de todos os produtos que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal) e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.....	30
Tabela 3.8- Valores de todos os produtos que passam no Sistema de filtração-trasfega - Bomba+Housing e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.....	31
Tabela 3.9 - Valores de todos os produtos que passam na Xaropeira e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.	32
Tabela 3.10- Valores de todos os produtos que passam na Agitador e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.	33

Tabela 3.11- Valores de todos os produtos que passam na máquina enchimento líquidos King e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.....	34
Tabela 3.12- Tabela resumo com os VMA considerados para cada API em estudo.....	35
Tabela 3.13- Condições cromatográficas	37
Tabela 3.14- Tabela de gradiente.....	37
Tabela 3.15- Preparação dos padrões para as concentrações necessárias para os parâmetros de validação.....	39
Tabela 4.1- Resumo dos resultados de cada API. Tr= tempo de retenção	50
Tabela 4.2- Resultados das áreas de cada API com o resultado do RSD das injeções, resultado das taxas de recuperação e resultado do sinal-ruído. Tr= taxas de recuperação	51
Tabela 4.3- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 1	52
Tabela 4.4- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 2	53
Tabela 4.5- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 3	54
Tabela 4.6- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 4	55
Tabela 4.7- Resultados do ensaio da precisão do sistema com a solução de 10ppm.....	58
Tabela 4.8- Resultados obtidos pela segunda analista para o ensaio da precisão intermédia e resultado da diferença entre analistas.....	59
Tabela 4.9- Resultados obtidos pela segunda analista para o ensaio da precisão intermédia e resultado da diferença entre analistas (continuação).....	60
Tabela 4.10- Resultados para o teste limite.	62
Tabela 4.11- Resultados para o teste limite (continuação).....	63
Tabela 4.12- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm.	64
Tabela 4.13- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação).....	65
Tabela 4.14- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação).....	66
Tabela 4.15- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação).....	67
Tabela 4.16- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação.....	68
Tabela 4.17- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação (continuação).....	69

Tabela 4.18- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação (continuação).....	70
Tabela 4.19- Tabela resumo da estabilidade das soluções padrão.....	71
Tabela 4.20- Tabela resumo da estabilidade das soluções amostra.....	71
Tabela 4.21- Resultados das taxas de recuperação do API 1	72
Tabela 4.22- Resultados das taxas de recuperação do API 2	72
Tabela 4.23- Resultados do API 2 para o acrílico e alumínio com uma solução inicial de 50ppm.	73
Tabela 4.24- Resultados do API 2 para o acrílico e alumínio com uma solução inicial de 50ppm. E com 2 swabs humedecidos e um seco.	73
Tabela 4.25- Resultados finais do API 2 para o acrílico, alumínio, inox e silicone.....	74
Tabela 4.26- Resultados obtidos do ensaio de taxas de recuperação para o API 3.	74
Tabela 4.27- Resultados obtidos das recuperações da API 3 para o acrílico, alumínio, inox e silicone. Com aplicação de uma solução inicial cinco vezes mais concentrada e aplicação de 0.1mL.....	75
Tabela 4.28- Resultados obtidos das recuperações do API 4.....	76
Tabela 4.29- Resultados obtidos das recuperações do API 4 para o silicone. Com aplicação de uma solução inicial cinco vezes mais concentrada e aplicação de 0,1 mL.....	76
Tabela 4.30- Valor mais baixo obtido da taxa de recuperação para cada API e para cada material	77
Tabela 4.31- Valores de VMA corrigidos com as taxas de recuperação.....	78

ABREVIATURAS

ADI	<i>Acceptable Daily Intake</i>
AIM	Autorização de introdução no mercado
APIs	<i>Active Pharmaceutical Ingredients</i>
BS	Dimensão do lote
CAPA	<i>Corrective and Preventive Actions</i>
CGMP	<i>Current Good Manufacturing Practice</i>
CIP	<i>Clean in Place</i>
COP	<i>Clean out Place</i>
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DL50	Mínima dose letal
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EP	Farmacopeia europeia
ESA	Área superficial de contacto do equipamento
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMEA	<i>Failure Mode and Effect Analysis</i>
FR	Fator de Recuperação
FS	Fator de segurança

FTA	Análise de Árvore de Falhas
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
ICH	<i>International Council for Harmonisation</i>
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.
ISO	Organização Internacional de Padronização
LoB	Limite do branco
LOD	Limite de deteção
LOEL	<i>Lowest Observed Effect Level</i>
LOQ	Limite de quantificação
MAC	Valor máximo admissível
MDD	Dose Máxima Diária
MTD	Dose Mínima Terapêutica
NOEL	Nível de efeito não observado
PDE	Exposição Diária Permitida
PMVL	Plano mestre de validação de limpeza
ppm	Partes por milhão
QRM	<i>Quality Risk Management</i>
RSD	Desvio padrão relativo
s/n	Sinal-ruído
SA	Substância ativa
Spl	<i>Sampling</i>
SSA	Área superficial de amostra
STD	Padrão
TOC	Carbono Orgânico Total
Tr	Tempo de retenção

TR	Taxa de recuperação
USP-NF	<i>United States Pharmacopeia and the National Formulary</i>
VMA	Valor máximo admissível
vs	Versos

A QUALIDADE

1.1 IBERFAR

O IBERFAR, Indústria Farmacêutica S.A. faz parte de um grupo de empresas fundado em 1924. Possui uma parte maioritária do FERRAZ, LYNCE, S.A. que atua nas áreas de marketing, assuntos de regulamentação e distribuição; e da LOGIFARMA - LOGÍSTICA FARMACÊUTICA, S.A. que funciona como operador logístico.[1]

A FERRAZ, LYNCE, S.A. teve a sua origem como agente da empresa alemã Boehringer Mannheim que procurava um representante em Portugal. Iniciou a sua atividade no centro de Lisboa desenvolvendo um trabalho rigoroso, que lhe permitiu rapidamente obter representações de outras empresas farmacêuticas. Com o desenvolvimento comercial transferiu as suas instalações para a FARMÁCIA INTERNACIONAL, que deu marca a medicamentos de fabrico próprio, sendo o mais conhecido o Ergocol (um medicamento contra a obesidade).[2]

Com o crescimento da dimensão da produção foi implementada uma fábrica de especialidades farmacêuticas, que se denominou por Laboratório IBERFAR- Produtos Farmacêuticos S.A.[2] O IBERFAR iniciou a sua atividade em 1951 e passou a assegurar o fabrico em Portugal de medicamentos que eram importados e comercializados pela Ferraz, Lynce, S.A. As suas primeiras instalações industriais foram construídas em 1965 e foram sendo alargadas com o contínuo crescimento do negócio. Em 1996 a empresa decidiu comprar a Merck Sharp & Dohme e após remodelações, as novas instalações foram inauguradas em 2003.[3]

O IBERFAR, Indústria Farmacêutica S.A. tem como principal área de negócio a produção de medicamentos sólidos e líquidos para terceiros, tendo como competências distintivas a qualidade, o cumprimento dos prazos de entrega e elevada flexibilidade de adaptação às

necessidades dos seus clientes.[1] Encontra-se dividida em três sectores principais: a Produção, o Controlo da Qualidade e a Garantia da Qualidade.

A Produção fabrica produtos farmacêuticos a partir das matérias-primas e processa a sua embalagem como produto final, para entrega ao cliente;[1] o Controlo da Qualidade está dividido em duas áreas, o laboratório de análises físico-químicas e o laboratório de ensaios microbiológicos. O Controlo da Qualidade é responsável pela amostragem e análise de todas as matérias-primas, materiais de acondicionamento primário e secundário, produto semiacabado, como também pelo controlo em processo de fabrico e de produto acabado[4]; a Garantia de Qualidade que assegura o cumprimento das Boas Práticas de Fabrico.[5]

Além destes três sectores a empresa está estruturada de acordo com o organograma representado na Figura 1.1. [6]

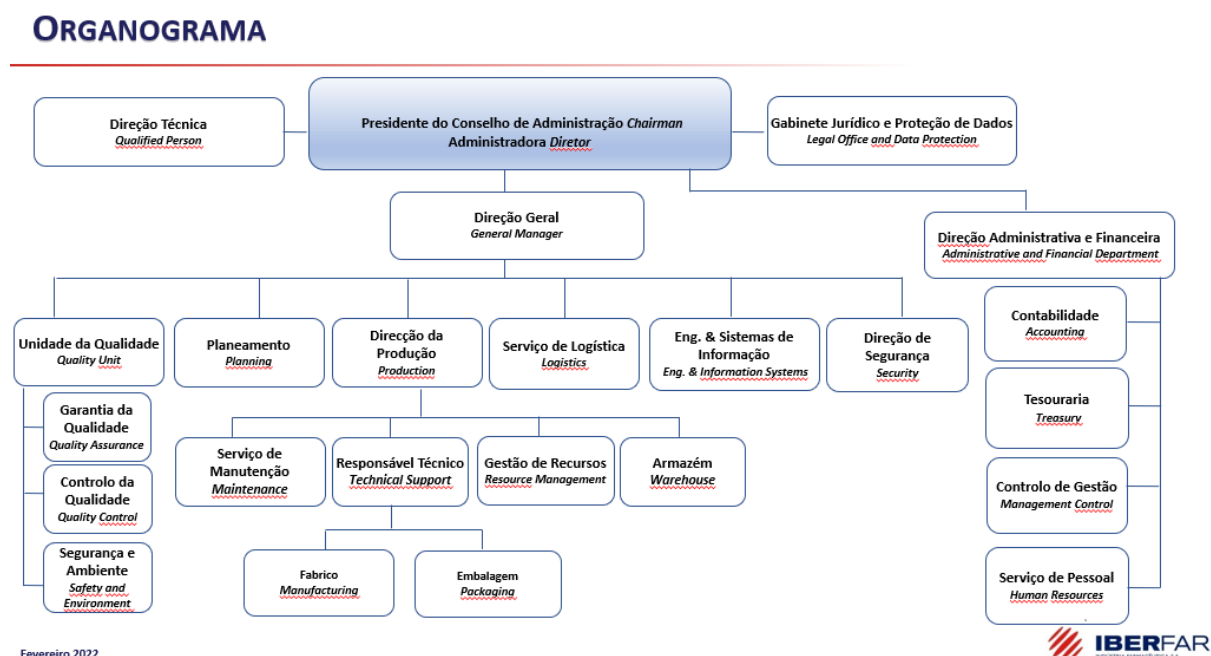


Figura 1.1- Organograma da empresa IBERFAR. [6]

1.2 A Qualidade na Indústria Farmacêutica

Um medicamento é uma substância ou um conjunto de substâncias que tem propriedades curativas ou preventivas de doença, pelo que a qualidade de um medicamento que é libertado para o mercado é de extrema importância.[7]

Para garantir a qualidade dos medicamentos é necessário assegurar que a indústria farmacêutica tenha elevados padrões de qualidade no desenvolvimento, produção e controlo dos produtos farmacêuticos. Para tal existem entidades com jurisdição que têm como missão

verificar a qualidade e segurança dos medicamentos que são importados para os seus territórios e se estão em conformidade com os regulamentos de Boas Práticas de Fabricação Atual ou mais vulgarmente conhecido como *Current Good Manufacturing Practice* (CGMP).[8] Adicionalmente, também é necessário que as empresas tenham implementado a gestão de riscos de qualidade.

1.2.1 Requisitos Legais da Qualidade

Em Portugal, as entidades reguladoras são o INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.[9] e a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), para os medicamentos de uso veterinário.[10] Sempre que existe um medicamento para ser introduzido no mercado é obrigatório que o INFARMED seja informado para que se assegure que o medicamento cumpre os requisitos de segurança, qualidade e eficácia. Só em conformidade é que o INFARMED emite a autorização de introdução no mercado (AIM).[11]

Tanto o INFARMED como a DGAV, efetuam regularmente inspeções às indústrias farmacêuticas para verificar e garantir que todos os produtos, processos e documentação estão conformes.[9]

Na Europa, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) autoriza e controla medicamentos na União Europeia, sendo responsável pela proteção da saúde pública e animal, através da avaliação científica e supervisão de medicamentos.[12]

Nos Estados Unidos a agência que controla os produtos importados é a *Food and Drug Administration* (FDA).[8] Tem-se conhecimento que já em 1963 era exigido pela FDA a limpeza de equipamentos de forma a serem cumpridos os regulamentos CGMP. Inicialmente, a preocupação dos investigadores do FDA assentava na contaminação de medicamentos sem penicilina, com penicilinas ou com a contaminação cruzada de medicamentos com esteroides.[13]

Todas estas entidades têm como sua missão garantir que todos os medicamentos comercializados são seguros e que a sua forma de fabrico está autorizada e cumpre todas as normas.

1.2.2 Boas Práticas de Fabrico

Para garantir a qualidade no processo de fabrico recorre-se aos regulamentos de boas práticas de fabrico, que contêm requisitos mínimos para os vários processos na indústria farmacêutica, desde instalações, fabricação até ao embalamento.[8] Alguns requisitos básicos das CGMP são:[14]

- Todos os processos de fabrico têm de ser definidos claramente e revistos sistematicamente, demonstrando capacidade para fabricar um medicamento com a qualidade exigida e em conformidade com as suas especificações;

- Pessoal devidamente qualificado e treinado e instalações e espaços adequados;
- Os procedimentos são escritos de forma instrucional, clara e com linguagem inequívoca;

- Quaisquer desvios são registados e investigados com o objetivo de determinar a causa raiz e corrigi-la; se necessário podem ser implementadas ações preventivas, CAPA (*Corrective and Preventive Actions*)

- O histórico completo de um lote terá que ser facilmente rastreado e acessível, por exemplo, terão que estar disponíveis os registos de fabricação, análise e distribuição.

Na União Europeia o conjunto dos regulamentos e regras que regem os medicamentos denomina-se de EudraLex.[15] Nas diretrizes Eudralex da Comissão Europeia está incorporado o Conselho Internacional para Harmonização de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano, *International Council for Harmonisation (ICH)*[16] que tem autoridade regulamentar nas indústrias farmacêuticas da Europa, Japão, EUA, Canadá e Suíça.[17] A ICH está direcionada para a qualidade, segurança, eficácia e equipas multidisciplinares,[17] tendo sido importante na atualização de várias partes das diretrizes de CGMP baseadas em controlo do risco. Em 2008 foi formalmente exigido que os fabricantes apliquem os princípios de gestão de risco de qualidade, *Quality Risk Management (QRM)*. [16]

1.2.3 Gestão de Risco da qualidade

A implementação de medidas com objetivo de melhoria da qualidade pelas indústrias aumenta a segurança dos consumidores, como também a competitividade no mercado. Ao serem aplicadas as CGMP é necessário avaliar e estudar quais os possíveis riscos que o processo de produção pode ter. Assim, torna-se essencial que haja uma gestão dos riscos da qualidade.

A avaliação de risco consiste na identificação dos perigos, na análise e avaliação dos riscos associados à exposição a esses perigos.[18]

Algumas ferramentas que podem ser usadas como parte de um QRM são:[18]

- Métodos básicos de facilitação da gestão de risco (fluxogramas, folhas de verificação, etc.);

- Análise do Efeito do Modo de Falha (FMEA- Failure Mode and Effect Analysis);
- Análise de Árvore de Falhas (FTA);

A análise do Efeito do Modo de Falha (FMEA) é mais utilizada, [19][20], sendo utilizada para detetar falhas ou riscos associados à produção. O modo de classificação desta análise faz-se através de um índice de risco, de modo que seja fácil a comparação entre o risco calculado e o risco conhecido aceitável. Assim, quanto maior for o índice, maior será a probabilidade do risco ocorrer.[21]

Esta metodologia tem em conta três parâmetros: Gravidade (G), Ocorrência (O) e Detecção (D). A Gravidade mede a gravidade dos efeitos de uma falha; a Ocorrência está relacionada com a probabilidade de ocorrência de uma falha; a Detecção indica a visibilidade de uma falha, ou seja, a facilidade com que uma falha pode ser identificada por controlo e inspeções.[21]

A Organização Internacional de Padronização (ISO) tem como foco a normalização de condutas e processos sendo a norma ISO 9001 - "Sistemas de gestão da qualidade", um dos requisitos que asseguram a consistência e aperfeiçoamento das boas práticas de trabalho, incluindo os produtos fabricados e serviços prestados.[22]

Em relação à limpeza de equipamentos um dos critérios que é necessário analisar é a fonte das contaminações e controlar os seus níveis. A ICH Q3D é a norma que define a exposição diária permitida para impurezas elementares para 24 elementos, tendo em conta as diferentes vias de administração (oral, parentérica e inalação).[23]

1.2.4 Garantia da Qualidade e Controlo da Qualidade

Num sistema de gestão da qualidade há duas áreas importantes que estão incluídas nas Boas Práticas de Fabrico: a Garantia da Qualidade e o Controlo da Qualidade. Ambas têm de ser independentes à Produção para um funcionamento satisfatório da qualidade dos produtos fabricados.[14]

A Garantia da Qualidade garante e verifica se todos os procedimentos estão de acordo com o sistema de gestão da qualidade.[24]

O Controlo de qualidade é responsável pelas amostragens e pelas análises efetuadas para as matérias-primas, produto semiacabado e produto acabado. De forma, a verificar se cumprem as especificações.[14]

LIMPEZA DE EQUIPAMENTOS DE PRODUÇÃO FARMACÊUTICA

A limpeza dos equipamentos está incluída nas boas práticas de fabrico e garantia da qualidade como um requisito regulatório e crítico para a indústria. [25]

O objetivo é garantir que os lotes subsequentes não sofram contaminação cruzada pelo produto fabricado previamente ou pelo processo de limpeza dos equipamentos da produção [26]. Procedimentos de limpeza inadequados podem resultar num produto cuja qualidade fica comprometida, podendo trazer consequências ao consumidor.[27]

Para prevenir contaminações é necessário desenvolver métodos analíticos sensíveis e capazes de detetar os ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) que poderão permanecer nas superfícies dos equipamentos da produção após a sua limpeza.[26]

Inicialmente tem de se desenvolver o protocolo de limpeza que contém as instruções passo a passo e os critérios de aceitação. [28]

Cada equipamento da produção tem um procedimento de limpeza, o qual terá de ser validado, de forma a garantir que é eficiente na remoção de resíduos de APIs e de detergente. Para validar o procedimento de limpeza inicialmente terá que se desenvolver o protocolo validação de limpeza na gama residual. Este protocolo tem as instruções detalhadas e critérios de aceitação.[28]

2.1 Contaminação de equipamentos

Na análise do produto final, com especificações próprias há contaminações que permanecem indetetáveis por estarem abaixo do limite de deteção especificado.[27]

Na Tabela 2.1 são descritas as diferentes contaminações e a sua origem nas contaminações físicas apesar de alguns destes materiais poderem ser considerados inertes, dependendo das suas consequências tipo de material.

Para diminuir as contaminações provenientes dos resíduos de agentes de limpeza é necessário proceder a validações. A atividade microbiológica é um fator de contaminação imprevisível porque poderá ocorrer a qualquer momento, por isso preventivamente torna-se imprescindível identificar e controlar todas as condições de produção pela frequente monitorização microbiológica. A contaminação cruzada de substâncias ativas é uma das mais preocupantes devido ao facto do contaminante poder interferir na ação da substância ativa (SA) do medicamento, podendo aumentar (efeito sinérgico) ou bloquear (efeito antagonista) a sua ação ou exercer um efeito totalmente diferente no medicamento em causa.[29]

Tabela 2.1- Descrição dos diferentes tipos de contaminações[29]

Tipo de Contaminação	Descrição
Contaminantes Físicos	Excipientes e substâncias ativas que não entram na formulação, filamentos de escovas/pincéis, fibras de panos de limpeza, pequenos pedaços de borracha de luvas ou papel ou de metal.
Resíduos de Agentes de Limpeza	Uso de agentes tóxicos para a remoção de resíduos
Atividade Microbiana	Contaminação microbiológica
Resíduos de Substâncias Ativas	Contaminação cruzada de substâncias ativas

2.2 Validação de Limpeza dos equipamentos

A validação de limpeza na indústria farmacêutica tornou-se um dos requerimentos das GMP. Os documentos regulamentares encontram-se nos capítulos 5, da Parte 1, Volume 4 e o Anexo 15 e 20 das "Guidelines to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use", da Legislação da Comissão Europeia.[30]

A validação de limpeza é requerida para todos os equipamentos que estiveram em contacto com o produto ao longo da sua produção, [30] de forma a verificar que não haverá

contaminações microbianas ou cruzadas. As validações são estudos que têm como objetivo demonstrar que a especificidade e a sensibilidade dos métodos analíticos são adequadas e confiáveis para análise das amostras. [6]

Em termos de documentação tem de ser elaborado um procedimento de validação de limpeza onde a eficácia foi comprovada por um sistema documental, fornecendo um elevado grau de garantia. [6]

O protocolo de validação determina como é que estas evidências serão obtidas e documentadas.[27]

Para garantir a eficácia de um procedimento de limpeza de um equipamento da produção, é necessário assegurar cinco elementos:[27]

- Um procedimento de limpeza por cada equipamento que esteja em contato com o produto durante a sua produção;
- Um procedimento que determine o nível de limpeza desejado;
- Um método de análise que seja adequado e sensível de modo a identificar níveis residuais da substância ativa;
- Um limite residual real e detetável para cada equipamento;
- Um protocolo, revisto e aprovado por técnicos especializados em áreas científicas e tecnológicas.

Os procedimentos deverão indicar quais os materiais de limpeza a serem utilizados, como deverão ser preparadas as soluções de limpeza, temperaturas e tempos de preparação e atuação, assim como todo o tipo de informações mencionadas pelo fabricante.[27]

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 dos equipamentos utilizados na produção dos medicamentos, de modo a comprovar que os equipamentos estão bem limpos e higienizados.[31]

Para a elaboração de um PMVL, inicialmente é necessário compreender as regulamentações e recolher informações sobre os produtos, equipamentos e os procedimentos de limpeza aplicados na fábrica.[32]

2.4 Escolha do Método Analítico

Existem diversas técnicas analíticas para analisar amostras para validação de limpeza. Existem fatores a ter em conta para escolher a técnica de análise. O fator mais importante está relacionado diretamente com os parâmetros a serem medidos.[33]

Há métodos específicos que detetam compostos únicos na presença de potenciais contaminantes e métodos não específicos que detetam qualquer composto que produz uma determinada resposta (ver Tabela 2.2).[33]

Tabela 2.2- Métodos analíticos específicos e não-específicos. [33],[34]

Método Específico	Método Não- Específico
Absorção atômica	Carbono Orgânico Total (TOC)
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Condutividade
Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	pH
-----	Titulação

Numa validação de limpeza é importante estabelecer a gama de trabalho, nomeadamente saber o limite mínimo aceitável de trabalho, de forma que se possa escolher o método mais apropriado.[33]

As técnicas analíticas comuns usadas incluem HPLC e TOC. Em comparação, um método TOC é um método não específico e é sensível à gama de ppb e consome menos tempo do que HPLC que é altamente específico, sensível, que pode utilizar solventes orgânicos para amostragem com *swabs*, desde que estes não interfiram com a análise.[35]

2.5 Métodos de Amostragem

Para selecionar os locais de amostragem nos equipamentos é preciso avaliá-lo e selecionar os locais com geometrias difíceis de limpar e os locais que ficam desproporcionalmente mais sujos.

Após selecionar os locais de amostragem e a escolha do método analítico, deve ser escolhido qual o método de amostragem. Esta escolha é importante para entender as suas

limitações relativamente à superfície a amostrar, deverá ser consistente e representativa de toda a peça do equipamento.

Método de amostragem por *swabs*

Este método baseia-se na eliminação física do resíduo deixado no equipamento após a sua limpeza. É utilizado *swabs* (zaragatoa feita de um material macio com a qual se efetuam amostragens em superfícies) humedecido com solvente para friccionar a superfície do equipamento, de seguida extrai-se com um volume conhecido de solvente os resíduos de substância ativa que possam estar presentes no *swab*.^[33]

Contudo, esta é uma técnica invasiva que pode introduzir fibras no equipamento e é limitada quando a amostragem é em áreas grandes, complexas e de difícil acesso.^[33]

Método de amostragem por solução de lavagem

Neste método, analisa-se uma amostra da última solução de lavagem para limpeza do equipamento. Algumas limitações podem diminuir a sensibilidade do teste; os resíduos podem não estar distribuídos homogeneamente; o volume recolhido é fundamental para garantir a interpretação dos resultados; poderá ser difícil definir as áreas amostradas.^[33]

Método de amostragem por placebo

Após a produção de determinado lote é produzido um lote de placebo (contém todos os excipientes típicos com a exceção dos princípios ativos), que passa pelas mesmas vias que o produto e assim arrastar consigo o produto residual. Este método depende do tempo de contato do placebo com as superfícies e a solubilidade dos excipientes.^[33]

Método de amostragem direta

Neste caso, não é utilizada uma superfície de contacto, mas é utilizada a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier ou técnicas de emissão de fotoelétrons. Obtendo-se espectros específicos de resíduos remanescentes na superfície analisada. Esta técnica tem vantagens por ocorrer numa única etapa e não ter perdas de amostras, porém é limitada a uma área que seja acessível para inspeção.^[33]

2.6 Escolha do “Pior Caso” na validação de limpeza

Na indústria farmacêutica é frequente a utilização dos mesmos equipamentos para a produção de medicamentos diferentes. Neste tipo de situação a validação de limpeza dos equipamentos poderá usar a estratégia do produto “pior caso”.

Assim, é de extrema importância identificar qual o produto “pior caso” em cada equipamento, ou seja, o mais difícil de remover.

Para determinar qual o produto pior-caso, poderá efetuar-se uma análise de risco baseada na análise da criticidade de modos de falha e seus efeitos, FMEA (ver 1.2.3), em que são avaliados os produtos segundo os seguintes parâmetros: [36]

- 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.

Através da comparação e interação dos fatores mencionados, seleciona-se o produto que deve ser submetido ao estudo, por apresentar mais dificuldades à sua remoção.

O princípio de seleção do produto "pior caso", tem por base a ideia de que se um procedimento de limpeza for eficaz na remoção do produto mais difícil então será também eficaz nos restantes produtos que passam pelo mesmo equipamento.

Cálculo do Limite Analítico da Substância Ativa

Segundo a FDA os limites têm de ser lógicos, práticos e verificáveis mencionando alguns limites:[37]

- 10 ppm na deteção analítica, ou seja, nenhuma SA deve estar presente num produto produzido posteriormente a níveis superiores a 10 ppm
- 1/1000 da dose terapêutica normal, isto é, uma SA não deve estar presente num produto produzido posteriormente a níveis superiores a 1/1000 da dose diária mínima da SA
- Nenhum resíduo deve ser visível no equipamento após a limpeza.

Para calcular o limite analítico da SA que corresponde ao valor máximo admissível (VMA) pode utilizar-se várias metodologias.

Uma das formas de calcular o VMA consiste no cálculo do MAC- valor máximo admissível de transição de resíduos do produto A, "pior caso", para o próximo produto a ser fabricado (produto B). O MAC pode ser calculado através da mínima dose terapêutica segundo as fórmulas (2.1) e $MAC_A (mg/ amostra (spl)) = \frac{MAC (mg) \times SSA}{ESA}$ (2.2(2.2), [38] ou através do valor de ingestão diária aceitável (ADI) (2.3). Esta segunda formula é mais usada para agentes de limpeza.[39]

$$MAC_A (mg) = \frac{MTD_A \times BS \times FS}{MDD_B} \quad (2.1)$$

$$MAC_A (mg/ amostra (spl)) = \frac{MAC (mg) \times SSA}{ESA} \quad (2.2)$$

$$MAC = \frac{ADI \times BS_B \times SSA}{MDD_B \times ESA} \quad (2.3)$$

Sendo,

MAC - Maximum Allowable Carryover do produto A

MTD_A- Dose Mínima Terapêutica do produto A (mg)

FS- Fator de segurança para dose oral = 0.001

ADI- ingestão diária aceitável do SA

BS_B- Dimensão do lote do produto B (Kg ou L)

SSA- Área superficial de amostra (cm²)

MDD_B- Dose Máxima Diária (Kg ou L)

ESA- Área superficial de contacto do equipamento partilhada pelos dois produtos (cm²)

O ADI (*Acceptable Daily Intake*) representa o efeito tóxico da substância no corpo. Pode ser obtido por duas formas:

- Através do valor do DL50 (dose letal mínima), valor que representa o nível de toxicidade que a substância induz em animais. Desta forma convém converter o valor DL50 para humanos. Esta conversão pode ser determinada empiricamente através de uma fórmula desenvolvida por Layton (ver equação 2.4):[38]

$$ADI (mg/dia) = DL50 (mg/Kg) \times P(Kg) \times F \quad (2.4)$$

Sendo:

DL50- mínima dose letal, em mg/Kg

P- Peso do corpo humano, em Kg (normalmente aplica-se 60 ou 70 kg, mas poderá aplicar-se 50 kg)

F- Fator que representa o produto entre o fator de segurança, FS, e o fator de conversão entre espécies

- No caso das substâncias que possuem um valor do nível de efeito não observado (NOEL- *No Observable Effect Level*), a fórmula a aplicar será idêntica à anterior- Equação (2.5):[40]

$$ADI (mg/dia) = NOEL (mg/Kg) \times P(Kg) \times FS \quad (2.5)$$

Sendo:

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

P- Peso do corpo humano, em Kg (normalmente aplica-se 60 ou 70kg, mas poderá aplicar-se 50 kg)

FS- – fator de segurança que depende da via de administração

O fator de segurança (FS) varia consoante a forma produzida: 0,01 para forma tópicas, 0,001 para formas orais ou 0,0001 para injetáveis ou formas oftálmicas.[41]

Outra forma de cálculo é utilizando valores permitidos de exposição diária (PDE). A determinação do PDE considera o parâmetro toxicológico NOAEL ou LOEL (nível de efeito mais baixo observado) e a aplicação de vários fatores de ajustes (F1 a F5).[39] Ver a equação (2.6)

A determinação de um PDE envolve:[39]

- Identificação dos riscos, considerando todos os dados relevantes;
- Identificação de "efeitos críticos"
- Determinação do parâmetro toxicológico (NOAEL)
- Aplicação de vários fatores de ajuste para explicar várias incertezas

$$PDE = \frac{NOAEL \times 50}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5} \quad (2.6)$$

Sendo,

NOAEL- parâmetro de toxicologia (mg/Kg/dia)

50 - Ajuste de peso (kg)

F1- Extrapolação entre espécies

F2- Fator de segurança Intra espécies

F3- Duração dos estudos não-clínicos

F4- Severidade dos efeitos observados

F5- Correção NOAEL/LOEL

O valor de PDE é fornecido por entidades qualificadas, validado por toxicologistas. Esse valor vai ser utilizado para o cálculo do MAC, em vez da utilização do ADI, ver equação (2.7)

$$MAC \text{ PDE } (mg/ spl) = \frac{PDE_A \times B \times S_B \times SSA}{MDD_B \times ESA} \quad (2.7)$$

Sendo,

PDE- Exposição diária permitida do produto A

BS_B - Dimensão do lote do produto B (Kg ou L)

SSA - Área superficial de amostra (cm^2)

MDD_B - Máxima dose diária do produto B (Kg ou L)

ESA - Área superficial de contacto do equipamento partilhada pelos dois produtos (cm^2)

Outra forma de calcular o VMA é através do limite de 10 ppm, que utiliza a equação (2.8).

$$10ppm/spl = \frac{10 \times BS_B \times SSA}{ESA} \quad (2.8)$$

Sendo,

BS_B - Dimensão do lote do produto B (Kg ou L)

SSA - Área superficial de amostra (cm^2)

ESA - Área superficial de contacto do equipamento partilhada pelos dois produtos (cm^2)

Valor máximo admissível

O valor de MAC a utilizar, caso se façam os cálculos das três maneiras apresentadas, MAC, MAC PDE e 10 ppm, deverá ser o menor dos três, uma vez que representa o "pior caso". Ou seja, o mínimo corresponderá ao VMA.

O valor encontrado para o limite analítico é o valor para o qual os resultados analíticos devem obedecer. Este deve ser apropriado à validação de limpeza a efetuar e deve ser passível de ser atingido sem dificuldades.[41]

No VMA normalmente é quantificada a substância ativa presente numa solução que é o resultado do *swabbing* efetuado numa pequena zona da superfície do equipamento, pelo que o valor anteriormente encontrado pelo VMA poderá sofrer correções (ver equação 2.9).[41]

Amostragem com *swab*

$$VMA = VMA_A \times \frac{FR}{VS} \quad (2.9)$$

Sendo:

VMA_A - Valor máximo admissível para o produto A

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

A validação de limpeza de um equipamento pressupõe três ciclos de verificação de limpeza conformes.

2.7 Parâmetros da validação do Método Analítico

Em geral, existem parâmetros que têm de ser avaliados para que possa haver confiança no método analítico desenvolvido. Estes parâmetros encontram-se em *guidelines* desenvolvidas pela ICH, USP-NF (*United States Pharmacopeia and the National Formulary*) e FDA. Em todas estas *guidelines* os parâmetros em comum são a exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermédia), especificidade, limite de deteção, limite de quantificação, linearidade e robustez.[42] Pela USP-NF, no capítulo 1225 – *Validation of Compendial Procedures* inclui como parâmetro a avaliar a gama, que está associada à linearidade.[43] A FDA adicionalmente faz recomendação para a realização de testes da recuperação e estabilidade das soluções analíticas.[44]

Em alguns destes ensaios será necessário calcular o desvio padrão relativo (RSD ou %RSD) que é o valor absoluto do coeficiente de variação, entre as amostras (ou injeções) em estudo. Além disso, o RSD é em vários parâmetros um dos critérios de avaliação.[45]

O RSD fornece uma descrição empírica dos níveis típicos de erro aleatório relativos à concentração, assim, quanto mais baixo for a concentração maior será o %RSD. Esta relação foi modelada por Horwitz, a equação de Horwitz é 2.10 onde C representa a concentração.[45]

$$RSD = 2C^{-0,15} \quad (2.10)$$

Esta equação é derivada empiricamente de vários ensaios de reprodutibilidade usando vários procedimentos analíticos. Contudo, em avaliações posteriores Horwitz indicou que as medições são efetuadas mais próximas do limite de quantificação. Assim, o erro aumenta e a equação mais apropriada é $RSD = 4C^{-0,15}$ (2.11).[45]

$$RSD = 4C^{-0,15} \quad (2.11)$$

Contudo, o fator multiplicador utilizado poderá ser alterado de forma que a equação seja mais adequada ao caso de estudo.[45]

Seletividade ou Especificidade

Por norma é o primeiro parâmetro de validação. [46] A seletividade é a capacidade de detetar o analito sem interferências dos possíveis produtos de degradação e dos materiais, como os *swabs*, os materiais do equipamento, solvente e agentes de limpeza.[47]

Linearidade e Gama

A gama de um procedimento analítico é o intervalo entre os níveis superior e inferior do analito para os quais é possível determinar com precisão, exatidão e linearidade a sua concentração usando o protocolo.[43]

A linearidade é definida como um intervalo na faixa de medição de um método analítico no qual um sinal de saída se correlaciona linearmente com a concentração de analito determinada. [46] Desta forma, a linearidade deve ser avaliada para toda a gama do procedimento analítico.[47]

A maneira mais frequente de determinar a linearidade é usando pelo menos cinco níveis de concentração (na maioria das vezes, três medições para cada nível) que incluem toda a faixa de concentração de analito esperada. De seguida, usando o método da regressão linear é calculado o coeficiente de correlação; além disso uma análise do desvio dos pontos de dados reais da linha de regressão também pode ser útil para avaliar a linearidade.[47] [46]

Exatidão

A exatidão expressa a proximidade dos valores obtidos ao valor de referência aceite.[47]

Existem duas abordagens para determinar a exatidão:[43]

A primeira compara os resultados obtidos no método com os resultados de um método validado ortogonal. Isto requer que haja um método previamente validado e admite-se que a incerteza deste método de referência é conhecida.

A segunda assenta na análise de soluções com concentrações conhecidas comparando os resultados com resultados reais de referência. Caso não seja possível obter os materiais de referência, os resultados obtidos devem ser comparados com os resultados obtidos por um procedimento independente.

Os resultados da exatidão deverão ser apresentados em percentagem de recuperação por doseamento da quantidade adicionada conhecida do analito na amostra.[47]

Precisão

A precisão de um método analítico expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre os resultados obtidos em várias determinações individuais de uma mesma amostra homogênea nas condições definidas. Pode ser avaliada de formas distintas: repetibilidade (do sistema e do método), precisão intermediária e reprodutibilidade.[47]

Cada um destes parâmetros é determinado com base no desvio padrão calculado para a série de medições, desvio padrão relativo ou o coeficiente de variação denominado.[46]

Repetibilidade do sistema

A repetibilidade do sistema estuda a variabilidade dos resultados que se devem unicamente ao equipamento.[46]

Segundo a ICH Q2(R1) este ensaio deverá ser feito utilizando ou um mínimo de 9 determinações abrangendo a gama especificada para o procedimento ou um mínimo de 6 determinações independentes à concentração de 100 % da concentração de teste.[47]

Repetibilidade

A repetibilidade do método estuda a variabilidade dos resultados obtidos nas mesmas condições operativas (por um mesmo analista, com os mesmos equipamentos) no mesmo laboratório e num curto espaço de tempo.[46]

Precisão intermédia

A precisão intermédia estuda as variações típicas no quotidiano do trabalho do laboratório. Para isso é necessário verificar que em dias diferentes, com analistas diferentes e equipamentos diferentes são obtidos resultados concordantes. [47],[46]

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade não faz parte da autorização de introdução no mercado. Deve ser considerada em casos de padronização de um procedimento analítico. A reprodutibilidade é avaliada através de um ensaio interlaboratorial.[47]

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de deteção (LOD) é a menor concentração de um analito que pode ser detetado com certeza, este valor é n vezes o nível do ruído, na maioria das vezes é três vezes superior. [46]

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração de analito que pode ser determinada com uma exatidão, precisão e incerteza assumidas.[46]

A determinação do LOD e do LOQ são semelhantes, segundo a ICH podem ser segundo as seguintes abordagens: [47]

Com base na avaliação visual se o procedimento não for instrumental (apesar de também poder ser utilizado se for instrumental) em que se utilizam amostras com concentrações conhecidas de analito e também através da estabilização de uma concentração mínima de analito que possa ser detetada com segurança, no caso do LOD ou que possa ser quantificada e aceite com exatidão e precisão.

Baseado no sinal ruído em que a determinação é efetuada com base em respostas de amostras com concentrações baixas conhecidas de analito e respostas a partir de brancos.

No caso do LOD a razão sinal- ruído aceitável é de 3:1 ou 2:1

No caso do LOQ razão sinal- ruído aceitável é de 10:1

Baseado no desvio padrão da resposta e do declive, o declive (S) pode ser estimado a partir da curva de calibração construída para a linearidade enquanto o desvio padrão da resposta (σ) pode ser estimado:

- Baseado no desvio padrão do branco: analisa-se um número adequado de amostra de branco e calcula-se o desvio padrão dessas respostas

- Baseado na curva de calibração: é utilizado o desvio padrão da regressão linear ou o desvio padrão da interceção y da linha de regressão.

Tendo os valores necessários consegue-se calcular o LOD segundo a fórmula 2.12 e o LOQ segundo a fórmula 2.13.

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad (2.12)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (2.13)$$

Robustez

A robustez de um método é determinada pela avaliação de pequenas alterações de algumas condições, as quais podem influenciar o resultado final. [46]

Este é um parâmetro que descreve a versatilidade de um método analítico em se ajustar a diferentes condições. Pode ser estimado com base na reprodutibilidade, e conduzido num laboratório, fazendo pequenas mudanças por exemplo, na temperatura da coluna de HPLC, no pH da fase móvel, no fluxo, etc.[46]

Estabilidade

A estabilidade é um parâmetro essencial para, caso haja eventuais atrasos nas análises (como falhas no equipamento), perceber se as soluções preparadas ainda permanecem com a sua qualidade igual. Desta forma, é importante analisar as soluções de amostra, padrões, reagentes e fases móveis.[44]

As amostras e padrões devem ser testados pelo menos num período de 24 horas, e a quantificação dos componentes deve ser determinada por comparação com padrões preparados recentemente. A fase móvel é considerada estavelmente aceitável se produzir cromatogramas equivalentes.[44]

É importante ter atenção às condições de armazenamento das soluções para a análise. Há soluções que podem não ser estáveis à temperatura ambiente e diminuir a temperatura para 2-8 ° C pode melhorar a estabilidade das soluções. Outro parâmetro a ter em conta é a ausência/ presença de luz.[44]

Testes limites

Um teste de limite é uma comparação direta de soluções. O objetivo é avaliar uma determinação maior ou menor.[45]

Uma das formas é utilizar o LoB que é o limite do branco, corresponde à concentração mais alta que se espera encontrar quando são testadas réplicas, e o LOQ que é a concentração quantificável mais baixa de analito que pode ser distinguida de forma confiável do LoB e na qual a deteção é viável.

Com a média das réplicas do branco e o desvio padrão (SD) calcula-se o LoB e o LOQ aceitável (segundo as equações 2.14 e 2.15, respetivamente).[48]

$$L_oB = \bar{x}_{Br} + 1,645(SD_{Br}) \quad (2.14)$$

$$L_oQ = L_oB + 1,645(SD_{Concentração\ mais\ baixa\ da\ amostra}) \quad (2.15)$$

2.8 Limpeza de Equipamentos

Após a validação e aprovação do método analítico a utilizar, segue-se a validação de limpeza para cada equipamento utilizado na produção dos fármacos.

Existem três tipos de processos de limpeza de equipamentos:[40]

Limpeza manual que é feita diretamente no equipamento por um operador treinado.

Limpeza semiautomática é aquela que além da limpeza manual também inclui algum controle automático.

Limpeza automática não envolve manuseio de pessoas, é um sistema programado para um ou vários ciclos.

Dentro da limpeza automática, destacam-se dois tipos de limpeza: CIP (Clean in Place) e COP (Clean out Place). O termo CIP refere-se a um sistema de limpeza totalmente automatizado, que consiste num sistema de recirculação com vários tanques, bombas e um sistema de tubulações que fornece a solução de limpeza aos equipamentos, o qual retorna ao tanque por recirculação. O termo COP refere-se à limpeza também automática, mas numa sala de lavagens. [49]

Durante a limpeza dos equipamentos, o solvente mais comum e prático é a água por não ser tóxico, ser barato e não deixar resíduos. Contudo, existem casos onde pode ser preferível usar solventes não aquosos ou uma combinação de solventes.[40]

O uso de detergentes durante a limpeza requer normalmente um sistema aquoso e os detergentes agem de quatro formas: agentes humectantes, solubilizantes, emulsificantes e dispersantes.[40]

Os procedimentos de limpeza devem ser suficientemente detalhados para permitir que os operadores limpem cada tipo de equipamento de uma forma reproduzível e eficaz. Deverá existir um plano de amostragem adequado de forma que se inspecione o equipamento a fim de confirmar que está conforme e pronto para novas utilizações. As inspeções são de três tipos:

Inspeção Visual

Todo o equipamento tem de ser inspecionado visualmente para detetar eventuais vestígios de produto seco ou detergentes.

Segundo Fourman e Mulle, os resíduos que poderão encontrar-se num equipamento apenas são visíveis a olho nu a cerca de $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Este valor pode ser superior nos casos em que se utilize uma lanterna ou caso as substâncias presentes no equipamento possuam cor.[41]

Esta inspeção deverá ser feita em primeiro lugar de forma a garantir que todo o equipamento se encontra limpo.

Pesquisa de Resíduos de Detergente ou outro Agente de Limpeza

No caso da pesquisa de resíduos de detergente ou de outro agente de limpeza normalmente é escolhido o método não-específico de detecção do carbono orgânico total (TOC).

A análise de TOC é bastante sensível detetando analitos com concentração na ordem das partes por bilhão (ppb), no entanto qualquer composto que contenha carbono orgânico será detetado e contabilizado.[50]

Durante a análise por TOC o que acontece é uma acidificação da amostra sob atmosfera em gás inerte, convertendo o carbono presente na amostra em dióxido de carbono e é quantificado e removido o carbono inorgânico. Sobra apenas o carbono orgânico que é obtido pela diferença entre o carbono total e o carbono inorgânico.[51]

Pesquisa de Atividade Microbiológica

A contaminação microbiológica é um fator a ter em conta de forma a evitar a proliferação microbiana. Deste modo as condições de armazenagem do equipamento antes e depois da limpeza deverão ser consideradas e avaliadas de forma que não se ultrapassem os limites recomendados de microrganismos. [52]

Pesquisa de Resíduos de Substância Ativa

A determinação de resíduos de substância ativa assenta na procura de resíduos ínfimos que possam estar presentes no equipamento após a sua limpeza.

As amostras são recolhidas com recurso a *swabs*, e a análise é feita por HPLC. A determinação de API nas amostras é efetuada comparando os resultados com resultados de soluções padrão com concentração igual ao limite analítico. O pretendido é que a amostra recolhida do equipamento tenha concentração inferior.

MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento do método para a determinação e quantificação na gama residual de quatro APIs (API 1, API 2, API 3 e API 4), decorreu no laboratório IBERFAR. Depois do desenvolvimento do método, seguiu-se a elaboração do protocolo de validação.

Nesta seção vão ser apresentados os materiais, equipamentos, solventes e reagentes, as preparações de soluções, procedimento experimental e as condições operacionais.

3.1 Equipamentos da produção

Cada API que vai ser estudado passa por um conjunto de equipamentos no processo a sua produção. Em alguns equipamentos da produção os APIs em estudo são o "pior caso". Na Tabela 3.1 estão identificados os equipamentos onde os APIs em estudo são "pior caso" e os materiais que os compõe.

Tabela 3.1- Equipamentos onde cada API em estudo é o “pior caso” e os materiais que o compõem

	Equipamentos	Materiais
API 1	Integra com alimentador de rampas	Inox, Silicone, Alumínio
API 2	BIN 150 (Misturador Bohle 200)	Inox, Alumínio
	Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal) (2º pior caso)	Inox, Silicone, Alumínio
	Reator 50 L	Inox
API 3	Integra com gavetas (Alimentador Universal)	Inox, Silicone, Alumínio
API 4	Xaropeira 1000 L/500 L/300 L	Inox
	Agitador	Inox, Alumínio
	Sistema de filtração-trasfega - Bomba+Housing	Inox
	Máquina enchimento líquidos King	Inox

3.2 Determinação do Valor Máximo Admissível de API

Para este estudo 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 quantidades residuais de substância ativa ou de outros possíveis contaminantes.

Primeiro foram avaliados quais os equipamentos utilizados para cada um dos API. Posteriormente, fez-se uma análise de risco (exceto quando o equipamento é dedicado). 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 API, toxicidade, frequência de produção, dificuldade de remoção e solubilidade.

Sabendo qual o "pior caso", calcula-se o VMA, considerando o valor mínimo obtido, entre as três possíveis formas de calcular o valor máximo admissível (ver capítulo 2.6).

Nesta seção irá ser utilizada a designação de Produto 1, produto 2... ou API 5, API 6... para indicar os outros produtos/ APIs que passem no mesmo equipamento dos APIs em estudo (API 1, API 2, API 3, API 4).

3.2.1 Determinação do VMA para API 1

Após a avaliação de todos os equipamentos e usando a análise de risco verificou-se que o API 1 é o "pior caso" para um único equipamento - Integra com alimentador de rampas.

Neste equipamento passam onze produtos diferentes, pelo que se calculou o limite analítico da Substância Ativa das diferentes formas para os 11 produtos. Atribuiu-se o VMA ao valor mais baixo. (ver Tabela 3.2).

Tabela 3.2- Valores de todos os produtos que passam na Integra com alimentador de rampas e valor de VMA obtido para o "pioor caso". A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	7,2	2,2380	0,3921	0,0859	8,59
Produto 2	14,3	4,4761	0,7842		
Produto 3	14,3	4,4761	0,7842		
Produto 4	7,2	2,2380	0,3921		
Produto 5	7,2	2,2380	0,3921		
Produto 6	41,0	12,8174	0,2256		
Produto 7	41,0	12,8174	0,2256		
Produto 8	2,7	0,8392	0,0859		
Produto 9	10,7	3,3569	0,3437		
Produto 10	21.5	6.7164	0.1572		
Produto 11	15.0	4.6999	0.4662		

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 232718,45 \text{ cm}^2$$

$$BS_B = 80,0 \text{ Kg}$$

$$10 \text{ ppm (mg)} = 10 \times 80 = 800$$

$$10 \text{ ppm (mg / spl)} = \frac{800 \times 25}{232718,45} = 0,0859$$

$$VMA = 0,0859 \frac{mg}{spl} \quad VMA = 0,0859 \times 100 = 8,59 ppm$$

3.2.2 Determinação do VMA para API 2

O Reator de 50 L é um equipamento dedicado ao API 2, não sendo necessário a elaboração de uma análise de risco. O cálculo do VMA para este caso torna-se mais fácil (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Valores do API 2 e valor de VMA obtido.

	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
API 2	1229,2	0,3278	0,2786	0,279	27,86

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 305086,09 \text{ cm}^2$$

$$BS = 340,0 \text{ Kg}$$

$$10ppm (mg) = 10 \times 340 = 3400$$

$$10ppm (mg / spl) = \frac{3400 \times 25}{305086,09} = 0,2786$$

$$VMA = 0,2786 \frac{mg}{spl} \quad VMA = 0,2786 \times 100 = 27,86 ppm$$

Para o BIN 150L (Misturador Bohle 200), apenas passam dois APIs foi necessário a elaboração de uma análise de risco e chegou-se à conclusão de que a API 2 era o "pior caso". Calculou-se o limite Analítico da Substância Ativa das diferentes formas e escolheu-se o valor mais baixo, para VMA (ver Tabela 3.4)

Tabela 3.4- Valores do outro produto que passa no BIN 150L e valor de VMA obtido.

Produto B	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	48,5	0,0129	0,2218	0,013	1,29

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 193\,505,89 \text{ cm}^2$$

$$BS B = 171,7 \text{ Kg}$$

$$MTD A = 2 \text{ mg}$$

$$MDD B = 0,0034 \text{ Kg}$$

$$MAC \text{ (mg)} = \frac{2 \times 171,7 \times 0,001}{0,0034} = 100,0$$

$$MAC \text{ (mg / spl)} = \frac{100 \times 25}{193\,505,89} = 0,0129$$

$$VMA = 0,0129 \frac{\text{mg}}{\text{spl}} \quad VMA = 0,0129 \times 100 = 1,29 \text{ ppm}$$

Após a análise de risco, para a Integra com alimentador universal, chegou-se à conclusão de que o API 2 não era o “pior caso”. Contudo, como era o segundo mais produzido, decidiu-se validar também para esta máquina (ver Tabela 3.5).

Tabela 3.5- Tamanho de lote e quantidade de lotes produzidos ao ano que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal)

	BS	Lotes
API 2	340	66
API 5	270	1
API 6	310	8
API 7	390	1

Para esta máquina temos três API a ter em consideração para o cálculo do VMA (Tabela 3.6).

Tabela 3.6- Valores de todos os APIs que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal) e valor de VMA obtido para o "pior caso". A negrito está destacado o API que para os cálculos é o produto B.

APIs	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
API 5	553,1	0,1475	0,2212	0,0819	8,19
API 6	307,3	0,0819	0,2540		
API 7	307,3	0,0819	0,3196		

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 305\,086,09 \text{ cm}^2$$

$$BS = 310,0 \text{ Kg}$$

$$MTD A = 2 \text{ mg}$$

$$MDD B = 0,0006 \text{ Kg}$$

$$MAC \text{ (mg)} = \frac{2 \times 310 \times 0,001}{0,0006} = 1\,000,0$$

$$MAC \text{ (mg / spl)} = \frac{1000 \times 25}{305086,09} = 0,0819$$

$$VMA = 0,0819 \frac{\text{mg}}{\text{spl}} \quad VMA = 0,0819 \times 100 = 8,19 \text{ ppm}$$

3.2.3 Determinação do VMA para API 3

O API 3 é o "pior caso" para a Integra com alimentador universal, na Tabela 3.7 está o valor de VMA obtido.

Tabela 3.7- Valores de todos os produtos que passam na Integra com alimentador com gavetas (alimentador universal) e valor de VMA obtido para o "pio caso". A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto B	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	71,4	42,9865	0,2450	0,2287	22,9
Produto 2	37,7	22,6871	0,2813		
Produto 3	17,6	10,5874	0,2287		

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 275\,484,08 \text{ cm}^2$$

$$BS = 252,0 \text{ Kg}$$

$$10 \text{ ppm (mg)} = 10 \times 252 = 2520$$

$$10 \text{ ppm (mg / spl)} = \frac{2520 \times 25}{275\,484,08} = 0,2287$$

$$VMA = 0,2287 \frac{\text{mg}}{\text{spl}} \quad VMA = 0,2287 \times 100 = 22,9 \text{ ppm}$$

3.2.4 Determinação do VMA para API 4

O API 4 faz parte da composição de um produto de formulação líquida, sendo o "pio caso" para os seguintes equipamentos: sistema de filtração-trasfega - bomba+housing, xaropeira 1000L, agitador e máquina de enchimento líquidos King.

No sistema de filtração-trasfega - bomba+housing passam dez produtos diferentes. Calculou-se o limite VMA das diferentes formas e selecionou-se o valor mais baixo (ver Tabela 3.8).

Tabela 3.8- Valores de todos os produtos que passam no Sistema de filtração-trasfega - Bomba+Housing e valor de VMA obtido para o "pior caso". A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	2,6857	0,0347	1,3861	0,0128	1,28
Produto 2	2,7611	0,0356	10,6882		
Produto 3	1,3876	0,2387	5,3713		
Produto 4	1,3759	0,2387	5,3262		
Produto 5	1,3805	0,0178	5,3440		
Produto 6	1,3806	0,0178	5,3443		
Produto 7	2,7477	0,0355	0,2836		
Produto 8	2,7477	0,0355	0,2836		
Produto 9	0,9924	0,0128	3,8416		

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 174 \, 537,84 \text{ cm}^2$$

$$BS = 2 \, 686 \text{ L}$$

$$MTD A = 1,0 \text{ mg}$$

$$MDD B = 0,03 \text{ L}$$

$$MAC \text{ (mg)} = \frac{1,0 \times 2 \, 686 \times 0,001}{0,03} = 89,40$$

$$MAC (mg / spl) = \frac{89,40 \times 25}{174\ 537,84} = 0,01281$$

$$VMA = 0,01281 \frac{mg}{spl} \quad VMA = 0,01281 \times 100 = 1,281 \text{ ppm}$$

A xaropeira é utilizada por 6 produtos diferentes. Calculou-se o VMA das diferentes formas e foi selecionado o valor mais baixo (ver Tabela 3.9).

Tabela 3.9 - Valores de todos os produtos que passam na Xaropeira e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto B	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	2,7	0,0347	1,3861	0,0048	0,48
Produto 7	2,7	0,3545	0,2836		
Produto 8	2,7	0,3545	0,2836		
Produto 9	1,0	0,0128	3,8416		
Produto 10	0,4	0,0048	1,4323		

Cálculo do VMA

$$SSA = 25 \text{ cm}^2$$

$$ESA = 174\ 538 \text{ cm}^2$$

$$BS B = 1\ 000 \text{ L}$$

$$MTD A = 1,0 \text{ mg}$$

$$MDD B = 0,03 \text{ L}$$

$$MAC (mg) = \frac{1,0 \times 1\ 000 \times 0,001}{0,03} = 33,3330$$

$$MAC (mg / spl) = \frac{33,3330 \times 25}{174\ 538} = 0,0048$$

$$VMA = 0,0048 \frac{mg}{spl} \quad VMA = 0,0048 \times 100 = 0,48 \text{ ppm}$$

O agitador é utilizado por 5 produtos diferente. Calculou-se o VMA das diferentes formas e selecionou-se o valor mais baixo (Tabela 3.10)

Tabela 3.10- Valores de todos os produtos que passam na Agitador e valor de VMA obtido para o “pior caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto B	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 4	1,4	0,0178	5,3	0,0048	0,48
Produto 7	2,7	0,0355	0,2836		
Produto 8	2,7	0,0355	0,2836		
Produto 10	0,4	0,0048	1,4		

Neste caso o produto B é igual ao da Xaropeira, e como a área superficial de contacto do equipamento partilhada pelos dois produtos (cm²) é igual o VMA é o mesmo.

Para a máquina de enchimento líquidos King, por onde passam nove produtos diferentes foi calculado o VMA e selecionado o valor mais baixo (Tabela 3.11).

Tabela 3.11- Valores de todos os produtos que passam na máquina enchimento líquidos King e valor de VMA obtido para o “pioor caso”. A negrito está destacado o produto que para os cálculos é o produto B.

Produto B	MAC / spl PDE (mg/spl)	MAC /spl (mg/spl)	10 ppm/ spl (mg/spl)	VMA/ spl (mg/spl)	VMA ppm
Produto 1	2,7	0,0347	1,3861	0,0048	0,48
Produto 2	2,8	0,0356	10,6882		
Produto 3	1,4	0,0179	5,3713		
Produto 4	1,4	0,0178	5,3262		
Produto 7	2,7	0,0355	0,2836		
Produto 8	2,7	0,0355	0,2836		
Produto 9	1,0	0,0128	3,8416		
Produto 10	0,4	0,0048	1,4323		

Neste caso o produto B é igual ao da Xaropeira, e como a área superficial de contacto do equipamento partilhada pelos dois produtos (cm²) é igual o VMA é o mesmo.

VMA de todos os API

O VMA considerado para cada API é o valor mais baixo de VMA obtido de todas as máquinas que são “pioor caso”. Na Tabela 3.12 estão indicados os VMA considerados.

Tabela 3.12- Tabela resumo com os VMA considerados para cada API em estudo

API	VMA
API 1	8,59
API 2	1,29
API 3	22,87
API 4	0,48

3.3 Materiais utilizados

Para a realização do método experimental, foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Balança analítica com precisão de 0,0001 g (Mettler Toledo XPR226DR);
- Coluna X-Terra RP8, 150x4,6 mm, 3 µm marca: Waters
- Swabs TXTM 714A-Larhe Alpha™ swab TEXWIPE
- Vials de vidro
- HPLC (Agilent)
- Placas de Acrílico, Alumínio, Inox, Teflon e Silicone
- Material recorrente de laboratório

O equipamento HPLC é constituído por vários componentes, como se verifica na Figura 3.1. É constituído pelas bombas que fornecem ao sistema um fluxo em gradiente ou isocrático (1), a coluna (2), o amostrador com injetor automático (3), os detetores de UV-VIS (4), e a zona dos solventes (5).



Figura 3.1- Equipamento HPLC.

Para preparação das soluções, amostras e posterior análise cromatográfica, são utilizados os seguintes solventes/reagentes:

- Metanol (HPLC-Gold-Ultragradient)
- Água MilliQ
- Ácido orto-fosfórico 85% (m/m)
- Etanol 96° (analysis- ACS- Reag. PH. Eur.)
- Dihidrogenofosfato de potássio

3.4 Preparação das Soluções e Fase Móvel

Fase móvel

Este trabalho será em modo de gradiente e terá duas fases móveis:

Fase Móvel A - Tampão dihidrogenofosfato de potássio/ Metanol (900:100)

Fase Móvel B - Tampão dihidrogenofosfato de potássio/ Metanol (250:750)

Preparação da Solução tampão de dihidrogenofosfato de potássio 50 mM a pH 2,3

Pesar 6,8 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), transferir para um balão de 1000 mL. Ajustar o pH a 2,3 com ácido *orto*-fosfórico a 85%.

Na Tabela 3.13 estão apresentadas as condições cromatográficas e na Tabela 3.14 está apresentado o gradiente utilizado.

Tabela 3.13- Condições cromatográficas

Coluna	X-terra RP8, 150X4,6 mm, 3 µm
Fluxo	1,4 mL/mim
Detetor	266 nm (API 1), 222 nm (API 2), 216 nm (API 3), 236 nm (API 4)
Volume de injeção	5 µL
Tempo corrida	12 min
Temperatura do autosampler	22 °C
Temperatura da coluna	40 °C
Líquido Injetor	Etanol 96°

Tabela 3.14- Tabela de gradiente

Tempo (min)	% Fase Móvel A	% Fase Móvel B
0	95	5
3	68	32
6	5	95
8	95	5
12	95	5

Soluções

O diluente utilizado em todas as preparações de soluções foi o Etanol 96° for analysis-ACS-Reag. Ph. Eur.

Para a preparação das soluções-padrão, são necessários os padrões:

- API 1 80 mg em 200 mL de etanol
- API 2 80 mg em 200 mL de etanol
- API 3 80 mg em 200 mL de etanol
- API 4 80 mg em 200 mL de etanol

A concentração da solução-mãe é de 500 ppm (segundo a equação (3.1))

$$C = \frac{m}{V \times d} \times 10^6 \quad (3.1)$$

Sendo que:

C- Concentração da solução, em ppm

d- Densidade do etanol= 800 mg/mL [53]

m- Massa, em mg

V- Volume da solução, mL

10^6 - Fator de conversão para ppm

Para o estudo feito utilizou-se diferentes concentrações abrangendo a gama de trabalho de 125 ppm a 0,25 ppm.

Para se proceder ao cálculo das diferentes diluições, utiliza-se a equação (3.2), de modo a calcular qual o volume a retirar da solução-mãe e obter a gama de concentrações. As soluções são preparadas em balões volumétricos de 100 mL.

$$C_A \times V_A = C_B \times V_B \quad (3.2)$$

Em que:

C_A - concentração da solução de partida

V_A - Volume a retirar da solução de partida

C_B - Concentração que se pretende obter

V_B - Volume final da solução

Utilizando a equação anterior, procedeu-se ao cálculo das diferentes diluições. Os valores obtidos estão representados na Tabela 3.15.

Tabela 3.15- Preparação dos padrões para as concentrações necessárias para os parâmetros de validação

Concentração da solução inicial / ppm	Volume a retirar da solução inicial / mL	Balão volumétrico	Concentração final da solução / ppm
500	25	100 mL	125
500	20	100 mL	100
500	10	100 mL	50
500	4	100 mL	20
500	2	100 mL	10
100	1	100 mL	1
10	2,5	100 mL	0,25

Em determinados ensaios utilizou-se outras preparações/ volumes, mantendo-se a concentração final.

No caso do método analítico utilizou-se também soluções a 12500 ppm, 2500 ppm que se preparam da seguinte forma:

Solução de 12500 ppm

Pesar 100mg para um balão de 10mL e completar com etanol 96.

Solução de 2500 ppm

Pesar 20mg para um balão de 10mL e completar com etanol 96.

3.5 Validação do Método Analítico

Na validação serão testados os parâmetros já enunciados no ponto 2.7: Especificidade, Linearidade, Exatidão, Repetibilidade, Precisão do Sistema, Limite de Quantificação, Teste limite, Precisão Intermédia, Estabilidade do analito nas soluções e equipamento.

Por cada sequência de análise e por cada analista verificou-se o system suitability que deve cumprir os critérios descritos no método analítico.

Especificidade

Pretende-se verificar a ausência de interferências relativamente aos picos principais a quantificar.

Foram efetuadas análises nos seguintes tipos de amostras:

Padrão 10 ppm de cada API

Preparou-se 4 soluções (uma de cada API) a 125 ppm e diluiu-se até à concentração de 10 ppm. Injetou-se uma vez cada um dos padrões 10 ppm.

Padrão mix 10 ppm

Preparou-se uma solução de 125 ppm contendo os 4 APIs e diluiu-se até obter 10 ppm. Injetou-se uma vez o padrão.

Branco I

Num vial preparou-se uma mistura da fase móvel A e da fase móvel B, correspondente à primeira linha de gradiente (95:5)

Injetou-se uma vez a mistura.

Branco II

Injetou-se uma vez etanol 96°.

Branco III

Humedeceu-se três *swabs* em etanol 96° e colocou-se em 10,0 ml de etanol 96. Levou-se a solução 30 minutos aos ultrassons. Injetou-se uma vez esta solução.

Branco Material

Aplicou-se 0,5 ml de etanol 96° nos diferentes materiais, previamente lavados e secos: silicone, inox, acrílico, teflon e alumínio e deixou-se secar durante a noite. Humedeceu-se três *swabs* em etanol 96°, extraiu-se o inoculado de cada área de amostragem (5 cm x 5 cm) e efetuando-se 15 passagens em cada sentido, seguindo a figura 3.2. Colocou-se os *swabs* em 10,0 ml de diluente e levou a solução 30 minutos aos ultrassons. Injetou-se uma vez as diferentes soluções.

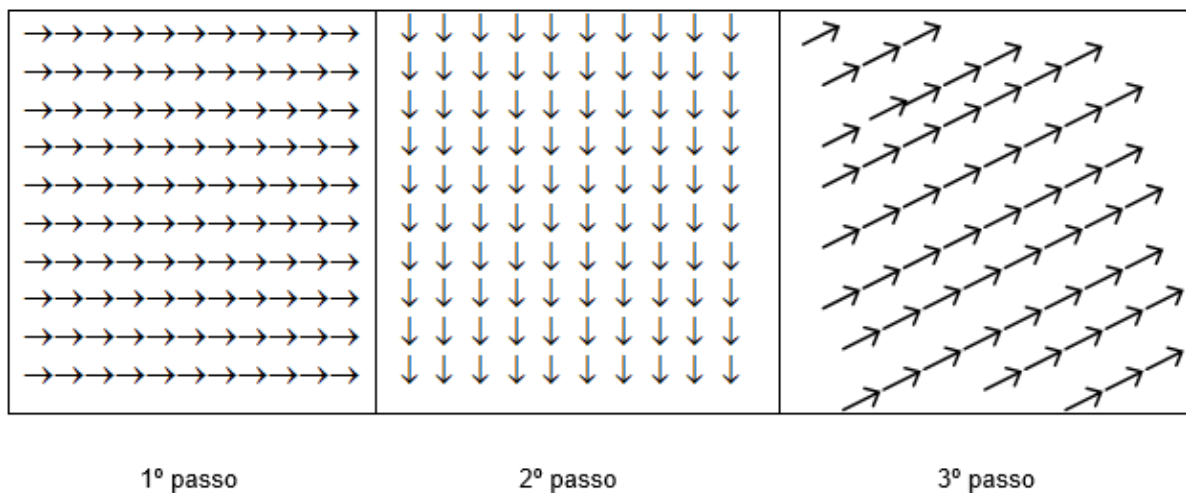


Figura 3.2- Movimento a efetuar com o *Swab*, aquando da amostragem na placa

Determinação do limite de quantificação (LOQ)

Pretende-se comprovar a capacidade do método analítico em quantificar resíduos abaixo do valor VMA determinado para cada API.

Preparou-se em duplicado uma solução de 0,25 ppm. Injetou-se esta solução em triplicado.

Exatidão, linearidade e repetibilidade

Pretende-se comprovar que o método é exato e linear ao longo da gama de trabalho considerada (LQ a 125 ppm)

É necessário verificar a variabilidade do sistema com as condições operacionais de trabalho.

Preparou-se as soluções de 0,25 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm e 125 ppm em triplicado.

Injetou-se uma vez cada uma destas soluções.

Precisão do sistema

É necessário comprovar a precisão do sistema, nas condições de trabalho.

Preparou-se as soluções de 10 ppm.

Injetou-se seis vezes o padrão de 10 ppm.

Precisão intermédia

É necessário verificar que em diferentes condições de rotina (por exemplo, operadores, equipamentos e dias diferentes) se obtêm resultados concordantes.

Um segundo analista, num segundo dia preparou os padrões de 0,25 ppm, 10 ppm e 50 ppm em triplicado. Injetou uma vez cada um dos padrões.

Testes limites

O objetivo é saber qual o limite mínimo, distinguível e confiável do LOB (limite do branco).

É necessário demonstrar que amostras com resposta inferior ao LOQ têm concentração de analito abaixo deste.

Injetou-se uma vez: três soluções Branco II e 3 soluções Branco III (ver preparação no ensaio de especificidade) e seis soluções ao nível do LOQ.

Estabilidade

É necessário comprovar que estabilidade dos padrões e amostras ao longo do tempo, sob a influência de uma variedade de fatores ambientais, como temperatura, humidade e luz.

Utilizou-se as soluções 0,25 ppm, 10 ppm e 125 ppm preparadas para o ensaio da exatidão e armazenadas em diferentes condições: no frigorífico, na bancada e na ausência. Injetar as soluções ao longo do tempo.

Colocou-se três swabs em 10,0 ml da solução de 0,25 ppm e levou-se a solução 30 minutos aos ultrassons (passo feito em triplicado). Repetiu-se este passo para as soluções de 10 ppm e 125 ppm. As soluções foram armazenadas em diferentes condições: bancada (temperatura ambiente), frigorífico (entre 7 °C a 9 °C) e na ausência de luz (temperatura ambiente). Injetou-se ao longo do tempo.

3.6 Validação do Método Analítico com taxas de recuperação

A abordagem deste trabalho foi contaminar diferentes materiais (acrílico, alumínio, inox, teflon, silicone) com concentrações conhecidas de API e calcular as taxas de recuperação.

Preparou-se 4 soluções (uma de cada API) a 2500 ppm e de 10 ppm.

Inoculou-se a área de amostragem (5 cm x 5 cm) com 0,5 ml da solução a 2500 ppm nos diferentes materiais, previamente lavados e secos: silicone, inox, acrílico, teflon e alumínio e deixou-se secar os cupões ao ar. Repetiu-se este procedimento, em triplicado, para cada API e para 10 ppm.

Saturou-se três swabs em etanol 96° e retirou-se os resíduos de toda a área de amostragem de acordo com a figura 3.2, efetuando 15 passagens em cada sentido.

Introduziu-se os três *swabs* em 10,0 ml de etanol 96° e colocou-se nos ultrassons durante 30 minutos. Injetou-se uma vez cada amostra.

Na tentativa de melhorar resultados preparou-se soluções a 12500 ppm e 50 ppm dos APIs: API 2, API 3 e API 1. Inoculou-se a área de amostragem (5 cm x 5 cm) com 0,1 ml da solução a 12500 ppm nos materiais: acrílico, alumínio, Inox e silicone. Repetiu-se este procedimento, em triplicado, para cada API e para a concentração de 50 ppm.

Numa outra tentativa de melhorar resultados com as soluções anteriores testou-se para o API 2 no acrílico e alumínio inoculou-se a área de amostragem com dois *swabs* humedecidos e um seco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação do método Analítico

Os resultados e respetiva discussão apresentam-se de seguida para cada ensaio.

4.1.1 Cálculos para os ensaios

Neste capítulo são apresentadas todas as equações necessárias para os cálculos que foram efetuados nos vários ensaios.

Cálculo do RSD:

$$\%RSD = \frac{sd}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.1)$$

Sendo,

sd- Desvio padrão dos resultados

\bar{x} - Média dos resultados

Para o cálculo das recuperações:

$$\%Recuperação = \frac{C_{obtida}}{C_{teorica}} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde,

$$C_{obtida} = \frac{AAm \times C_{STD}}{ASTD} \quad (4.3)$$

$$C_{teorica} = MSTD \times FDP \times P \times d \quad (4.4)$$

Sendo,

C_{obtido} – Concentração de API obtido, ppm

$C_{teorico}$ – Concentração de API teórica, ppm

C_{STD} - Concentração do padrão, ppm

AAM – área da amostra

ASTD – área do padrão

MSTD – massa do padrão, mg

P – Potência do padrão, em percentagem

FDP– Fator de diluição do padrão (1250 para o padrão de 10 ppm)

d etanol- densidade do etanol (0,8)

Para o cálculo da diferença entre os resultados obtidos das duas analistas, para a precisão intermédia é necessário calcular a concentração obtida segundo a fórmula 4.3 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** e de seguida calcula-se a diferença segundo a fórmula 4.5.

$$Diferença = |C_{obtidoA2} - C_{obtidoA1}| \quad (4.5)$$

Sendo,

$C_{obtidoA2}$ – Concentração de API obtido pela analista 2, ppm

$C_{obtidoA1}$ – Concentração de API obtido pela analista 1, ppm

Para o cálculo do desvio dos resultados para o ensaio de estabilidade utiliza-se a fórmula 4.3 e de seguida calcula-se a diferença segundo a fórmula 4.6.

$$\%desvio = \left| \frac{C_{obtidoTx} - C_{obtidoT0}}{C_{obtidoT0}} \right| \times 100 \quad (4.6)$$

Sendo,

$C_{obtidoTx}$ – Concentração de API obtido no tempo x, ppm. Onde x assume valores diferentes a zero.

$C_{obtidoT0}$ – Concentração de API obtido no tempo 0, ppm

Para o cálculo das taxas de recuperação utilizou-se a fórmula 4.7.

$$\%Taxa = \frac{CAM}{CSTD} \times 100 \quad (4.7)$$

Onde,

$$CAM = \frac{\frac{AAM}{ASTD} \times MSTD \times P \times \frac{FDA}{FSTD}}{0.8} \times 10 \quad (4.8)$$

Sendo,

CAM – Concentração de API na amostra, ppm

AAM – área da amostra

ASTD – área do padrão

MSTD – massa do padrão, mg

P – Potência do padrão, em percentagem

FDA – Fator de diluição da amostra (=1)

FDP– Fator de diluição do padrão (1250 para o padrão de 10 ppm)

d etanol- densidade do etanol (0,8)

4.1.2 Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico

Especificidade

Um dos critérios para este ensaio é que os tempos de retenção dos picos na solução mix das diferentes substâncias ativas correspondam ao mesmo tempo de retenção das soluções de cada uma das substâncias ativas preparadas em separado. Na Figura 4.1 está o cromatograma de comparação do padrão de mistura (contém os quatro APIs) e o API 1. Na Figura 4.2 está o cromatograma de comparação do padrão de mistura (STD Mix) e o API 2. Na Figura 4.3 está o cromatograma de comparação do STD Mix e o API 3. Na Figura 4.4 está o cromatograma de comparação do STD Mix e o API 4.

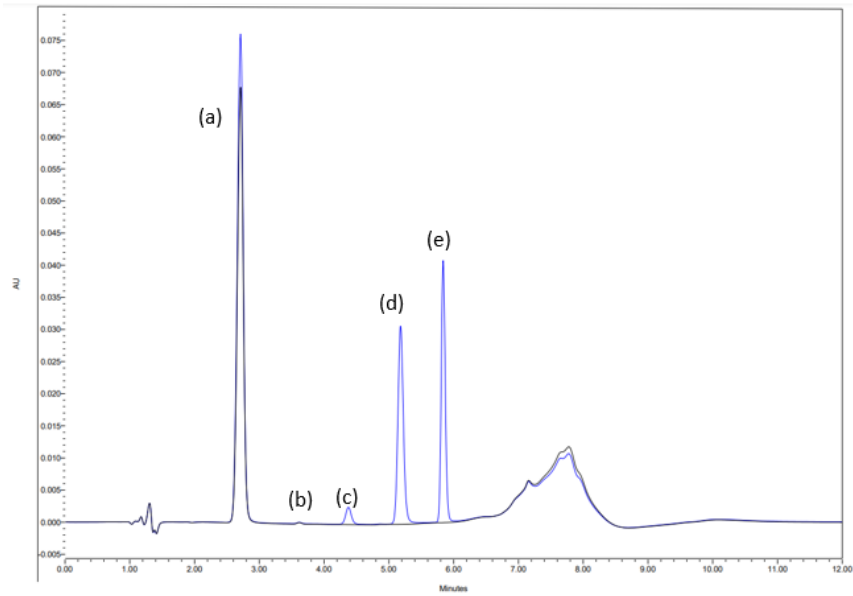


Figura 4.1- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 1 (linha a preto) aos 266nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2

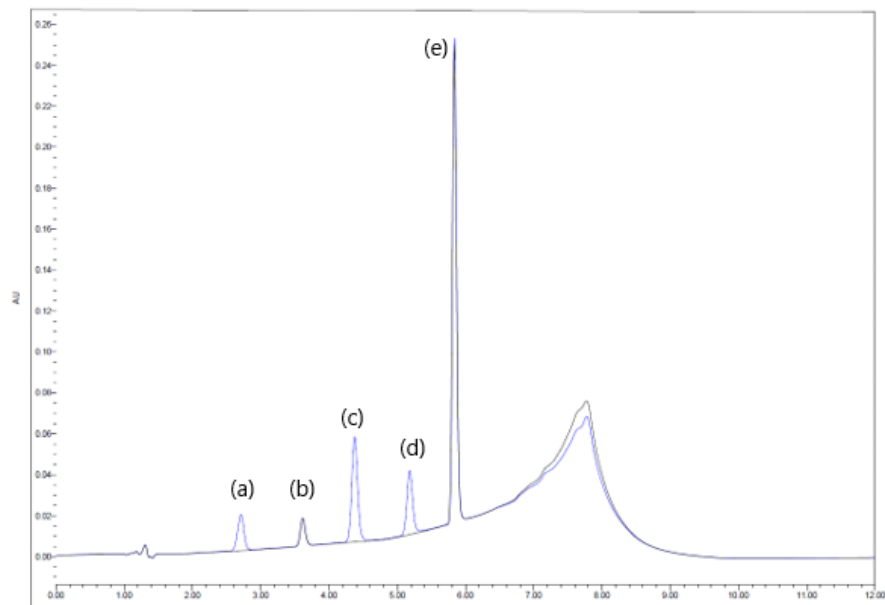


Figura 4.2- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 2 (linha a preto) aos 222nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2

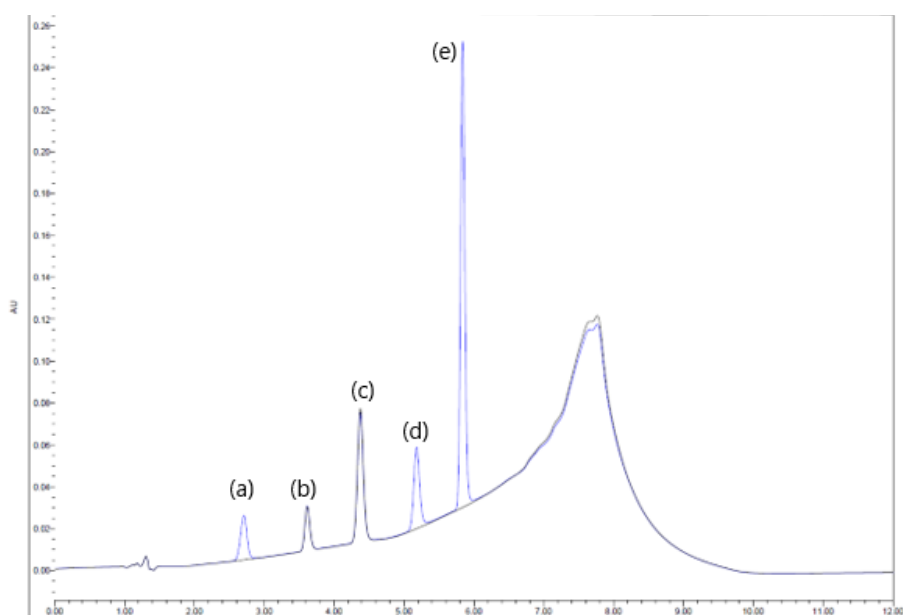


Figura 4.3- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 3 (linha a preto) aos 216nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2

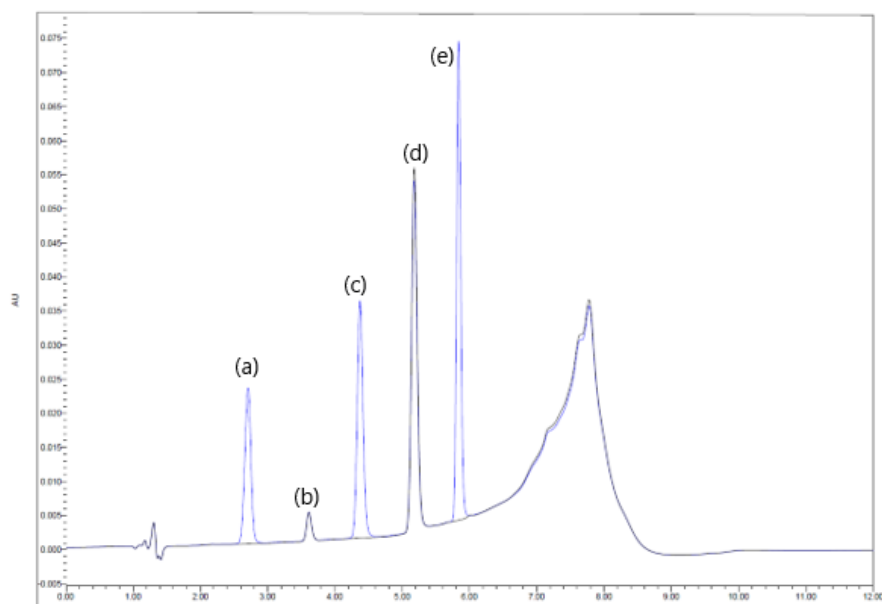


Figura 4.4- Cromatograma da sobreposição do cromatogramas STD mix (linha a azul) e do cromatograma do API 4 (linha a preto) aos 236nm. (a)= pico do API 1 (b)= Pico com branco (c)= pico do API 3 (d)= pico do API 4 (e)=pico do API 2

Pelos cromatogramas verificou-se que os tempos de retenção dos picos na solução mistura (mix) dos diferentes APIs, corresponde ao mesmo tempo de retenção dos picos presentes nas soluções de cada uma das APIs preparadas em separado.

Os resultados de comparação dos padrões com os diferentes brancos estão apresentados Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Resumo dos resultados de cada API. Tr= tempo de retenção

Ensaio		API 1		API 2		API 3		API 4	
		Tr	Área	Tr	Área	Tr	Área	Tr	Área
STD 10ppm		2,71	439754	5,84	1005460	4,38	391871	5,18	313529
STD mix		2,71	492562	5,84	1018852	4,37	377398	5,18	302572
Branco I		--	--	--	--	--	--	--	--
Branco II		--	--	--	--	--	--	--	--
Branco III		--	--	--	--	--	--	--	--
Branco Material	Silicone	--	--	--	--	4,48	251	5,25	677
	Inox	--	--	--	--	4,48	867	--	--
	Acrílico	2,71	1250	--	--	4,48	834	--	--
	Teflon	--	--	--	--	--	--	--	--
	Alumínio	--	--	--	--	--	--	--	--

O ensaio demonstrou que os swabs, os solventes, os materiais utilizados nos estudos de recuperação têm uma interferência inferior a 0,5% da área do pico do STD.

Os resultados comprovam que não há interferência significativa dos materiais utilizados com os tempos de retenção dos APIs e que os tempos de retenção dos picos na solução mistura (mix) dos diferentes APIs, correspondendo ao mesmo tempo de retenção dos picos presentes nas soluções preparadas com cada um dos APIs em separado.

Os resultados cumprem os critérios de aceitação, demonstrando que o método é específico.

Limite de Quantificação

De forma a comprovar que o método quantifica resíduos abaixo do valor de VMA determinado para cada API determinou-se o sinal-ruído, o RSD entre as três injeções e a recuperação. Os resultados estão na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Resultados das áreas de cada API com o resultado do RSD das injeções, resultado das taxas de recuperação e resultado do sinal-ruído. Tr= taxas de recuperação

	API 1				API 2			
	1ª Preparação		2ª Preparação		1ª Preparação		2ª Preparação	
	Área	EP s/n	Área	EP s/n	Área	EP s/n	Área	EP s/n
	12010	280	11887	278	24567	95	23945	101
	11993	277	11989	279	24529	101	24041	101
	11942	281	11904	274	24645	101	23771	101
RSD (%)	0,30	---	0,46	---	0,24	---	0,57	---
Recuperação	98,96	---	98,69	---	96,73	---	94,81	---
	API 3				API 4			
	1ª Preparação		2ª Preparação		1ª Preparação		2ª Preparação	
	Área	EP s/n	Área	EP s/n	Área	EP s/n	Área	EP s/n
	11578	21	12271	56	6962	52	6526	54
	10127	118	10019	40	6830	53	6601	50
	9405	42	14134	32	6881	54	6624	50
RSD (%)	10,67	---	16,97	---	0,97	---	0,78	---
Recuperação	111,82	---	120,56	---	92,63	---	91,20	---

Crítérios de aceitação:

EP s/n \geq 10%

RSD dos resultados \leq 30%, cálculo, segundo a fórmula 4.1.

Recuperações $100 \pm 30\%$, cálculo, segundo a fórmula 4.2.

Os resultados cumprem os critérios de aceitação, comprovando que o método analítico é capaz de quantificar abaixo do valor VMA determinado para cada API.

Exatidão e Repetibilidade

Para comprovar a exatidão e repetibilidade do método, utilizou-se seis níveis em triplicado. Os resultados para o API 1, API 2, API 3 e API 4 são mostrados na Tabela 4.3, Tabela 4.4, Tabela 4.5 e Tabela 4.6, respectivamente

Tabela 4.3- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 1

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD (%)
API 1	0,25ppm	81,73	11397	0,25	97,81	97,58	1,85
		79,93	11146	0,24	97,81		
		83,53	11564	0,25	97,11		
	1ppm	81,73	43948	0,96	94,29	95,86	2,07
		79,93	44365	0,97	97,33		
		83,53	45715	1,00	95,97		
	10ppm	81,73	455476	9,63	97,72	97,84	2,18
		79,93	446370	9,76	97,93		
		83,53	466233	10,20	97,88		
	20ppm	81,73	906072	19,82	97,20	97,44	1,47
		79,93	895993	19,60	98,28		
		83,53	922483	20,18	96,83		
	50ppm	81,73	2177160	47,62	93,42	96,27	2,95
		79,93	2243534	49,07	98,44		
		83,53	2309317	50,51	96,96		
	125ppm	81,73	5453004	119,28	93,60	96,82	3,52
		79,93	5620151	122,93	98,64		
		83,53	5848635	127,93	98,22		

Tabela 4.4- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 2

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD (%)
API 2	0,25ppm	82,04	26078	0,25	97,05	95,83	2,53
		80,44	25106	0,24	95,29		
		79,79	24866	0,24	95,15		
	1ppm	82,04	105016	1,00	97,71	97,09	1,94
		80,44	101730	0,97	96,53		
		79,79	101415	0,97	97,02		
	10ppm	82,04	1067854	10,18	99,35	99,00	1,73
		80,44	1033531	9,85	98,07		
		79,79	1040750	9,92	99,56		
	20ppm	82,04	2145583	20,45	99,81	99,07	2,06
		80,44	2079387	19,82	98,66		
		79,79	2064210	19,68	98,74		
	50ppm	82,04	5361241	51,10	99,76	99,75	1,96
		80,44	5207760	49,64	98,83		
		79,79	5166310	49,24	98,85		
	125ppm	82,04	12507878	119,22	93,10	93,56	0,95
		80,44	12292236	117,17	93,31		
		79,79	12318004	117,41	94,27		

Tabela 4.5- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 3

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD (%)
API 3	0,25ppm	79,91	8617	0,23	90,69	92,18	3,15
		81,51	9026	0,24	93,13		
		83,05	9156	0,24	92,72		
	1ppm	79,91	37895	1,00	99,71	99,72	1,75
		81,51	38849	1,03	100,21		
		83,05	39199	1,04	99,24		
	10ppm	79,91	374359	9,89	98,50	99,20	2,50
		81,51	385718	10,19	99,50		
		83,05	393481	10,40	99,62		
	20ppm	79,91	752515	19,88	99,00	99,12	1,80
		81,51	773844	20,44	99,81		
		83,05	778518	20,57	98,55		
	50ppm	79,91	1877696	49,61	98,81	99,11	1,96
		81,51	1936210	51,15	99,89		
		83,05	1948112	51,47	98,64		
	125ppm	79,91	4678479	123,60	98,48	99,34	2,61
		81,51	4832918	127,68	99,73		
		83,05	4927632	130,18	99,80		

Tabela 4.6- Resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade para o API 4

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm	Recuperação (%)	Média da Recuperação (%)	RSD (%)
API 4	0,25ppm	79,46	7063	0,23	93,55	92,30	1,08
		79,31	6918	0,23	91,80		
		79,95	6955	0,23	91,56		
	1ppm	79,46	28947	0,96	95,85	94,71	0,96
		79,31	28469	0,94	94,78		
		79,95	28411	0,94	93,50		
	10ppm	79,46	300253	9,93	99,42	99,43	1,16
		79,31	297493	9,83	98,70		
		79,95	304415	10,06	100,18		
	20ppm	79,46	607453	20,08	100,57	100,04	0,34
		79,31	604252	19,97	100,23		
		79,95	603619	19,95	99,33		
	50ppm	79,46	1532051	50,64	101,46	101,09	0,20
		79,31	1527186	50,48	101,33		
		79,95	1526371	50,45	100,47		
	125ppm	79,46	3846249	127,13	101,89	102,22	0,70
		79,31	3851017	127,29	102,21		
		79,95	3895027	128,75	102,55		

Crítérios de aceitação para a exatidão:

Para concentrações:

[LOQ; 5LOQ]; recuperação $100 \pm 30\%$, cálculo, segundo a fórmula 4.2.

[5LOQ; 10LOQ] recuperação $100 \pm 20\%$, cálculo, segundo a fórmula 4.2.

Superior a 10LOQ recuperação $100 \pm 10\%$, cálculo, segundo a fórmula 4.2.

Crítérios de aceitação para a repetibilidade:

RSD, cálculo feito segundo a fórmula 4.1.

[LOQ; 5LOQ] $\leq 30\%$

[5LOQ; 10LOQ] $\leq 20\%$

Superior a 10LOQ \leq 10%

Com os resultados obtidos, conclui-se que nos API 1, API 2 e API 3 as recuperações foram sempre inferiores a 100%. No API 3 nota-se que na concentração mais baixa houve uma menor taxa de recuperação e a um RSD mais elevado, isto deve-se à dificuldade acrescida por ser uma concentração mais baixa.

No API 4 as recuperações deram entre os 90% e 105%, ou seja, o API 4 tem tendência para valores superiores a 100%.

Os resultados cumprem os critérios de aceitação, o método é exato e repetível.

Linearidade

Dos resultados obtidos do ensaio da exatidão e repetibilidade fez-se também a linearidade.

A Figura 4.5 mostra a correlação linear entre a concentração do API 1 e a área do pico obtida no estudo de Linearidade.

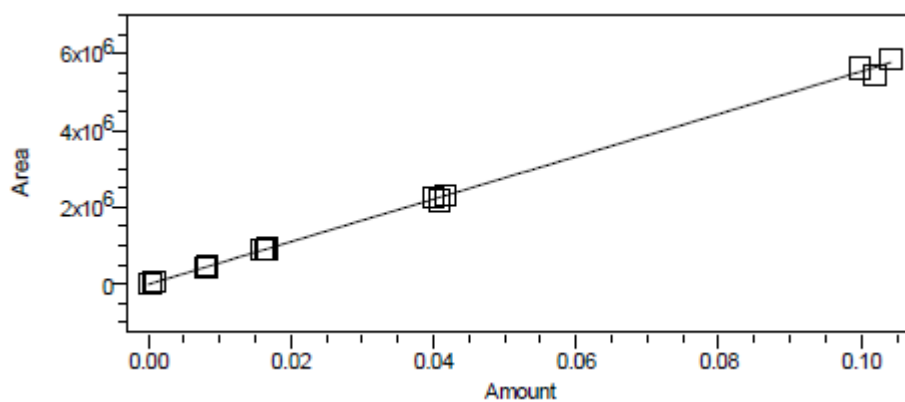


Figura 4.5- Regressão linear do API 1 da concentração vs área. R=1.000

A Figura 4.6 mostra a correlação linear entre a concentração do API 2 e a área do pico obtida no estudo de Linearidade.

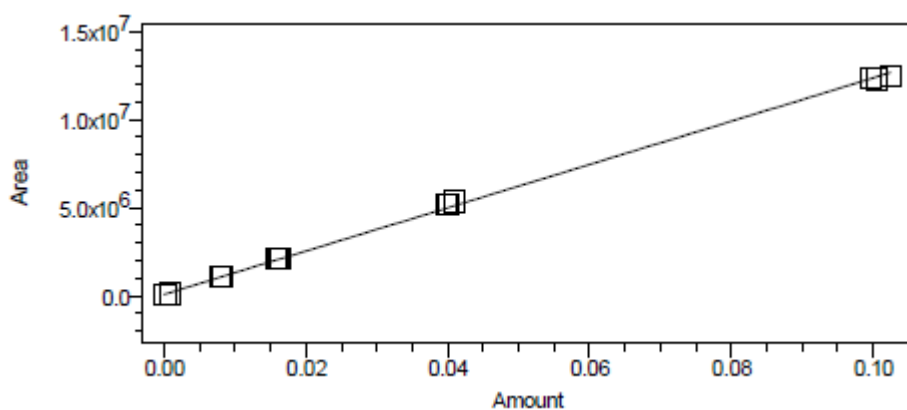


Figura 4.6- Regressão linear do API 2 da concentração vs área. R=1.000

A Figura 4.7 mostra a correlação linear entre a concentração do API 3 e a área do pico obtida no estudo de Linearidade.

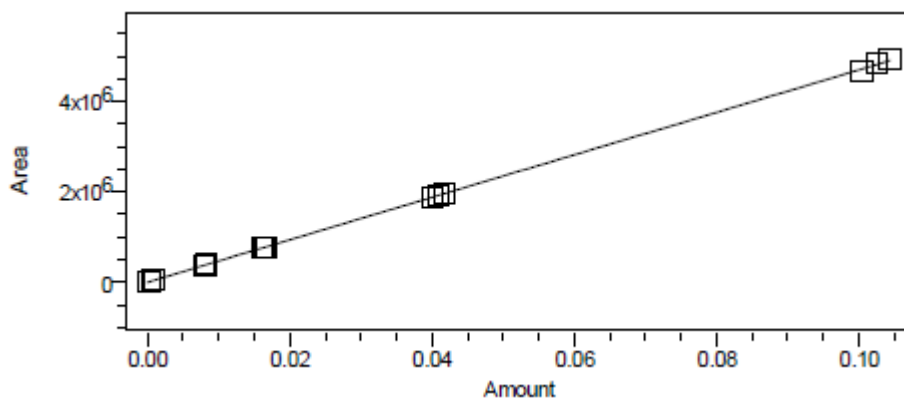


Figura 4.7- Regressão linear do API 3 da concentração vs área. R=1.000

A Figura 4.8 mostra a correlação linear entre a concentração do API 4 e a área do pico obtida no estudo de Linearidade.

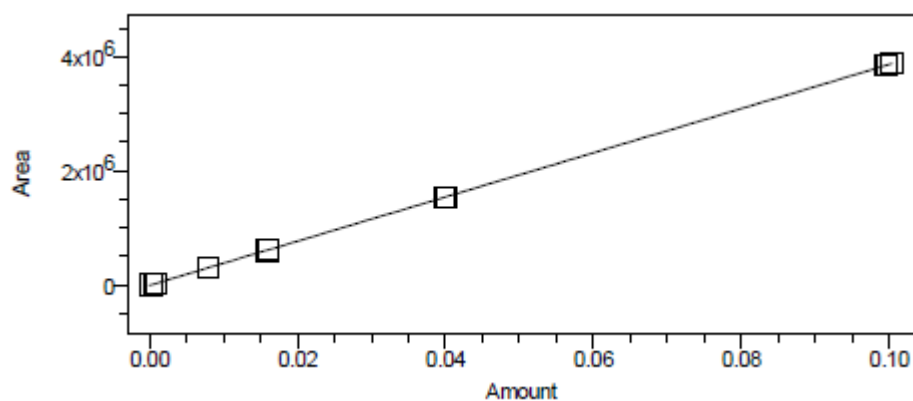


Figura 4.8- Regressão linear do API 4 da concentração vs área. R=1.000

Critério de aceitação para a linearidade:

$$r \geq 0,995$$

Os resultados obtidos da linearidade em todos os APIs cumprem o critério de aceitação. O método é linear.

Precisão do sistema

De forma a comprovar a precisão do sistema, analisou-se variabilidade dos resultados de uma solução a 10ppm (Tabela 4.7).

Tabela 4.7- Resultados do ensaio da precisão do sistema com a solução de 10ppm.

	API 1	API 2	API 3	API 4
Área	493700	1021228	401483	308758
	492872	1019598	398840	308141
	491902	1017748	398282	307657
	491213	1016161	397506	306991
	494379	1022638	399687	309246
	495772	1023669	400191	310255
RSD (%)	0,34	0,28	0,36	0,38

Critério de aceitação:

RSD \leq 10%

O RSD entre as seis injeções em todos os APIs é inferior a 10%, conclui-se que o método é preciso.

Precisão intermédia

Uma segunda analista em dias diferentes, preparou nova fase móvel e soluções e analisou em triplicado as soluções a 0,25 ppm, 10 ppm e 125 ppm. Os resultados encontram-se na Tabela 4.8 e Tabela 4.9.

Tabela 4.8- Resultados obtidos pela segunda analista para o ensaio da precisão intermédia e resultado da diferença entre analistas.

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm [] ppm	Média	% Diferença
API 1	0,25 ppm	19,74	11021	0,22	0,22	0,03
		19,37	11099	0,22		
		19,12	10770	0,21		
	10 ppm	19,74	437813	8,75	8,55	1,43
		19,37	438814	8,60		
		19,12	428511	8,29		
	125 ppm	19,74	2194305	43,84	43,03	6,04
		19,37	2208781	43,31		
		19,12	2167870	41,95		
API 2	0,25 ppm	19,36	25132	0,23	0,26	0,02
		20,25	26788	0,26		
		21,56	28669	0,29		
	10 ppm	19,36	1037231	9,54	10,65	0,66
		20,25	1097689	10,56		
		21,56	1156709	11,83		
	125 ppm	19,36	5202637	47,87	53,61	3,62
		20,25	5527960	53,20		
		21,56	5832713	59,77		

Tabela 4.9- Resultados obtidos pela segunda analista para o ensaio da precisão intermédia e resultado da diferença entre analistas (continuação).

Substâncias ativas	Soluções	Massa (mg)	Áreas	Resultado vs STD 10ppm [] ppm	Média	% Diferença
API 3	0,25 ppm	18,53	8887	0,23	0,24	0,01
		18,93	9299	0,25		
		18,78	9532	0,25		
	10 ppm	18,53	345697	8,98	9,19	0,97
		18,93	353991	9,39		
		18,78	349588	9,20		
	125 ppm	18,53	1729186	44,90	46,07	4,67
		18,93	1777776	47,15		
		18,78	1754350	46,16		
API 4	0,25 ppm	18,94	6231	0,19	0,20	0,03
		20,06	6133	0,20		
		19,27	6440	0,20		
	10 ppm	18,94	293352	9,16	9,64	0,30
		20,06	311131	10,29		
		19,27	298314	9,48		
	125 ppm	18,94	1497616	46,76	49,49	1,04
		20,06	1600871	52,94		
		19,27	1535285	48,77		

Crítérios de aceitação:

% Diferença contra o ensaio da repetibilidade (formula 4.5):

[LOQ; 5LOQ] ≤ 30%

[5LOQ; 10LOQ] ≤ 20%

Superior a 10LOQ ≤ 10%

A diferença dos resultados com o ensaio da repetibilidade foi conforme as especificações, o método é preciso.

Teste Limite

Este ensaio foi efetuado de modo que posteriormente em trabalho de rotina possa ser utilizado uma solução de LOQ como limite. Isto é, todas as amostras que forem analisadas e apresentarem uma resposta inferior a LOQ têm uma concentração de analito abaixo deste e assim não é necessário quantificar essas amostras.

O resultado do desvio padrão de cada API está na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- Resultado do desvio padrão de cada um dos API

	API 1	API 2	API 3	API 4	
	Área	Área	Área	Área	
	13713	28929	13829	7021	
	10402	22994	11155	6090	
	11483	23789	12505	6617	
	11866	24334	12813	6448	
	9338	20358	7754	6139	
	11396	25974	9213	6701	
Média	11366	24396	11212	6503	
sd	1470,72	2887,27	2325,54	354,01	
rsd[%]	12,94	11,83	20,74	5,44	RSD ≤ 30%

Os resultados do LOQexperimental e o LOQ aceite estão na Tabela 4.11 e Tabela 4.12.

Tabela 4.11- Resultados para o teste limite.

		Branco sem <i>swabs</i>			Branco com <i>Swabs</i>		
		1	2	3	1	2	3
API 1	Área	1175	1130	1130	1058	1121	1238
	Média	1145			1139		
	SD	26			91		
	LOB	1188			1289		
	LOQaceite	1230			1440		
	LOQexperimental	3607			3709		
		Branco sem <i>swabs</i>			Branco com <i>Swabs</i>		
		1	2	3	1	2	3
API 2	Área	69293	69623	68792	68221	68613	69857
	Média	69293			68897		
	SD	441			854		
	LOB	70019			70302		
	LOQaceite	70745			71707		
	LOQexperimental	74769			75052		

Tabela 4.12- Resultados para o teste limite (continuação).

		Branco sem <i>swabs</i>			Branco com <i>Swabs</i>		
		1	2	3	1	2	3
API 3	Área	107974	108320	107248	107733	107885	110105
	Média	107847			108574		
	SD	547			1328		
	LOB	108747			110759		
	LOQaceite	109647			112943		
	LOQexperimental	112573			114584		
		Branco sem <i>swabs</i>			Branco com <i>Swabs</i>		
		1	2	3	1	2	3
API 4	Área	21628	21592	21488	21448	21366	21757
	Média	21569			21524		
	SD	73			206		
	LOB	21689			21863		
	LOQaceite	21809			22202		
	LOQexperimental	22271			22445		

Critérios de aceitação:

LOQ Sinal experimental \geq LOQ aceite

Entre as 6 preparações: RSD \leq 30%

O cálculo do LOB e LOQ foram feitos segundo as fórmulas 2.14 e 2.15, respetivamente.

Em todas as substâncias ativas o LOQexperimental é superior ao LOQaceite. O critério de aceitação é cumprido.

Estabilidade

Para comprovar a estabilidade dos padrões, utilizou-se as soluções preparadas no ensaio de exatidão de 0,25ppm, 10ppm e 125ppm, que foram armazenadas nas seguintes condições: bancada (temperatura ambiente), frigorífico (entre 7°C a 9°C) e na ausência de luz (temperatura ambiente).

Utilizou-se como tempo zero (T0) os resultados obtidos no ensaio de exatidão.

Na Tabela 4.13, Tabela 4.14, Tabela 4.15 e Tabela 4.16, estão os resultados dos desvios dos resultados obtidos aos resultados iniciais.

Tabela 4.13- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0,25 ppm, 10 ppm e 125 ppm, para 4 dias e 6 dias após preparação.

T4							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,99	0,54	0,78	0,25 ppm	1,08	0,31	0,02
10 ppm	0,16	0,01	0,08	10 ppm	0,11	0,19	0,13
125 ppm	0,34	0,24	0,17	125 ppm	0,22	0,61	0,52
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	5,29	0,82	0,18	0,25 ppm	5,29	4,25	1,68
10 ppm	0,40	0,06	0,44	10 ppm	0,41	0,09	0,44
125 ppm	0,13	0,10	0,09	125 ppm	0,12	0,44	0,40
T6							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,61	0,69	0,07	0,25 ppm	0,34	1,13	0,65
10 ppm	0,23	0,20	0,03	10 ppm	0,06	0,11	0,02
125 ppm	0,60	0,08	0,17	125 ppm	0,17	0,37	0,48
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	5,40	0,94	0,06	0,25 ppm	0,53	3,94	0,98
10 ppm	0,33	0,13	0,12	10 ppm	0,07	0,47	0,03
125 ppm	0,25	0,23	0,05	125 ppm	0,52	0,20	0,14

Tabela 4.14- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0,25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação) , para 7 dias e 14 dias após preparação.

T7							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,58	0,19	0,64	0,25 ppm	0,90	0,70	0,73
10 ppm	0,23	0,20	0,03	10 ppm	0,23	0,35	0,03
125 ppm	0,60	0,08	0,17	125 ppm	0,32	0,13	0,05
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,89	0,06	0,37	0,25 ppm	3,78	0,93	0,27
10 ppm	0,89	0,74	0,12	10 ppm	0,05	0,48	0,35
125 ppm	0,59	0,18	0,02	125 ppm	0,51	0,12	0,02
T14							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	3,05	7,86	3,49	0,25 ppm	0,70	1,01	2,01
10 ppm	1,91	1,98	1,80	10 ppm	0,44	0,74	0,34
125 ppm	2,42	1,52	1,81	125 ppm	0,48	1,12	0,98
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	1,07	3,76	1,12	0,25 ppm	8,12	4,47	3,10
10 ppm	0,26	0,23	0,35	10 ppm	0,03	0,79	0,40
125 ppm	0,02	0,47	0,91	125 ppm	0,65	0,32	0,04

Tabela 4.15- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação) , para 20 dias e 26 dias após preparação.

T20							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	4,59	4,33	4,34	0,25 ppm	2,51	2,83	0,70
10 ppm	1,93	1,73	1,64	10 ppm	0,74	0,68	0,50
125 ppm	2,03	1,19	0,53	125 ppm	0,50	0,92	2,15
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	1,74	0,20	0,14	0,25 ppm	3,40	3,39	8,12
10 ppm	0,04	0,18	0,48	10 ppm	0,26	0,47	0,27
125 ppm	0,22	0,17	2,07	125 ppm	0,19	0,63	2,37
T26							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	1,03	5,04	5,24	0,25 ppm	3,33	0,51	0,58
10 ppm	2,37	2,09	0,25	10 ppm	1,92	1,79	0,50
125 ppm	2,25	1,56	1,22	125 ppm	1,01	0,64	0,57
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	1,26	3,80	3,54	0,25 ppm	4,97	9,86	8,08
10 ppm	1,37	0,84	1,58	10 ppm	0,49	1,22	2,03
125 ppm	1,29	0,90	0,53	125 ppm	0,71	0,11	0,29

Tabela 4.16- Resultados do ensaio da estabilidade para dos padrões a 0.25ppm, 10ppm e 125ppm (continuação) , para 30 dias após preparação.

T30							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	4,37	3,47	4,08	0,25 ppm	12,79	2,15	2,17
10 ppm	1,62	1,18	1,49	10 ppm	2,44	2,00	2,18
125 ppm	1,93	0,94	1,19	125 ppm	2,16	1,39	1,90
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,42	0,84	4,04	0,25 ppm	4,05	0,96	0,84
10 ppm	1,66	0,98	1,38	10 ppm	0,85	1,19	0,73
125 ppm	2,15	1,51	1,47	125 ppm	1,16	0,24	0,52

Crítérios de aceitação:

Os resultados não se devem desviar mais do que:

[LOQ; 5LOQ] ≤ 30%

[5LOQ; 10LOQ] ≤ 20%

Superior a 10LOQ ≤ 10%

Dos valores obtidos inicialmente, segundo a fórmula 4.6.

Com os resultados obtidos concluiu-se que as soluções padrões são válidas durante 30 dias. Não se continuou o ensaio de estabilidade das soluções padrão por questões técnicas que aconteceram ao equipamento de HPLC.

Para comprovar a estabilidade das amostras, preparou-se soluções 0.25ppm, 10ppm e 125ppm e inoculou-se três swabs em 10mL de cada solução. E foram armazenadas nas seguintes condições: bancada (temperatura ambiente), frigorífico (entre 7°C a 9°C) e na ausência de luz (temperatura ambiente). Na Tabela 4.17, Tabela 4.18 e Tabela 4.19, estão os resultados dos desvios dos resultados obtidos aos resultados iniciais.

Tabela 4.17- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação, para 1 dia e 2 dias após preparação.

T1							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,86	0,42	1,30	0,25 ppm	2,03	1,03	0,90
10 ppm	1,63	0,13	0,27	10 ppm	0,96	0,67	1,12
125 ppm	0,78	0,03	0,24	125 ppm	0,05	0,61	2,74
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	2,02	1,77	2,68	0,25 ppm	1,71	0,82	6,11
10 ppm	1,40	0,39	0,79	10 ppm	1,75	0,12	0,44
125 ppm	0,81	0,26	1,16	125 ppm	0,73	0,23	5,26
T2							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	11,20	10,67	10,46	0,25 ppm	0,32	1,38	0,80
10 ppm	9,71	10,06	9,79	10 ppm	0,16	1,36	0,07
125 ppm	10,64	9,73	10,19	125 ppm	0,97	0,99	4,32
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,31	1,74	1,56	0,25 ppm	14,38	3,37	13,72
10 ppm	0,20	0,17	0,07	10 ppm	0,64	4,73	0,58
125 ppm	0,92	0,09	1,52	125 ppm	1,06	0,25	4,91

Tabela 4.18- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação (continuação) , para 3 dias e 4 dias após preparação.

T3							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,48	1,09	0,43	0,25 ppm	0,93	0,54	0,99
10 ppm	3,01	0,50	0,24	10 ppm	2,26	0,53	0,36
125 ppm	0,42	0,12	4,73	125 ppm	0,55	1,02	2,79
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	5,15	7,45	5,76	0,25 ppm	13,77	5,21	21,52
10 ppm	3,88	0,74	1,56	10 ppm	3,02	0,55	1,53
125 ppm	1,44	1,28	2,14	125 ppm	0,78	0,66	4,26
T4							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	10,04	0,71	1,33	0,25 ppm	15,64	1,23	2,23
10 ppm	4,19	0,57	0,40	10 ppm	4,58	0,25	1,35
125 ppm	0,55	0,17	4,40	125 ppm	1,63	1,31	2,34
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,44	6,93	0,36	0,25 ppm	17,42	14,24	30,68
10 ppm	5,46	0,66	2,00	10 ppm	4,26	0,43	1,61
125 ppm	1,71	1,31	2,21	125 ppm	1,31	0,37	4,45

Tabela 4.19- Resultados para o ensaio de estabilidade para as amostras com swabs. Valores que estejam a negrito significam que estão fora de especificação (continuação).

T6							
[API]	API 1			[API]	API 2		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	8,38	5,18	8,68	0,25 ppm	0,32	1,38	0,80
10 ppm	10,63	9,53	10,69	10 ppm	0,16	1,36	0,07
125 ppm	9,55	12,08	8,49	125 ppm	0,97	0,99	4,32
[API]	API 3			[API]	API 4		
	Bancada	Frigorífico	Ausência da luz		Bancada	Frigorífico	Ausência da luz
0,25 ppm	0,01	1,85	9,34	0,25 ppm	36,58	9,01	35,74
10 ppm	0,64	0,67	0,60	10 ppm	0,03	0,91	0,21
125 ppm	0,96	1,73	1,19	125 ppm	0,88	2,00	3,05

Nos resultados obtidos as amostras do API 1 do segundo dia armazenadas na bancada, falharam o critério e no terceiro e quarto dia cumpriram os critérios. Como as amostras falharam no segundo dia, o ideal era ter repetido a análise para comprovar os resultados. Desta forma, as amostras do API 1 são válidas durante 24h.

As amostras do API 2 e API 3 até ao sexto dia passaram sempre nos critérios de aceitação, sendo válidas durante seis dias.

As amostras do API 4 ao quarto dia falharam os critérios de aceitação, sendo válidas até 72h.

Após os resultados obtidos, na Tabela 4.20 encontram-se um resumo de estabilidade das soluções padrão e na Tabela 4.21 um resumo de estabilidade das soluções amostras bem como as condições mais indicadas para armazenar.

Tabela 4.20- Tabela resumo da estabilidade das soluções padrão

Concentração / ppm	Estabilidade das amostras			
	API 1	API 2	API 3	API4
0,25	30 dias / frio	30 dias / frio	30 dias / bancada	30 dias / escuro
10	30 dias / escuro	30 dias / escuro	30 dias / frio	30 dias / bancada
125	30 dias / frio	30 dias / bancada	30 dias / escuro	30 dias / frio

Tabela 4.21- Tabela resumo da estabilidade das soluções amostra

Concentração / ppm	Estabilidade das amostras			
	API 1	API 2	API 3	API4
0,25	24h/ frio	144h/ frio	144h/ frio	72h/ frio
10				
125				

4.1.3 Apresentação e Discussão de Resultados do Método Analítico com taxas de recuperação

O método analítico está validado para os quatro APIs em estudo. Neste ponto foi feito o estudo das taxas de recuperação porque uma vez que o método já estava validado se algum resultado obtido não fosse o esperado, o método não estaria em causa, mas em vez disso a forma/ maneira de fazer as taxas de recuperação.

Os critérios de aceitação são:

VMA x taxa de recuperação \geq LOQ experimental

RSD entre as 3 replicados > 30%

As taxas de recuperação foram feitas para cada um dos APIs. Contudo, houve uma fase de estudo que apenas foi feita para o API 2.

API 1

O LOQ experimental foi calculado anteriormente no ensaio de exatidão e repetibilidade (Resultado vs pd 10 ppm), sendo de 0,25 ppm.

Na Tabela 4.22 estão apresentados os resultados do API 1.

Tabela 4.22- Resultados das taxas de recuperação do API 1

	API 1- Solução inicial de 2500 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	2,00	5,25	0,30	3,43	3,65
Tx de Recuperação	89,79	82,86	91,23	86,16	93,61
VMA x Taxa	7,71	7,12	7,84	7,40	8,04
	API 1- Solução inicial de 10ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	9,34	11,48	6,28	12,24	1,27
Tx de Recuperação	76,83	79,43	91,16	90,72	88,71
VMA x Taxa	6,60	6,82	7,83	7,79	7,62

Os resultados para a API 1 cumprem os critérios de aceitação. Obteve-se taxas de recuperação superiores a 70%, pelo que o valor de VMA não será corrigido.

API 2

O LOQ experimental foi calculado anteriormente no ensaio de exatidão e repetibilidade (Resultado *vs* pd 10 ppm), sendo de 0,24 ppm.

Na Tabela 4.23 estão apresentados os resultados do API 2.

Tabela 4.23- Resultados das taxas de recuperação do API 2

	API 2- Solução inicial de 2500 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	5,02	1,80	1,82	1,20	0,38
Taxa de Recuperação	61,80	75,09	77,24	79,49	79,31
VMA x Taxa	0,80	0,97	1,00	1,03	1,02
	API 2- Solução inicial de 10ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	10,62	19,90	12,69	1,26	12,32
Taxa de Recuperação	23,74	36,56	56,62	75,49	60,21
VMA x Taxa	0,31	0,47	0,73	0,97	0,78

Os resultados para o API 2 cumprem os critérios de aceitação. As taxas de recuperação para o acrílico e alumínio foram inferiores a 50% para a concentração inicial 10ppm. É de notar que em ambos os materiais, ocorreu um espalhamento acentuado aquando da aplicação.

Foi efetuado um ensaio em que se usou uma solução com concentração mais elevada, de 50 ppm e aplicou-se 0,1 mL. Os resultados estão na Tabela 4.24.

Tabela 4.24- Resultados do API 2 para o acrílico e alumínio com uma solução inicial de 50 ppm.

	API 2- Solução inicial de 50 ppm	
	Acrílico	Alumínio
RSD das 3 injeções	6,24	8,81
Taxa de Recuperação	68,60	56,85
VMA x Taxa	0,89	0,73

Com os resultados obtidos conclui-se que o modo de aplicação tem influência nos resultados. De forma, a tentar melhorar os resultados obtidos manteve-se o modo de aplicação e alterou-se o método de recuperação para 2 swabs inoculados com etanol e um *swab* seco. Os resultados encontram-se na Tabela 4.25.

Tabela 4.25- Resultados do API 2 para o acrílico e alumínio com uma solução inicial de 50 ppm. E com 2 *swabs* humedecidos e um seco.

	API 2- Solução inicial de 50 ppm 2 <i>Swabs</i> humedecidos + 1 <i>swab</i> seco	
	Acrílico	Alumínio
RSD das 3 injeções	6,79	7,75
Taxa de Recuperação	53,21	64,34
VMA x Taxa	0,7	0,8

Com os resultados obtidos conclui-se que a forma como é feita a recuperação não tem um impacto significativo.

Concluindo que a forma de aplicação tem impacto repetiu-se o ensaio para o API 2, com o modo de aplicação com uma concentração cinco vezes mais concentrada e aplica-se 0,1 mL, para o acrílico, alumínio, inox e silicone visto que apresentavam valores inferiores a 70%.

Os resultados obtidos estão na Tabela 4.26.

Tabela 4.26- Resultados finais do API 2 para o acrílico, alumínio, inox e silicone.

API 2- Solução inicial de 12500 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	4,11	2,02	5,35	1,50
Taxa de Recuperação	71,96	74,28	81,29	79,40
VMA x Taxa	0,94	0,96	1,05	1,02
API 2- Solução inicial de 50 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	11,61	30,38	2,34	1,08
Taxa de Recuperação	56,92	56,63	76,68	72,54
VMA x Taxa	0,73	0,73	0,99	0,94

API 3

O LOQ experimental foi calculado anteriormente no ensaio de exatidão e repetibilidade (Resultado vs pd 10 ppm), sendo de 0,24 ppm.

Na Tabela 4.27 estão apresentados os resultados do API 3.

Tabela 4.27- Resultados obtidos do ensaio de taxas de recuperação para o API 3.

API 3- Solução inicial de 2500 ppm					
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	8,58	2,69	15,18	2,56	8,21
Taxa de Recuperação	73,50	83,88	81,51	79,62	67,01
VMA x Taxa	16,81	19,18	18,64	18,21	15,33
API 3- Solução inicial de 10 ppm					
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	37,08	31,57	2,74	3,03	21,24
Taxa de Recuperação	37,71	52,52	57,63	86,93	21,27
VMA x Taxa	8,6	12,01	13,18	19,88	4,87

Os resultados para a API 3 para o acrílico e alumínio na concentração inicial de 10 ppm não cumprem o critério de aceitação do RSD das 3 injeções. E para o Inox e Silicone a taxa de recuperação foi inferior a 70%. Após as experiências realizadas com o API 2, repetiu-se o ensaio

com o modo de aplicação com uma concentração cinco vezes mais concentrada e aplicou-se 0.1mL. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.28.

Tabela 4.28- Resultados obtidos das recuperações da API 3 para o acrílico, alumínio, inox e silicone. Com aplicação de uma solução inicial cinco vezes mais concentrada e aplicação de 0,1mL.

API 3 - Solução inicial de 12500 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	2,33	3,60	4,67	7,56
Taxa de Recuperação	76,84	79,20	88,46	86,41
VMA x Taxa	17,57	18,11	20,23	19,76
API 3- Solução inicial de 50 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	4,47	14,80	4,15	1,56
Taxa de Recuperação	42,06	38,12	83,70	65,93
VMA x Taxa	9,62	8,72	19,14	15,08

Apesar da nova forma de aplicação no acrílico e alumínio para uma solução inicial de 50 ppm os valores continuam a ser inferiores a 70%, contudo houve uma melhoria na replicação da recuperação. Isto deve-se ao fato do espalhamento não ter sido tão acentuado como anteriormente. No silicone e Inox verificou-se também uma melhoria de resultados.

API 4

O LOQ experimental foi calculado anteriormente no ensaio de exatidão e repetibilidade (Resultado *vs* STD 10 ppm), sendo de 0,23 ppm.

Na Tabela 4.29 estão apresentados os resultados para o API 4.

Tabela 4.29- Resultados obtidos das recuperações do API 4.

API 4- Solução inicial de 2500 ppm					
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	15,04	3,58	8,29	3,85	2,53
Taxa de Recuperação	46,65	75,25	58,73	74,75	69,02
VMA x Taxa	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3
API 4- Solução inicial de 10 ppm					
	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
RSD das 3 injeções	33,39	21,77	3,96	2,93	6,88
Taxa de Recuperação	19,37	56,28	78,01	84,69	54,01
VMA x Taxa	0,1	0,3	0,4	0,4	0,3

Os resultados para o API 4 para o acrílico na concentração inicial de 10 ppm não cumpre o critério de aceitação do RSD das 3 injeções e VMA x Taxa é inferior ao LOQ. Após as experiências realizadas com o API 2, repetiu-se o ensaio com o modo de aplicação com uma concentração cinco vezes mais concentrada e aplica-se 0,1mL. Como a taxa de recuperação para o silicone foi inferior a 70% e como se repetiu para os outros 2 APIs para o Inox com a nova forma de aplicação, repetiu-se também para o Inox e Silicone. Os resultados estão apresentados na

Tabela 4.30.

Tabela 4.30- Resultados obtidos das recuperações do API 4 para o silicone. Com aplicação de uma solução inicial cinco vezes mais concentrada e aplicação de 0,1 mL.

API 4- Solução inicial de 12500 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	14,12	5,72	8,29	5,20
Taxa de Recuperação	81,57	87,74	102,81	105,33
VMA x Taxa	0,39	0,42	0,49	0,51
API 4- Solução inicial de 50 ppm				
	Acrílico	Alumínio	Inox	Silicone
RSD das 3 injeções	2,34	2,72	11,27	23,62
Taxa de Recuperação	78,97	82,67	83,47	100,50
VMA x Taxa	0,38	0,40	0,40	0,48

Com a nova aplicação houve um aumento das taxas de recuperação. No caso do silicone em ambas as concentrações os resultados obtidos foram superiores a 100%, contudo este valor é aceitável uma vez que no ensaio de exatidão obteve-se valores também superiores a 100%.

Discussão dos resultados das taxas de recuperação para os quatro APIs

Através deste método conseguiu-se verificar que existe impacto na forma como a aplicação é feita.

Para a API 2, API 3 e API 4 repetiu-se o trabalho utilizando com uma concentração cinco vezes mais concentrada e aplicou-se 0,1mL. Concluindo-se que houve melhoria nas taxas de recuperação. Não se repetiu para o material Teflon porque as taxas inicialmente obtidos foram superiores a 70% e a repetição iria melhorar os resultados, uma vez que não se repetiu ficamos a trabalhar com o "pior caso".

Para o API 1 não se repetiu com o modo de aplicação desenvolvido pela mesma razão dada anteriormente, isso é se repetíssemos estaríamos a melhorar os resultados assim ficamos com o resultado de "pior caso".

4.2 Correção dos VMAs

Após a validação do método analítico com as taxas de recuperação é necessário fazer a correção para os VMA. O parâmetro que a empresa tem é que resultados de taxas de recuperação superiores a 70% não se efetuam correções.

Assim, na Tabela 4.31 estão apresentados para cada API e para cada material o valor de taxa mais baixo de recuperação entre as duas concentrações.

Tabela 4.31- Valor mais baixo obtido da taxa de recuperação para cada API e para cada material

	Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
API 1	76,83	79,43	91,16	86,16	88,71
API 2	56,92	56,63	76,68	75,49	72,54
API 3	42,06	38,12	83,70	79,62	65,93
API 4	78,97	82,67	83,47	74,75	100,50

Assim, para o API 1 e API 4 o VMA não terá de ser corrigido. Para o API 2 e para o API 3 terá se corrigir para o acrílico e alumínio. E ainda para o API 3 é necessário fazer para o silicone.

Para a correção utilizou-se a seguinte formula 4.9. Na Tabela 4.32 estão os valores de VMA corrigidos.

$$VMA_c = \frac{VMA \times Taxa}{100} \quad (4.9)$$

Sendo,

VMA_c- valor de VMA corrigido, em ppm

Taxa- Taxa de recuperação, em percentagem

Tabela 4.32- Valores de VMA corrigidos com as taxas de recuperação

		Acrílico	Alumínio	Inox	Teflon	Silicone
VMA (ppm)	API 1	8,59	8,59	8,59	8,59	8,59
	API 2	0,73	0,73	1,29	1,29	1,29
	API 3	9,6	8,72	22,87	22,87	15,08
	API 4	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48

Verifica-se que nenhum dos valores de VMA é inferior a 0,25ppm (LOQ), pelo que o método analítico validado é válido para os quatro APIs.

CONCLUSÃO

A validação de um método analítico para a determinação de APIs revela-se de elevada importância devido à necessidade de controlar as contaminações que possam ocorrer no processo de fabrico de medicamentos. Normalmente, a validação do método analítico é realizada para um API de cada vez, mas neste trabalho foi feito a validação para quatro APIs em simultâneo. Desta forma, a empresa pretende estar um passo à frente para quando houver maior capacidade de produção na fábrica, permitindo dar uma resposta mais rápida se houver produção em simultâneo destes quatro APIs.

Em relação à validação do método analítico, face aos resultados obtidos, é possível concluir que o método de determinação de resíduos dos quatro APIs em estudo por HPLC é adequado e fiável. Validado o método analítico, passou-se para as taxas de recuperação.

Usualmente a validação do método analítico incluiu as taxas de recuperação, contudo decidiu-se fazer faseadamente de forma que se algum resultado obtido não fosse o esperado, o método não estaria em causa, mas em vez disso a forma/ maneira de fazer as taxas de recuperação.

O ensaio das taxas de recuperação foi realizado em cinco materiais diferentes (acrílico, alumínio, inox, teflon, silicone), apesar de alguns materiais não fazerem parte da constituição das máquinas onde os APIs passam, mas são todos os materiais que existem nas máquinas de produção de forma geral. Assim, caso haja uma alteração nas máquinas de produção o método já se encontra validado para a maioria dos materiais.

Os maiores desafios que ocorreram durante a validação do método foram os ensaios das taxas de recuperação. Houve necessidade de fazer estudos de aplicação de soluções e *swabing*, concluindo-se que a forma de aplicação era importante principalmente nos materiais alumínio e acrílico, porque verificava-se um maior espalhamento da solução de aplicação. A forma

swabing com a nova forma de aplicação acabou por não produzir os efeitos de melhoria desejados, pelo que se manteve a forma de *swabing* inicial (três *swabs* húmidos em solvente).

Mesmo com a nova forma de aplicação foram obtidas taxas de recuperação inferiores a 70%, pelo que foi necessário fazer correções ao nível de VMA.

TRABALHOS FUTUROS

Após a realização desta dissertação, ficam alguns pontos por concluir e a realizar no futuro:

- Desenvolver um método de recuperação que seja mais adequado, de forma que as taxas de recuperação sejam superiores a 70%.
- Para que a validação de limpeza fique terminada é necessário validar a limpeza dos equipamentos da produção iniciando o processo com a elaboração de um protocolo e um plano de amostragem. Posteriormente recolher as amostras, analisar e tratar os resultados.
- De forma a avaliar a eficácia do procedimento de limpeza dos equipamentos terá que ser realizada uma validação, que pressupõe a realização de três ações de verificação analítica bem-sucedidas, para se considerar o equipamento validado face ao procedimento de limpeza aplicado.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Grupo Iberfar, "Grupo Iberfar - Grupo Iberfar," 2016. [Online]. Available: <http://grupoiberfar.pt/>. [Accessed: 20-Sep-2021].
- [2] Ferraz Lynce, "HISTORIA _ Ferraz Lynce," 2021. [Online]. Available: <https://www.ferrazlynce.pt/historia>. [Accessed: 20-Sep-2021].
- [3] Iberfar, "História _ Iberfar," 2015. [Online]. Available: <http://www.iberfar.pt/pt/historia>. [Accessed: 20-Sep-2021].
- [4] Iberfar, "Controlo da Qualidade_Iberfar," 2015. [Online]. Available: <http://www.iberfar.pt/pt/controlo-da-qualidade>. [Accessed: 08-Apr-2022].
- [5] Iberfar, "Sobre_Iberfar," 2015. [Online]. Available: <http://www.iberfar.pt/pt/sobre>. [Accessed: 08-Apr-2022].
- [6] IBERFAR, "Referência Interna."
- [7] Infarmed, "Medicamentos de uso humano - INFARMED, I," 2016. [Online]. Available: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano. [Accessed: 27-Sep-2021].
- [8] FDA, "Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations _ FDA," 2020. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [9] Infarmed, "Infarmed - INFARMED, I," 2020. [Online]. Available: <https://www.infarmed.pt/>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [10] DGAV, "Missão – DGAV," 2021. [Online]. Available: <https://www.dgav.pt/quemsomos/conteudo/missao/>.
- [11] Infarmed, "Procedimentos de AIM - INFARMED, I," 2016. [Online]. Available: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/procedimentos_de_aim. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [12] UE, "EMA." [Online]. Available: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/ema_pt. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [13] FDA, "Validation of Cleaning Processes (7_93) _ FDA," 2014. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/validation-cleaning-processes-793>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [14] H. Systems, "European commission," *Eudralex*, vol. 4, no. January 2013, pp. 1–8, 2012.
- [15] "EudraLex - EU Legislation _ Saúde pública," 2015. [Online]. Available: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex_pt. [Accessed: 12-Nov-2021].
- [16] K. O. Donnell *et al.*, "Quality Risk Management : Putting GMP Controls First Quality Risk

- Management : Putting GMP Controls First," *Pharm. Sci. Technol.*, vol. 66, no. 3, pp. 243–261, 2012.
- [17] "Conselho Internacional sobre Harmonização - EUPATI Toolbox." [Online]. Available: <https://toolbox.eupati.eu/glossary/conselho-internacional-sobre-harmonizacao/?lang=pt-pt>. [Accessed: 20-Nov-2021].
- [18] J. M. Medina, "Applying a Quality Risk Management Approach to a Cleaning Validation System," Polytechnic University of Puerto Rico, 2014.
- [19] Webmaster and AIAG, "(FMEA) Failure Mode & Effects Analysis | AIAG." [Online]. Available: https://www.aiag.org/quality/automotive-core-tools/fmea?utm_term=fmea%20analysis&utm_campaign=FMEA+Online+E-Learning+-+Search+-+US+-+2020&utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_acc=9114201098&hsa_cam=9818883107&hsa_grp=103093566474&hsa_ad=430480139883&hsa_sr. [Accessed: 08-Apr-2022].
- [20] C. Bicouv, L. Pereira, and L. Giorgetti, "APLICAÇÃO DA FERRAMENTA FMEA PARA ANÁLISE DE NOTIFICAÇÕES DE QUEIXAS TÉCNICAS DE MEDICAMENTOS SÓLIDOS NO CONTEXTO DE QUALITY BY DESIGN," *Brazilian J. Nat. Sci.*, vol. 3, pp. 321–334, 2020.
- [21] Y. Wang, G. Cheng, H. Hu, and W. Wu, "Development of a risk-based maintenance strategy using FMEA for a continuous catalytic reforming plant," *J. Loss Prev. Process Ind.*, vol. 25, no. 6, pp. 958–965, 2012.
- [22] E. V. T. N. Sukhanova, Наталия Суханова, В. А. Лебединец, V. Lebedynets, В. О. Лебединец, О. Tkachenko, О. В. Ткаченко, "Analysis of the functionality of the quality risk management process at the pharmaceutical distribution enterprises," pp. 374–376, 2020.
- [23] "ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities," *Eur. Med. Agency*, vol. 31, 2019.
- [24] PortalISO, "O que é Qualidade? Significado norma ISO 9000." [Online]. Available: <https://faq-iso9001.portaliso.com/o-que-e-qualidade/>. [Accessed: 11-Nov-2021].
- [25] A. Sarwar, C. McSweeney, M. Smith, J. Timmermans, and E. Moore, "Investigation of an alternative approach for real-time cleaning verification in the pharmaceutical industry," *Analyst*, vol. 145, no. 22, pp. 7429–7436, 2020.
- [26] M. B. Boca, Z. Apostolides, and E. Pretorius, "A validated HPLC method for determining residues of a dual active ingredient anti-malarial drug on manufacturing equipment surfaces," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 37, no. 3, pp. 461–468, 2005.
- [27] S. Harder, "The validation of cleaning procedures," *Pharmaceutical Technology*, pp. 29–34, 1984.
- [28] B. Y. G. A. Shabir, "Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System," *Inst. Valid. Technol.*
- [29] R. Nash and A. Wachter, "Pharmaceutical process validation," in *Pharmaceutical process validation - An international third edition, revised and expanded*, Third., 2003, pp. 465–506.
- [30] EU, "EudraLex - Volume 4 - EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use; Part 1, Chapter 5: Production," *Eudralex*, no. August 2014, pp. 1–12, 2014.
- [31] J. Thomas, "A Cleaning Validation Master Plan for Oral Solid Dose Pharmaceutical Manufacturing Equipment," *J. Valid. Technol.*, pp. 61–69, 2000.
- [32] M. Montalvol and J. Fuge, "Effective Master Planning for Cleaning Validation including

- Protocol Development," *Conf. Rep.*, vol. 13, no. 3, pp. 264–271, 2007.
- [33] N. Murthy and K. Chitra, "A REVIEW ARTICLE ON CLEANING VALIDATION," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 4, no. 9, pp. 3317–3327, 2013.
- [34] Z. Zaheer and R. Zainuddin, "Analytical Methods for Cleaning Validation," *Der Pharm. Lett.*, vol. 3, no. 6, pp. 232–239, 2014.
- [35] K. Clark, "How to Develop and Validate a Total Organic Carbon Method for Cleaning Applications," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 55, no. 5, pp. 290–294, 2001.
- [36] A. Walsh *et al.*, "Measuring Risk In Cleaning: Cleaning FMEAs And The Cleaning Risk Dashboard," *Pharmaceutical Online*, 2018. [Online]. Available: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/measuring-risk-in-cleaning-cleaning-fmeas-and-the-cleaning-risk-dashboard-0001>. [Accessed: 09-Apr-2022].
- [37] FDA, "Guide To Inspections Validation," *FDA Guid. to Insp. Valid. Clean. Process.*, pp. 1–6, 1993.
- [38] A. Walsh, "Cleaning validation for the 21st century: Acceptance limits for active pharmaceutical ingredients (APIs): Part I," *Pharm. Eng.*, vol. 31, no. 4, pp. 74–83, 2011.
- [39] M. Ovais and Y. L. Lai, "Setting cleaning validation acceptance limits for topical formulations," *Pharm. Technol.*, vol. 32, no. 1, pp. 96–102, 2008.
- [40] S. Maurya, D. Goyal, and C. Verma, "Cleaning method validation in pharmaceutical industry- An overview," *PharmaTutor*, vol. 4, no. 9, pp. 14–20, 2016.
- [41] E. Scientifically, J. A. Criteria, and F. D. Products, "Establishing Scientifically Justified Acceptance Criteria for Cleaning Validation of Finished Drug Products," *Pharm. Technol.*, no. October, 1998.
- [42] Emea, "ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology," *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2006.
- [43] "<1225>VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES," *United States Pharmacopeia.*, pp. 1–6, 2017.
- [44] G. A. Shabir, "Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis," *J. Chromatogr. A*, vol. 987, no. 1–2, pp. 57–66, 2003.
- [45] J. Ermer and P. Nethercote, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Second. 2015.
- [46] P. Konieczka and J. Namiesnik, *Quality assurance and quality control in the analytical chemical laboratory*, Second. 2018.
- [47] "VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)," *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. Regist. Pharm. Hum. Use*, 2005.
- [48] D. A. Armbruster and T. Pry, "Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation," *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 29 Suppl 1, no. August, pp. S49–52, 2008.
- [49] C. Site, "CIP And COP Systems: The Simple Definitions," *CIP And COP Systems*, 2014. [Online]. Available: <https://blog.craneengineering.net/cip-and-cop-systems-the-simple-definitions>. [Accessed: 02-Jun-2022].
- [50] M. Queralt, G. Montoya, P. Pérez-Lozano, J. Suñé-Negre, M. Miñarro, and J. Ticó, "Total Organic Carbon (VCSN and VWP) and HPLC Analysis for Cleaning Validation in a Pharmaceutical Pilot Plant," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 63, pp. 42–57, 2009.
- [51] USP, "643 - TOTAL ORGANIC CARBON," *United States Pharmacopeial Conv.*, pp. 310–311, 2014.
- [52] E. Commission, "Eudralex- Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal

- Products," vol. 2008, no. November, pp. 1–16, 2008.
- [53] European Pharmacopoeia, "Alcoholimetric Tables," *Eur. Pharmacopoeia*, vol. 10.0, no. 5.5, pp. 727–738, 2005.