

Ana Rita Lopes Andrade

**VALIDAÇÃO DO GRAU DE  
DESCONTAMINAÇÃO  
Material de laboratório e vials**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de  
especialização em Controle de Qualidade e Ambiente**

Professor Doutor Jorge Costa Pereira

Director Técnico Ricardo Campante  
dos Laboratórios Basi - Indústria Farmacêutica, S.A.

**Setembro de 2012**

**Universidade de Coimbra**

---

# AGRADECIMENTOS

Este é o culminar de mais uma etapa que só foi possível graças a ter as pessoas certas que de forma mais ou menos directa me incentivaram e apoiaram. Desta forma, quero expressar o meu sincero agradecimento e reconhecimento a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal e científico.

Ao Professor Doutor Jorge Costa Pereira pela oportunidade de realizar este trabalho, pela sua disponibilidade, opinião e revisão crítica.

Ao Director Técnico dos Laboratórios Basi Ricardo Campante, meu orientador externo, pela integração no seu grupo de trabalho, paciência, compreensão e acima de tudo pelo exemplo a seguir, por demonstrar a sua competência e imensa dedicação por aquilo que acredita.

À Doutora Verónica Oliveira, responsável pelo laboratório físico-químico, pelo incansável apoio, orientação, permanente disponibilidade a responder às minhas 1001 perguntas e por tudo o que ensinou.

À minha companheira de viagem Raquel, que fez parecer que a distância fosse mais curta.

Aos meus colegas de trabalho, pela ajuda laboratorial. À Sara, Marta e ao Ângelo pelas boas gargalhadas que me proporcionaram e, em especial à minha companheira das lavagens Josefina, guardo todos os momentos de cumplicidade, companheirismo, amizade, apoio e confidências.

Ao grupo de colóides, pelo qual fiz parte os anos anteriores, especialmente ao Bruno Medronho por todo o conhecimento que serviu de base para este ano. A sua sabedoria e personalidade sempre foram uma inspiração para mim.

Ao Hélder, César e Ângela, por serem os melhores amigos e colegas do curso, pela ajuda e por todos os bons momentos que passamos. À Marta, que não esqueço os bons momentos, apesar da ausência deste ano. À Andreia e Ana Maria por todos as fases de estudo, que faziam desses momentos de sufoco parecer muito mais simples e fáceis de passar. À “casa Olá” e a todos os frequentadores da mesma pela hospitalidade.

À minha Barata pela amizade ao longo destes anos que sempre prevaleceu, apesar da tua mudança de curso. À Inês, Sandra, Vanessa, Ana, Castela e PT pela amizade e momentos de descontração.

Ao meu grupo de amigas, um especial obrigado pela partilha de todos os momentos e confidências ao longo dos anos, pela cumplicidade entre nós e pela amizade que eu tanto preservo. São daquelas pessoas que realmente fazem a diferença.

Um obrigado aos restantes amigos que fazem os meus dias serem melhores.

Ao meu tio Manuel e tia Milá, pelo carinho com que sempre me ouviram e sensatez com que sempre me aconselharam. À tia Margarida e tio Silva pela preocupação sempre demonstrada e por estarem sempre presentes.

Ao Zé, meu namorado e melhor amigo, pelo apoio incondicional em todos os bons e menos bons momentos, pelo amor demonstrado, cumplicidade e por tudo o que somos.

Por fim, aos meus pais, pelos valores transmitidos, carinho, pela educação que faz de mim a pessoa que sou hoje e por serem um exemplo a seguir.

"Toda a grande obra supõe um sacrifício; e  
no próprio sacrifício se encontra a mais bela  
e a mais valiosa das recompensas."  
(Agostinho da Silva)

## **OBJECTIVOS\***

O objectivo deste trabalho consiste, numa primeira fase, avaliar do risco de contaminação no material de laboratório e assegurar que o procedimento de limpeza implementado é adequado, para ambos os tipos de lavagem (manual e automático), permitindo obter resíduos de produto dentro dos limites de aceitação estabelecidos e eliminar riscos de contaminação cruzada. Por seguinte, definir um processo de limpeza para reutilizar os vials e obter baixos níveis de carbono.

\*A tese de mestrado não foi escrita sob o novo acordo ortográfico

## RESUMO

A água purificada é a matéria-prima mais utilizada na indústria farmacêutica. A sua produção é tida como uma operação extremamente delicada, pois, trata-se de um componente principal na produção de formas farmacêuticas sólidas e orais líquidas e na produção de soluções e reagentes, bem como na limpeza de material de laboratório e equipamentos envolvidos. Validar os sistemas de água purificada dá a confiança necessária nos resultados das validações do grau de descontaminação.

O presente trabalho visa apresentar uma estratégia de validação de grau de descontaminação do material de laboratório e dos vials. Descritas as metodologias a levar a cabo para a validação do grau de descontaminação do material de laboratório nos Laboratórios Basi, S.A, quer utilizando a lavagem manual quer a automática, assegurou-se que o procedimento de limpeza implementado é adequado, pois não se encontraram vestígios de detergente nem substância activa. O produto escolhido segundo uma série de critérios como o “pior caso” foi a Nimesulida e foram realizados testes visuais e testes físico-químicos/microbiológicos, assegurando-se os limites de aceitação estabelecidos, através das técnicas de pH, condutividade, carbono orgânico total (TOC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Na validação do grau de descontaminação dos vials, a lavagem manual com o Extran MA 03 isento de fosfatos mostrou ser a melhor detergente para a reutilização dos vials.

## **ABSTRACT**

Purified water is the raw material most used in the pharmaceutical industry. Its production is taken as an extremely delicate operation, because it is a main component in the production of solid and oral liquid pharmaceutical forms and in the production of solutions and reagents as well as in the cleaning of laboratory material and equipment involved. Validating the purified water systems gives the confidence necessary in the results of the validation of the degree of decontamination.

This paper presents a degree of decontamination validation strategy of laboratory equipment and vials. Were described methodologies to undertake to validate the degree of decontamination of laboratory equipment in laboratories Basi, S.A., either washing manually or using the washing machine, it was sure that the cleaning procedure implemented is appropriate because no traces of detergent or active substance were found. The product chosen according to a number of criteria such as the "worst case" was Nimesulide so visual and physico-chemical/microbiological tests were performed, ensuring the acceptance limits established by the techniques of pH, conductivity, total organic carbon (TOC) and high performance liquid chromatography (HPLC).

In the validation of vials degree of decontamination, manual washing with Extran MA 03 phosphate free proved to be the best detergent for the reuse of vials.

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não-esteróide
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AP</b>	Água purificada
<b>CA</b>	Certificado analítico
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>E-POD</b>	Dispensador de água purificada
<b>FS</b>	Factor de segurança
<b>FD</b>	Factor de dificuldade
<b>FU</b>	Fora de uso
<b>gl</b>	Graus de liberdade
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IC</b>	Carbono inorgânico
<b>LCQ</b>	Laboratório de controlo de qualidade
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LIC</b>	Limite inferior de controlo
<b>LSC</b>	Limite superior de controlo
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal 50%
<b>LB</b>	Laboratórios Basi
<b>LCQ</b>	Laboratório Controlo de Qualidade
<b>MQ</b>	Média quadrática
<b>N.D</b>	Muito abaixo do limite de exclusão (< 0.01 µg/mL )
<b>N.R</b>	Não realizado
<b>PQ</b>	Qualificação de Performance
<b>Q-POD</b>	Dispensador de água altamente purificada
<b>R<sub>2</sub>A</b>	Agar Reasoner's
<b>RO</b>	Osmose inversa
<b>SQ</b>	Soma dos quadrados
<b>SS</b>	Soma de Quadrados
<b>TOC</b>	Carbono orgânico total
<b>TSA</b>	Agar caseína de soja
<b>TV</b>	Valor teste
<b>Tcrit</b>	Valor teste crítico
<b>TC</b>	Carbono total
<b>VL</b>	Validação da limpeza



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Laboratórios Basi	1
<b>2</b>	<b>Fundamentação teórica</b>	<b>3</b>
2.1	Sistema de água purificada	3
2.1.1	Sistema ELIX	4
2.1.2	Sistema ORION	7
2.2	Validação do grau de descontaminação	9
2.2.1	Seleção do produto crítico	11
2.3	Métodos analíticos	14
2.3.1	Determinação potenciométrica do pH	14
2.3.2	Condutividade	15
2.3.3	Carbono Total Orgânico	17
2.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	21
<b>3</b>	<b>Experimental</b>	<b>24</b>
3.1	Sistema de água purificada	24
3.1.1	Sistema ELIX	24
3.1.2	Sistema ORION	27
3.1.3	Especificações do sistema de água purificada	28
3.2	Validação do grau de descontaminação do material de laboratório	29
3.2.1	Material	30
3.2.2	Reagentes	32
3.2.3	Processo de limpeza	36
3.2.4	Método de amostragem	37
3.2.5	Ensaio a realizar	39
3.2.6	Determinação da Taxa de Recuperação	47
3.3	Validação do grau de descontaminação dos vials	48
3.3.1	Materiais e equipamentos	48
3.3.2	Cuidados e precauções	49
3.3.3	Seleção do agente de limpeza	49
3.3.4	Análise de TOC	51

<b>3.4</b>	<b>Tratamento estatístico de dados</b> .....	<b>52</b>
3.4.1	Diagnóstico de valores discrepantes .....	53
3.4.2	Comparação de métodos .....	53
3.4.3	Análise da variância .....	54
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Sistema de água purificada</b> .....	<b>58</b>
4.1.1	Integral 3 -CQEQ0203200 .....	58
4.1.2	Restantes equipamentos ELIX .....	69
4.1.3	Comparação com o sistema ORION .....	72
<b>4.2</b>	<b>Validação do grau de descontaminação do material de laboratório</b> .....	<b>75</b>
4.2.1	Pesquisa de resíduos detergente .....	75
4.2.2	Pesquisa de microorganismos .....	78
4.2.3	Curva de calibração .....	80
4.2.4	Pesquisa de resíduos de substância activa .....	81
4.2.5	Taxa de recuperação .....	85
<b>4.3</b>	<b>Validação do grau de descontaminação dos vials</b> .....	<b>85</b>
4.3.1	Lavagem manual - Extran MA 03 isento de fosfatos .....	86
4.3.2	Lavagem com ácido crómico .....	87
4.3.3	Comparação dos métodos de lavagem .....	89
<b>5</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>91</b>
	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>93</b>
	<b>Anexos</b> .....	<b>96</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A crescente globalização e uso de normas internacionais visando a garantia de qualidade, aliada ao crescimento da concorrência no sector farmacêutico, obrigam as empresas a caminhar no sentido da excelência em processos e produtos. A tendência é construir padrões globais de qualidade através de novas normas. Esses novos padrões fazem os estudos de validação representar parte essencial das Boas Práticas de Fabricação e Controlo que devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos e sofrer revalidações periódicas para que seja assegurado que os itens validados permaneçam capazes de atingir os resultados planeados. Desta forma, assegurar que o material usado na indústria se encontra dentro dos critérios de descontaminação cria total confiança nos resultados, tendo sido este o projecto desenvolvido por mim nas instalações dos Laboratórios BASI de indústria farmacêutica em Mortágua.

## 1.1 Laboratórios Basi

Os Laboratórios Basi - indústria farmacêutica, S.A., fundada em 1956 com mais de 50 anos de história no exercício da sua actividade são conhecidos pelo seu dinamismo e diferenciação na capacidade de fornecer medicamentos e soluções terapêuticas de alto nível de qualidade, inovação e segurança. Empresa de capitais provados consolidada no mercado nacional e ao longo das últimas décadas, no mercado de exportação. Sedeada em Coimbra, em 2010 ampliou as suas instalações na zona Industrial de Mortágua com a criação de novos laboratórios de controlo da qualidade. O novo espaço é composto por um laboratório físico-químico, um laboratório de microbiologia e uma área destinada à produção de medicamentos.

O portfólio dos Basi conta com produtos éticos, medicamentos não sujeitos a receita médica, dermocosméticos e suplementos alimentares dedicando-se à produção de medicamentos sólidos, semi-sólidos e líquidos não estéreis, nomeadamente: supositórios; xaropes; pomadas; cremes; géis, e suplementos alimentares.

Os Laboratórios Basi estabeleceram diversas parcerias estratégicas com empresas afins, nomeadamente: FHC – Farmacêutica; Phagecon – Consultoria e Serviços Farmacêuticos; Pharmaportugal; Overpharma – Produtos médicos e farmacêuticos Lda. Possuem licença de

funcionamento (Alvará nº 32 de 22 de Fevereiro de 1958) e a autorização de fabrico/ importação número F020/S1/H/AF/AI/054/2008 de 16-01-2008. Este último inclui medicamentos de uso humano não estéreis, produtos líquidos para uso interno, semi-sólidos, supositórios. Dentro das operações de fabrico têm ainda autorização de embalamento secundário e de Controlo de Qualidade químico/ físico e microbiológico. Relativamente à importação de medicamentos, os Basi possuem autorização de Controlo de Qualidade químico/ físico e microbiológico e, adicionalmente, a certificação de lotes destes produtos importados não estéreis.

A missão dos Laboratórios BASI é a de fornecer às pessoas soluções terapêuticas ajustadas às suas necessidades, ao melhor preço possível, com a garantia de excelência de décadas de actividade. Para tal, têm implementado um sistema de gestão de qualidade conforme as normas UNI EN ISO 9001 que permite uma contínua melhoria de processos, garantia de bons serviços e resposta às exigências da população. Este sistema de gestão de qualidade é diariamente acompanhado pelo Responsável de Gestão da Qualidade do Departamento de Garantia da Qualidade.



**Figura 1.1 – Laboratório físico-químico dos Laboratórios BASI.**

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta secção é abordada uma breve descrição dos equipamentos de depuração de água dos laboratórios BASI e alguns conceitos relativos à validação do grau de descontaminação. Encontrase também uma descrição dos métodos analíticos utilizados no desenvolvimento deste trabalho. A exposição destes conceitos no início da dissertação tem o objectivo de auxiliar na compreensão das metodologias e resultados ao longo da tese.

### 2.1 Sistema de água purificada

A água purificada é a substância mais amplamente usada como matéria-prima, excipiente, ou ingrediente nas operações, processos e formulações farmacêuticas.[1] Além disso, também é empregue nos testes laboratoriais e procedimentos de limpeza de equipamentos e material. Assim, o seu estudo prévio à validação do grau de descontaminação, assume relevada importância. A água purificada é obtida a partir da água potável tratada num sistema que assegure a obtenção da água com especificações farmacopeicas para água purificada. Assim, torna-se necessário a sua purificação, porque a composição da mesma é variável de acordo com a concentração de impurezas presentes na sua fonte de obtenção e o tratamento dispensado pelos serviços de tratamento e abastecimento público. Deste modo, quando purificamos a água a ideia é remover os iões e outros componentes químicos, como compostos orgânicos e inorgânicos.

A água produzida deve atender às especificações da farmacopeia e a sua qualidade físico-química e microbiologia deve ser avaliada periodicamente.

O ensaio microbiológico visa avaliar a qualidade microbiológica da água purificada, para isso são determinadas a carga de bactérias, fungos e leveduras. A presença de bactérias pode ser um indício de formação de biofilme ou limpeza ineficiente no sistema de purificação.

Os procedimentos de monitoração da qualidade da água produzida são adoptados para indicar possíveis anomalias no processo de tratamento aprovado. Os resultados obtidos podem ser utilizados para uma avaliação do sistema de tratamento, indicando a necessidade de manutenção, substituição de componentes ou limpeza do sistema como um todo.[2]

A qualidade da água depende de uma série de factores, como o tipo de sistema de tratamento utilizado, a frequência de manutenção e lavagem do mesmo, bem como os procedimentos de armazenamento e distribuição da água produzida. Qualquer anomalia no sistema de purificação de água pode afectar as suas características e comprometer toda a qualidade dos produtos manipulados.

As tecnologias de tratamento de água podem ser obtidas por diversos métodos que podem estar associados a processos de pré-tratamento. O armazenamento deve ser adequado, para evitar contaminação interna e externa que provém principalmente da fonte da água, do processo de purificação, da manutenção adequada e do sistema de distribuição da água. [3]

A água deve satisfazer requisitos de qualidade definidos pelas farmacopeias, dos quais se inclui a análise de Carbono Orgânico Total (em inglês TOC).

### 2.1.1 Sistema ELIX

Água altamente purificada é a água purificada que passou por tratamento adicional para retirar os possíveis contaminantes e atender aos requisitos de pureza estabelecidos na monografia. O sistema *Elix Advantage* é o sistema usado no laboratório físico-químico e microbiológico dos BASI. Este é mostrado na figura 2.1.



**Figura 2.1 - Fotografia do sistema de água purificada *Elix Advantage* (à direita) e o respectivo dispensador (à esquerda).**

O sistema Elix *Advantage* patenteado combina tecnologia de eletrodeionização com as melhores tecnologias de purificação de catiões (pré-tratamento Progard, a osmose inversa avançada e lâmpada UV 254 nm) para fornecer a solução ideal para cada laboratório usando água purificada - a partir de alguns litros para várias centenas de litros por dia.

O pré-tratamento *Progard* é o primeiro passo da purificação e contém prata impregnada no carvão activado, que impede a proliferação de bactérias presentes na água da torneira e um pré-filtro para proteger a membrana de osmose inversa contra a escala de oxidação e entupimentos. Este tratamento remove eficientemente as partículas, cloro livre e os colóides presentes na água da torneira potável. Além disso, dá uma melhor protecção para o sistema de membrana da osmose inversa e ajudar a prolongar a vida do equipamento.

A osmose inversa (OR), segundo passo de purificação, remove 95-99% de iões e de 99% de todos os materiais orgânicos dissolvidos, microrganismos e partículas. Neste processo a água é purificada por passagem através de membrana semipermeável, ou seja, a membrana de OR permitirá apenas a passagem de solvente (água pura), retendo os solutos (sais dissolvidos e contaminantes), contra um gradiente de concentração por acção da pressão mecânica exercida por uma bomba (pressão de OR). O processo remove bactérias, microrganismos, material orgânico dissolvido, material inorgânico dissolvido e material insolúvel, mas não remove gases ionizáveis dissolvidos. Após este processo o sistema de água purificada dá acesso controlado a parâmetros importantes, mencionados no capítulo experimental.

Após o passo de osmose inversa, a tecnologia Elix da Merck Millipore utiliza um módulo de electrodeionização para remover os restantes iões. Não necessita qualquer substituição da resina ou processo de descalcificação para a produzir uma consistente e superior qualidade de água purificada. O módulo Elix da Merck Millipore, apresentado na figura 2.2, consiste na separação de um ânodo e um cátodo por uma alternância de membranas permeáveis - aniões e catiões. Os compartimentos utilizados para a remoção de iões são preenchidos com resina de permuta iónica que está permanentemente e suavemente regenerada por uma fraca corrente eléctrica, eliminando a necessidade de regeneração química no local, bem como a troca de cartuchos de resina DI. As esferas de carbono activado enchem o compartimento do cátodo para assegurar a dispersão dos iões hidroxilo gerados ao longo de um grande volume e impedindo o pH elevado que levaria à precipitação do  $\text{CaCO}_3$ . Esta tecnologia patenteada elimina a necessidade de proteger módulo Elix com um descalcificador.

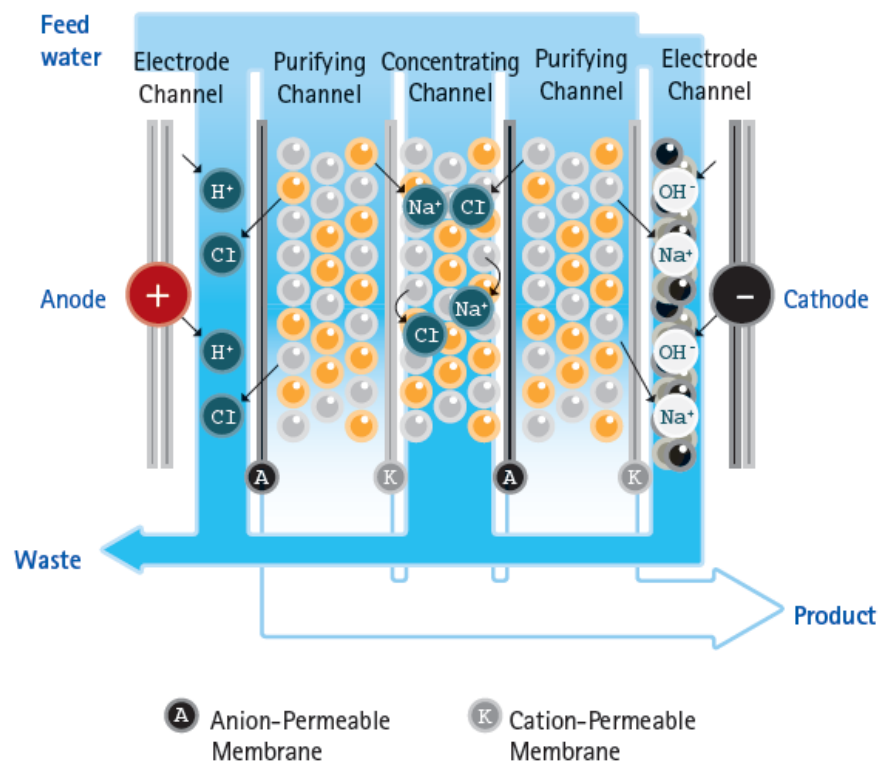


Figura 2.2 - Módulo Elix da Merck Millipore.

Após as etapas de purificação críticas (passo de purificação dos catiões), o sistema de água purificada dá acesso controlado a parâmetros importantes.

O último passo de purificação, antes de a água ser armazenada no reservatório, consiste na água pura passar por uma lâmpada UV 185/254 nm, que assegura a oxidação de moléculas orgânicas e destruição de bactérias.

Em intervalos regulares, a água purificada armazenada está sempre em circulação, nunca estagna no reservatório e é higienizada por uma lâmpada de UV de forma a minimizar o crescimento bacteriano no reservatório de armazenamento.

A água é fornecida através dos PODs independentes (unidades ponto de entrega, do inglês *Point-Of-Delivery units*) localizados em um circuito de recirculação.

Em cada POD, a água recircula através de um loop de 80 centímetros até à tomada de dispensador de água. Antes da entrega, a água pura do sistema Elix passa novamente por uma lâmpada de UV e, em seguida, é filtrada através de um filtro de 0,22 mm no final do ponto de distribuição. Isto reduz o número de bactérias a menos de 0,1 ufc/ml para proporcionar uma óptima qualidade de água.



O sistema Milli-Q Integral é o único sistema compacto que combina a produção de água Tipo II (purificada) e água de Tipo I (altamente purificada) numa única unidade - eliminando a necessidade de uma etapa de pré-tratamento do sistema de água altamente purificada. Esta unidade do sistema de produção utiliza água da torneira normal como alimentação, com água purificada ou altamente purificada entregue por PODs independentes, respectivamente, E-POD e Q-POD. Para a água altamente purificada existe um cartucho de polimento Quantum no dispensador Q-POD que remove contaminantes orgânicos e iónicos abaixo dos níveis de rastreio para coincidir com a qualidade da água necessária para a sua aplicação.

Este acessório contém mais três parâmetros, respectivos à água altamente purificada (Milli-Q), que podem ser verificados para qualificação do sistema, nomeadamente, resistividade Milli-Q, temperatura Milli-Q e TOC. A medição dos níveis de TOC permite ao utilizador verificar que o processo de remoção do sistema de contaminantes orgânicos está a funcionar dentro das especificações.[4, 5]

### **2.1.2 Sistema ORION**

O novo sistema de água purificada dos Laboratórios Basi encontra-se subdividido nas seguintes etapas: produção, armazenamento e distribuição.

Na etapa de produção, a água de rede sofre diversos tratamentos (Filtração, Descalcificação, Osmose Inversa, Electrodesionização e radiação UV) até alcançar a qualidade final necessária. Inicialmente a água passa por um pré-tratamento, onde surge um sistema de filtração multicapa por sílex/antracita para a retenção de sólidos em suspensão e só depois passa para o tratamento propriamente dito composto por: um pré-Filtro em profundidade para retenção de partículas superiores a  $1\mu$  e incrementar a filtração antes da Osmose; um descalcificador para remoção da dureza da água; um sistema duplo com funcionamento alterno e com resinas de permuta iónica para a retenção de cálcio e evitar a carbonatação das membranas de osmose Inversa (regeneração dos filtros é feita com cloreto de sódio); um depósito com uma Solução de Bissulfito e uma válvula automática que permite a remoção do cloro; um depósito de Rotura de 200L para permitir o aquecimento da água durante a sanitização; osmose Inversa com 2 membranas de poliamida 8'' para realização de osmose inversa; electrodesionização (CDI) com uma membrana de electrodiálise, resina de permuta iónica e eléctrodos em funcionamento em contínuo; radiação UV que consiste num sistema de radiação ultravioleta para eliminação de possíveis microorganismos

na água. Por último um sistema de controlo e instrumentação constituído por três conductivímetros digitais (entrada RO, permeado RO e saída CDI), cinco sondas de temperatura (controlo do processo de sanitização), uma sonda redox (protecção à entrada do sistema), caudalímetros digitais (recirculação bomba RO, permeado RO, diluído CDI, concentrado CDI e rejeição RO) e um permutador para permitir a sanitização do sistema (osmose, CDI e anel de distribuição) com água quente entre 75-80°C.



Figura 2.3 - Produção de água purificada do sistema ORION.

O armazenamento de água purificada é realizado através de um depósito de acumulação de água com a capacidade de 6.000L, em aço inoxidável 316L. A entrada de água para o seu interior é feita pela parte superior do tanque, e a existência de *sprayballs* na sua entrada permite que esta deslize por toda a superfície interna do tanque, evitando a criação de pontos mortos ou estáticos dentro deste. A água é armazenada à temperatura de 18-20°C.[6, 7]

Já na componente de distribuição a água é distribuída através de um anel com construção em aço inoxidável AISI 316L e soldaduras orbitais, de diâmetro 2", num total de 18 pontos de consumo: 16 pontos com válvulas manuais, 3 pontos com válvulas automáticas ligadas directamente aos reactores de processo e 1 ponto com válvula automática ligado directamente ao gerador de vapor puro. Num total de 18 pontos de amostragem, o consumo máximo em simultâneo nos pontos de uso é de 6.000 L/h.

## 2.2 Validação do grau de descontaminação

Os produtos farmacêuticos podem ser contaminados por outros produtos farmacêuticos ou substâncias activas, agentes de limpeza, microrganismos ou outros materiais – lubrificantes, partículas presentes no ar, pó, matérias-primas, etc. Os contaminantes podem, portanto, ser de origem química, física ou microbiológica.

As operações de limpeza contribuem para reduzir riscos de contaminação entre lotes do mesmo produto ou entre lotes de produtos diferentes durante o fabrico e/ou análises, por isso, no final do processo de limpeza, temos de garantir que não exista resíduo dos produtos utilizados para a limpeza bem, como resíduo do produto que esta a ser limpo. Trata-se de uma sistemática, definida como validação do grau de descontaminação ou traduzindo do Inglês (*Cleaning validation*), para validação da limpeza (termo mais comumente chamado na indústria farmacêutica) que assegura que os procedimentos de limpeza do material de laboratório, removam efectivamente os resíduos existentes até um nível de aceitação pré-determinado.[8]

Este processo é parte integrante do conjunto de normas que compõem as boas práticas de fabrico de medicamentos e os resultados fidedignos do controlo de qualidade dos mesmos, pois quando um dado não é validado, é apenas um número e não um resultado. Validação significa provar e documentar resultados que indiquem que o método é seguro dentro dos limites estabelecidos e que com a sua aplicação se conseguem resultados desejados e garantem confiabilidade às medidas obtidas.

Não existem requisitos regulamentares estabelecidos em termos de critério de aceitação. Os limites de aceitação ou critérios de aceitação para a validação de limpeza são as especificações e a definição de estratégias com as quais o procedimento de limpeza deve ser confrontado para demonstrar a eficácia de remoção de substâncias activas, excipientes ou detergentes do equipamento ou material, garantindo ainda que a presença de microrganismos se encontre abaixo dos limites pré-fixados.

O primeiro ponto para se ter em consideração é o exame visual, pois sem ele, qualquer outro método perde o valor. No entanto, uma inspecção visual ao equipamento/material é muito subjectiva para ser aceite como um critério de aceitação decisivo. No caso de uma inspecção visual bem sucedida, outros métodos de avaliação devem ser implementados.

É necessário também validar esse método de análise a ser utilizado, porque temos que demonstrar além de sua funcionalidade analítica, a sua sensibilidade em conseguir valores quantitativos. Para

maior confiabilidade analítica, o número de ensaios nas mesmas condições deve ser fixado antes da validação ser iniciada.

Como estratégia é importante controlar a concentração residual do princípio activo presente no material, em função de um critério de aceitação previamente justificado. Este, ainda que bastante confiável do ponto de vista de garantia da não contaminação, possui a desvantagem de utilizar métodos analíticos específicos que captam, quase sempre a presença do princípio activo, quando se sabe que, em muitos processos de limpeza, são utilizados vários produtos químicos como detergentes, agentes tensoactivos, desinfectantes, etc, além de excipientes e microorganismos. Dessa forma, é necessário a utilização de um método não específicos como é o do TOC, capaz de captar a presença de toda a matéria orgânica remanescente no material, além daquela presente na água purificada já utilizada neste processo e devidamente validada. [9]

Relativamente ao uso desta metodologia é geralmente utilizada para detectar resíduos de detergentes, altamente solúveis em água, e não para detectar a substância activa, pois compostos solúveis em água são raros em validação da limpeza (pois os critério de escolha para o “piores caso” é a insolubilidade em água). O pH e condutividade são as outras duas técnicas utilizadas para pesquisa de detergente, que devem obedecer aos critérios de especificação.

Quanto aos testes executados e a amostragem, que comumente são feitos até que o resultado seja satisfatório, devem ser tomados uma série de cuidados. Uma grande dificuldade é determinar a precisão de avaliação do método de amostragem a ser empregue. Existem opções mais aceites como o enxaguamento, mas nem sempre representa a verdade da limpeza, portanto o ideal será usar dois tipos de amostragem como o enxaguamento e o esfregaço. Em ambos os tipos de amostragem deve-se realizar a amostragem nos locais de limpeza mais difíceis.

Para o sucesso de todo processo de validação é necessário o conhecimento total do produto seleccionado como o “piores caso” (explicação no ponto 2.2.1) dos equipamentos, tipos de amostragem e caracterizar os processos de lavagem.

Cada empresa é livre de estabelecer e justificar o critério de aceitação apropriado à sua actividade, desde que a justificação seja lógica, baseada nos materiais envolvidos, na solubilidade e toxicidade, considerando sempre o pior caso.

### 2.2.1 Selecção do produto crítico

Os procedimentos de limpeza para produtos e processos muito semelhantes, não necessitam ser individualmente validados.

Devido ao volume de trabalho que representa validar individualmente os processos de limpeza, recorre-se normalmente à simplificação da validação dos processos de limpeza.

Nesse sentido, recorre-se à escolha de um produto que apresente elevada dificuldade de lavagem, já que contamina gravemente a linha de produção, todos os restantes materiais ou no caso do LCQ os materiais utilizados nas análises.

Este produto crítico representa o “pior caso”, traduzido do inglês “*worst case*”, e caso a validação do procedimento de limpeza para este produto tenha sucesso, estende-se aos demais produtos e processos semelhantes.

A contaminação química pode ter origem em substâncias activas, excipientes, agentes de limpeza, agentes de neutralização ou produtos de degradação. Uma vez que a pesquisa de todos os contaminantes não é alcançável (devido a custos, tempo, planos de produção, etc.), os contaminantes podem ser agrupados de acordo com vários critérios: solubilidade, farmacológico, toxicológico, facilidade de limpeza, facilidade de ensaio/análise. Assim, o melhor candidato a contaminante, isto é, o produto “pior caso” é aquele que apresenta a melhor combinação das seguintes propriedades: menor solubilidade no solvente utilizado no procedimento de limpeza; maior dificuldade de remoção segundo a experiência dos operadores, maior toxicidade e menor dose terapêutica.[10] Contudo, das características físico-químicas do produto consideradas na avaliação da sua limpeza, a solubilidade da substância activa em água é a característica mais importante.

Produtos solúveis são removidos facilmente durante a limpeza pela sua dissolução, tanto activos como excipientes, então estes podem ser facilmente enxaguados. No entanto, materiais insolúveis não se dissolverão, e deverão ser removidos por meios físicos ou pela adição de agentes de limpeza, aumentando a “molhabilidade”, emulsificação ou solvatação dos materiais.

Os factores considerados importantes para a escolha do “pior caso” são a solubilidade da substância activa em água expressa em ppm, (fS), a toxicidade do fármaco representado pela DL<sub>50</sub> (fT) e o factor representado pelo grau de limpeza do equipamento (fD).

O fS e fT estão relacionados com a validação da limpeza, uma vez que quanto menos solúvel em água for uma determinada substância activa, maior será a sua contribuição no índice que definirá o “pior caso” e vice-versa.[11]

Tabela 2.1 - Classificação de materiais atendendo ao factor de solubilidade.

fS - Factor de Solubilidade			
Solubilidade	Solubilidade (S) em água	Escala de Solubilidade - fS	Classificação
Muito solúvel em água	1,000,000	1	Alta
Facilmente solúvel em água	100,000<S<1,000,000	2	Solubilidade
Solúvel em água	33,000<S<100,000	3	
Moderadamente solúvel em água	10,00<S<33,000	4	Moderada
Ligeiramente solúvel em água	1,000<S<10,00	5	Solubilidade
Muito pouco solúvel em água	100<S<1,000	6	Baixa
Praticamente insolúvel em água ou insolúvel	S<100	7	Solubilidade

Da mesma forma, quanto mais tóxico (menor dose letal a 50% ( $DL_{50}$ )) for uma determinada substância activa, maior será a sua contribuição neste índice.

Tabela 2.2 - Classificação do grau de perigosidade (factor de toxicidade) em função da  $DL_{50}$ .

fT - Factor de Toxicidade em função da $DL_{50}$		
$DL_{50}$ - mg/Kg	Classificação	Pontos - fT
$DL_{50}<200$	Alta Toxicidade	3
$200<DL_{50}<2,000$	Moderada Toxicidade	2
$DL_{50}>2,000$	Baixa Toxicidade	1

fD refere-se à experiência acumulada pelos operadores com cada produto quando da execução dos procedimentos de limpeza. Deste modo, a pontuação atribuída pelos próprios colaboradores relaciona-se com a dificuldade de limpar os equipamentos, isto é, quanto maior a pontuação atribuída a determinado produto, maior dificuldade de se executar os procedimentos de limpeza do mesmo.

Tabela 2.3 - Classificação atribuída pelos operadores de acordo com o factor de dificuldade de limpar os equipamentos.

fD - Factor de Dificuldade	
Dificuldade de Limpar	Pontos fD
Muito difícil de limpar	4
Difícil de limpar	3
Dificuldade média de limpar	2
Fácil de limpar	1

Tendo definido os factores, o índice que define o “pior caso” pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{ÍNDICE} = fS \times Fd \times fT \quad (2.1)$$

Contudo, isto é aplicável para validação de limpeza de equipamentos de produção, em termos de material de laboratório a aplicação deste factor na fórmula não se considera tão relevante, aplicando assim a seguinte equação:

$$\text{ÍNDICE} = fS \times fD \quad (2.2)$$

Pelo levantamento de todas as matérias-primas e produto acabado analisados no Controlo de Qualidade indicado na Ficha de Registo “Levantamento de Produtos – Matérias-Primas (Modelo A)” e “Levantamento de Produtos – Produto Acabado (Modelo B)”, foi feita a classificação dos mesmos. Nesse conjunto de fármacos utilizados pelo laboratório BASI, a Nimesulida foi considerada o produto “pior caso”, devido a ter: fS- 7, fT-2, fD-4, e assim o maior índice=28.

Na tabela seguinte apresenta-se uma pesquisa sobre a substância activa Nimesulida nas seguintes formas farmacêuticas: matéria-prima, comprimidos e pomada.

**Tabela 2.4 - Listagem da Substância seleccionada como “worst case”, Nimesulida como substância activa, comprimidos e em forma de gel.**

<b>Tipo de produto</b>	<b>Produto</b>	<b>Justificação para pior caso</b>
Substância Activa (matéria-prima)	<i>Nimesulida</i>	Substância activa insolúvel em água, com maior dificuldade de limpeza e consequentemente com maior índice geral. Difícil detecção de deficiente lavagem por inspecção visual. Deficiente lavagem detectável visualmente com passagem do material com acetona e consequente aparecimento de coloração amarela.
FF Sólida / FF Líquida (comprimidos)	<i>Jabazulide</i>	Produto com maior número de componentes insolúveis em água e consequentemente com maior índice geral. Substância activa insolúvel em água.
FF Semi-sólida (Pomada)	<i>Reumolide</i>	Produto com maior número de componentes insolúveis em água e consequentemente com maior índice geral. Substância activa insolúvel em água.

## 2.3 Métodos analíticos

Um método analítico é um conjunto de procedimentos que envolvem técnicas laboratoriais, criteriosamente desenvolvidos, planeados e sistematizados, visando quantificar com rigor um determinado analito numa determinada matriz a um certo nível de concentração. Para cumprir tal objectivo, o método tem que apresentar certos requisitos como ser fiável, acessível e adequado ao analito na matriz ao nível de concentração pretendida. Nos subcapítulos seguintes destacam-se quatro métodos: determinação potenciométrica de pH, condutividade, carbono orgânico total e por fim cromatografia líquida de alta eficiência.

### 2.3.1 Determinação potenciométrica do pH

O pH é o número que representa convencionalmente a concentração de iões de hidrogénio numa solução aquosa. O pH de uma solução é expresso em relação ao de uma solução de referência ( $pH_s$ ) segundo a equação:

$$pH = pH_s - \frac{E - E_s}{k} \quad (2.3)$$

Em que E é a tensão, em volts, da célula contendo a solução problema,  $E_s$  a tensão, em volts, da célula contendo a solução de referência de pH conhecido ( $pH_s$ ) e k a variação da tensão por variação de uma unidade de pH e calculada pela equação de Nernst.

A determinação potenciométrica do pH é efectuada medindo a diferença do potencial entre dois eléctrodos mergulhados na amostra. Um deles é sensível aos iões hidrogénio (eléctrodo de vidro) e o outro é um eléctrodo de referência.[12]

O eléctrodo de pH combinado utilizado neste estudo, designado por eléctrodo de pH InLab® 413 SG, da Mettler Toledo contém um sensor de temperatura integrado e cabeça fixa com conector BNC/RCA (Cinch), e o eléctrodo de referência nestes sensores está em contacto directo com o meio medido, através de duas junções abertas, consequentemente, não há nenhuma junção para bloquear. O sistema modular utilizado nos Laboratórios Basi para medir o pH foi o SevenMulti S70-K, da Mettler Toledo, apresentado na figura 2.4.





**Figura 2.4** Medidor de pH SevenMulti EC-Kit-Version S70-K, da Mettler Toledo.

Antes de realizar as medições de pH das amostras, o eléctrodo de pH deve ser calibrado com a solução tampão pH. O ajuste é feito com duas soluções tampão (pH 4 e 10). Todas as medições foram realizadas à mesma temperatura de 20°C. Calibra-se o aparelho com o eléctrodo mergulhado numa solução tampão de ftalato de potássio 0.05 M (padrão primário) pH=4.00 (a 20°C), de seguida com uma solução tampão de pH=10.06 (a 20°C) de carbonato de sódio 0.025 M e bicarbonato de sódio 0.025M. No fim da calibração faz-se a verificação com o uma solução de pH=7. O eléctrodo mergulhado numa soluções e é efectuado a leitura nas mesma condições da solução padrão.

### 2.3.2 Condutividade

Os sais dissolvidos e ionizados presentes na água transformam-se em electrólitos capazes de conduzir corrente eléctrica. Como há uma relação de proporcionalidade entre o teor de sais dissolvidos e a condutividade eléctrica, pode-se estimar o teor de sais pela medida da condutividade.[13]

Condutividade eléctrica é uma medida da habilidade de uma solução aquosa de conduzir uma corrente eléctrica devido à presença de iões. Essa propriedade varia com a concentração total de substâncias ionizadas dissolvidas na água, com a temperatura, com a mobilidade dos iões, com a valência dos iões e com as concentrações real e relativa de cada ião.

A corrente de intensidade  $I$  (em amperes) que atravessa um condutor é directamente proporcional à força electromotriz  $E$  (em volt) aplicada e inversamente proporcional à resistência (em ohm) do condutor:

$$I = \frac{E}{R} \quad (2.4)$$

A condutividade  $K$  de uma solução ou, mais correctamente, a condutividade específica, é por definição inversa da resistência  $\rho$ . Esta é definida como o coeficiente do campo eléctrico pela densidade da corrente. A resistência  $R$  (em  $\Omega$ ) de um condutor de secção  $S$  (em  $\text{cm}^2$ ) e de comprimento  $L$  (em cm) é dada pela expressão:

$$R = \rho \times \frac{L}{S} \quad (2.5)$$

Onde  $\frac{L}{S}$  corresponde à constante da célula.

A condutividade eléctrica pode ser expressa por diferentes unidades e, principalmente, por seus múltiplos. No Sistema Internacional de Unidades (S.I.), é reportada como Siemens por metro (S/m). Entretanto, em medições realizadas em amostras de água, utiliza-se preferencialmente microSiemens ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ou miliSiemens por centímetro (mS/cm).[14]

A célula de condutividade InLab 731 (figura 2.5) com quatro pólos de carbono, sonda de temperatura integrada e cabo foi desenvolvida para ser usado com os medidores de bancada Mettler Toledo SevenMulti (igual ao modulo utilizado para medir o pH) e medir condutividade em meios aquosos. Este eléctrodo utilizado neste estudo tem uma gama operacional entre 0.001  $\mu\text{S}/\text{cm}$  - 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .



**Figura 2.5** Eléctrodo de condutividade, modelo InLab 731 da Mettler Toledo

A condutividade eléctrica é uma propriedade que depende expressivamente da temperatura. Devido a isso, os dados de condutividade eléctrica devem ser acompanhados da temperatura na qual foi medida. Para propósitos comparativos de dados de condutividade eléctrica, defina-se uma

das temperaturas de referência (20°C). Este equipamento é capaz de fornecer a condutividade eléctrica já convertida para a temperatura de referência.

### 2.3.3 Carbono Total Orgânico

A análise da concentração de Carbono Orgânico Total da amostra tem o objectivo de avaliar a contaminação da água com impurezas orgânicas.

As aplicações da metodologia de carbono orgânico total na indústria são reservadas, principalmente, ao monitoramento dos sistemas de produção de água para fins farmacêuticos. A análise de TOC também é aplicável em validação de limpeza, usada em conjunto com outros métodos, para testar resíduos de produtos fabricados anteriormente, resíduos em material de laboratório, detergentes químicos, solventes dos produtos e contaminantes microbiológicos.

O analisador de laboratório modelo Sievers 900 da GE Analytical Instruments (figura 2.6) é o analisador utilizado para análise de carbono orgânico total e controle da qualidade da água na área farmacêutica.



**Figura 2.6 - Analisador de laboratório modelo Sievers 900 da GE Analytical Instruments para realização da análise de TOC.**

Todos os analisadores de TOC realizam duas funções: a oxidação do carbono orgânico em água para  $\text{CO}_2$  e a medição do  $\text{CO}_2$  produzido, o que torna o analisador TOC diferente é o método que o mesmo utiliza para oxidar os componentes orgânicos na amostra de água e os métodos usados para detectar o  $\text{CO}_2$  resultante.

Este analisador baseia-se na oxidação de compostos orgânicos para formar dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), utilizando a radiação UV e um agente químico oxidante (persulfato de amônio). No método condutométrico baseado numa membrana selectiva, a membrana é uma barreira protetora contra a interferência dos iões, possibilitando apenas a análise de  $\text{CO}_2$ . Para cada medição TOC, a concentração de carbono inorgânico ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , e  $\text{CO}_3^{2-}$ ) é determinada e, após a oxidação dos compostos orgânico, o carbono total (TC) da amostra é medido. A concentração dos compostos orgânicos é então calculada a partir da diferença entre as concentrações de TC e carbono inorgânico (IC) (equação 2.6).

$$\text{TC} - \text{IC} = \text{TOC} \quad (2.6)$$

O analisador pode ser utilizado para monitorizar as amostras de água que variam a partir de água de elevada pureza contendo <0,3 partes por bilhão (ppb) de TOC para amostras de água contendo até 50 partes por milhão (ppm) de TOC.

Este equipamento da Sievers é calibrado na fábrica, e calibração permanece estável por aproximadamente um ano. A recalibração e validação são realizadas no laboratório por um técnico da marca que analisa uma solução padrão a intervalos regulares, determinados em função da frequência de medições. Esta solução é preparada com uma substância facilmente oxidável (a sacarose), numa concentração tal que a resposta instrumental obtida corresponda ao limite do teor fixado de TOC. A conformidade do sistema é verificada através de uma solução preparada com uma substância previsivelmente de difícil oxidação (1,4-benzoquinona).

A figura 2.7 mostra o esquema que vai auxiliar à compreensão da descrição do processo desde o GE autosampler até obter o resultado de TOC.

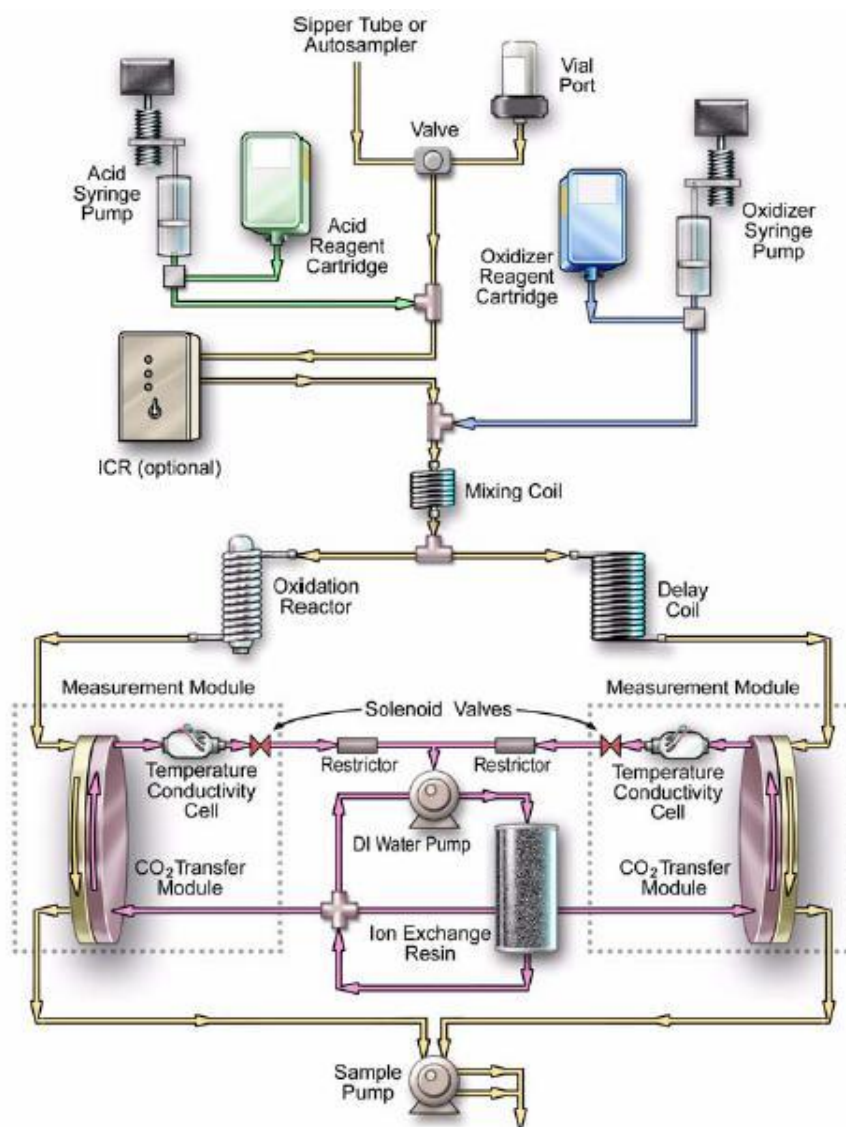


Figura 2.7 - Esquema do processo usado no equipamento TOC da Sievers 900.

As amostras de água são sempre recolhidas para vials de 40 mL. Estes vials são introduzidos no GE Autosampler, com capacidade de até 120 frascos e uma agulha de aço inoxidável é usada para transferir as amostras para o analisador.

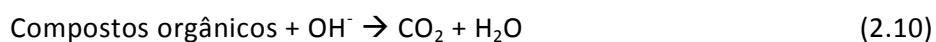
Através dessa agulha é injectado ácido fosfórico 6M ( $H_3PO_4$ ) (referido como ácido no interface do utilizador) na amostra para reduzir o pH da amostra a 2, permitindo a medição precisa de TOC e IC. A amostra acidificada é então combinada com persulfato de amónio 15% ( $(NH_4)_2S_2O_8$ ) (referido como o oxidante na interface de utilizador) para promover a oxidação dos compostos orgânicos.

O divisor de fluxo divide o fluxo de amostra em dois fluxos iguais, onde um fluxo é processado para a medição do IC e o outro é processado para a medição da TC.

O fluxo de TC passa para um reactor de oxidação em que a amostra é exposta à luz UV. A combinação da luz UV e do persulfato, oxida os compostos orgânicos da amostra, convertendo o carbono em CO<sub>2</sub>. O reactor é um tubo em espiral de quartzo envolto em torno da lâmpada UV, que emite luz a 185 e 254 nm, resultando na formação de produto químico poderoso, agentes oxidantes, sob a forma de radicais hidroxilo produzidos pela fotólise da água (eq. 2.7) e persulfato (eq. 2.8, 2.9):



Os radicais hidroxilo (OH •) irão completamente oxidar os compostos orgânicos, convertendo os átomos de carbono do composto orgânico em CO<sub>2</sub>

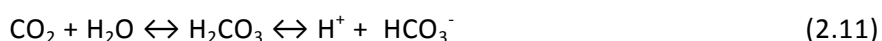


O fluxo de IC passa através de uma bobina de atraso (*'delay coil'*), que torna o tempo de trânsito total do fluxo de IC através do analisador ao mesmo que o tempo de trânsito da corrente de TC através do analisador. Depois do TC e IC saírem, cada fluxo passa para o seu respectivo módulo de transferência de CO<sub>2</sub>. O módulo de transferência de CO<sub>2</sub> é um projecto patenteado que permite a transferência de CO<sub>2</sub> através de uma membrana permeável ao gás.

A membrana separa o lado da amostra do analisador do lado da água desionizada. O lado DI do analisador é um circuito fechado e consiste em duas células de condutividade - uma para o fluxo de TC e outra para o fluxo de IC - uma bomba de água DI, DI reservatório de água e resina de troca iónica (leito de resina).

O CO<sub>2</sub> passa através da membrana para a água DI, enquanto os compostos interferentes e subprodutos de oxidação são bloqueados pela membrana.

O CO<sub>2</sub> forma ácido carbónico após reacção com água e o ácido carbónico dissocia-se em iões hidrogénio e iões bicarbonato:



Água DI é continuamente bombeada através do lado DI do analisador, recolhendo os iões  $H^+$  e  $HCO_3^-$ . As moléculas de  $CO_2$  e  $H_2CO_3$  provenientes do módulo de transferência de  $CO_2$  vão ser medidas através da célula de condutividade. Em seguida, a resina de permuta iónica remove os iões de  $HCO_3^-$  e outros e a água é bombeada de volta para o módulo de transferência de  $CO_2$  para repetir a operação.

O  $CO_2$  da TC e fluxos de amostra IC são medidos pelas células de condutividade respectivas e as leituras de condutividade são utilizados para calcular a concentração de TC e IC, que posteriormente nos indicam o valor de TOC, pela diferença desses valores.[16]

Os resultados são exibidos e armazenados no computador através do software DataPro 900.

### 2.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é uma poderosa ferramenta analítica para o controlo de qualidade de activos e formas farmacêuticas. Apresenta elevada exactidão nos resultados, permitindo a identificação e/ou a quantificação dos compostos presentes com alto grau de confiança.[18]

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance/pressure chromatography*) é um método físico-químico e fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa chamada fase estacionária contida na coluna, e a uma fase móvel líquida que atravessa, por percolação, a fase estacionária.[17]

O equipamento consiste num sistema de bombagem, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detector e um sistema de obtenção de dados. A figura 2.8 mostra um diagrama típico de HPLC.

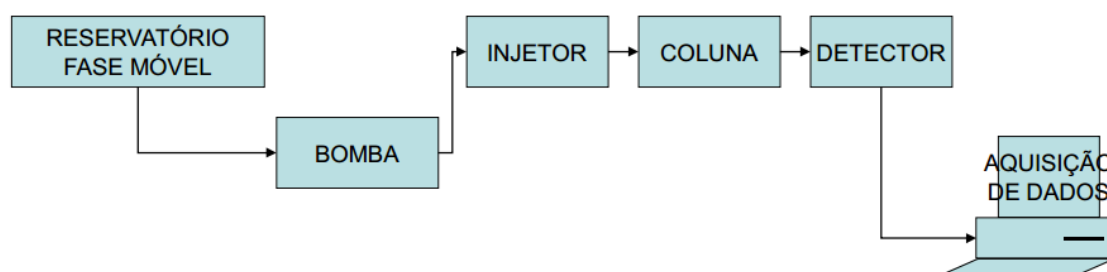
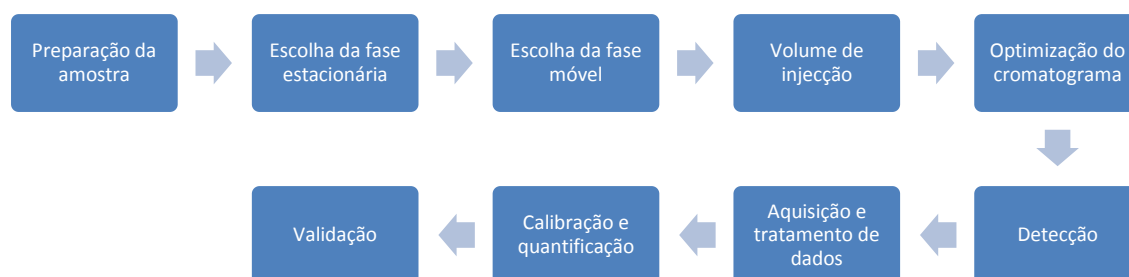


Figura 2.8 - Esquema de HPLC que mostra o percurso da fase móvel desde o seu reservatório.

Numa análise deste tipo é essencial delinear uma estratégia de desenvolvimento (figura 2.9) onde alguns parâmetros devem ser tipos em particular atenção, de forma a obter melhores e mais eficientes resultados, assim como uma diminuição dos números de experiências realizadas.



**Figura 2.9 – Esquema com a estratégia de desenvolvimento para proceder à análise de HPLC.**

A amostra é introduzida num sistema de injeção concebido para funcionar a alta pressão.

Para que um solvente possa ser utilizado como fase móvel na HPLC deve apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação; deve dissolver a fase móvel sem decompor seus componentes, para que estes sejam transportados pela coluna sem que haja modificação; não deve dissolver a fase estacionária; deve ser compatível com o detector; não ser tóxico e deve ter baixa viscosidade, pois isso irá interferir directamente na eficiência da separação.[19]

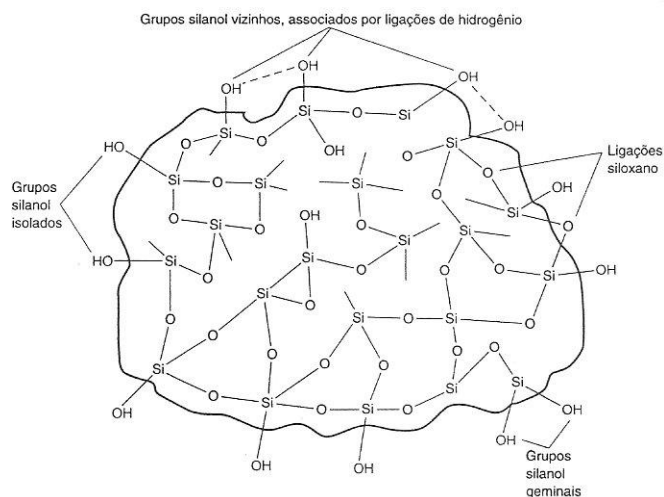
Uma fase móvel adequada é indispensável para a HPLC, por isso é necessário examinar factores que determinam sua escolha, como a polaridade desta, que determina seu poder de eluição juntamente com a polaridade da fase estacionária e com a natureza dos componentes da amostra. Se a separação for com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade, se a separação for em fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade. Outros factores que também devem ser considerados são o ponto de ebulição, a viscosidade, a compatibilidade com o detector e a toxicidade.[20]

Os componentes da fase móvel são geralmente filtrados para eliminar as partículas de tamanho superior a 0.45 µm e por filtração em módulos membrana/vácuo de modo a evitar a formação de bolhas de gás na célula de detecção. Quando se utilizam soluções tampão, convém lavar cuidadosamente o sistema com uma mistura de água e solvente orgânico da fase móvel, uma vez a cromatografia terminada para evitar a cristalização de sais.

Utilizam-se inúmeros tipos de fases estacionárias, nomeadamente de sílica. A sílica que consiste principalmente em dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) com o átomo de silício no centro de um tetraedro,



sendo a valência remanescente na superfície ocupada por um grupo hidroxilo (-OH) (figura 2.10) é o material mais utilizado no empacotamento de colunas.



**Figura 2.10 – Esquema da estrutura da sílica. Em destaque os grupos silanol vizinhos, geminais e isolados.**

A superfície do suporte (por exemplo dos grupos silanol da sílica) é posta em presença de diferentes reagentes da família dos silanos, com os quais reage formando, por ligação covalente, derivados sililados que ocupam um número variável dos locais reactivos da superfície de suporte. A natureza da parte ligada é um parâmetro determinante para as propriedades da superfície do suporte. A fase estacionária de octadecil ( $C_{18}$ ) é a mais utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência, sendo representada por ODS (octadecilsilano).[21]

O detector é um dispositivo que examina continuamente o material eluído e gera um sinal aquando a passagem de substâncias. Idealmente cada substância deve gerar um pico no cromatograma.

O detector ideal é aquele que apresenta alta sensibilidade e estabilidade, é linear e produz uma leitura contínua e uma resposta universal. Em HPLC os detectores mais utilizados são espectrofotométricos (UV ou fluorescência).

A identificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos com padrões. Nestes padrões o componente em questão é eluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, tendo a formação de um pico num determinado tempo, chamado de tempo de retenção, sendo assim os componentes são identificados pelo tempo de retenção.

## **3 EXPERIMENTAL**

No controlo de qualidade de uma indústria farmacêutica é imperativo validar os resultados do sistema de água purificada e desenvolver a temática de validação de limpeza. Neste capítulo serão apresentadas as formas de tratamento laboratorial desses temas, começando por abordar os procedimentos de validação do sistema Elix e sistema ORION e de seguida apresentando o protocolo seguido para a execução das validações de limpeza. Para melhor clareza, cada caso de estudo será abordado individualmente, posteriormente procurar-se-á relacioná-los entre si de uma forma genérica, realçando a importância da sua abordagem como um conjunto e não em termos individuais.

### **3.1 Sistema de água purificada**

O sistema Elix e ORION revelam a mesma finalidade ao serem sistemas de depuração de água. No entanto, no presente estudo será apresentada a compilação de todos os resultados de modo a validar o desempenho do sistema Elix desde 2010 até 2012. Por sua vez, o sistema ORION é o novo sistema de água purificada que necessita de reunir todos os critérios para ser implementado como o novo sistema de água purificada na indústria farmacêutica Basi.

#### **3.1.1 Sistema ELIX**

O objectivo principal foi apresentar e analisar os dados conducentes à validação do sistema de água purificada, existente no CQM dos Laboratórios Basi. Para a concretização deste objectivo analisam-se e discutem-se os resultados obtidos, nos diferentes ensaios físico-químicos e microbiológicos realizados, desde Dezembro de 2010 até Janeiro de 2012.

Assim, pretendeu-se desta forma validar todo o sistema de água purificada e a matéria-prima “água purificada” produzida, confirmar se a manutenção executada e prevista é adequada.

O presente estudo decorreu no período de Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

A amostragem foi sempre realizada, semanalmente, por um operador qualificado do laboratório de controlo de qualidade que colecta as amostras directamente da saída do sistema de tratamento – os dispensadores e depósitos. A tabela seguinte mostra os cinco depósitos de água e dispensadores onde foi efectuada a amostragem, sendo o E-POD o dispensador de água purificada e o Q-POD dispensador de água altamente purificada.

**Tabela 3.1 - Sistema de depuração da água purificada e a sua localização nas instalações fabris dos Basi.**

Nome	Acessórios	Laboratório
Integral 3 -CQEQ0203200	Depósito, E-POD, Q-POD	F.Q
Elix 3 -CQEQ0202800	Depósito, E-POD	F.Q
Elix 5 -CQEQ0203000	Depósito	F.Q
Elix 3 -CQEQ0202900	Depósito, E-POD	Microbiologia
Elix 5 -CQEQ0203100	Depósito	Microbiologia

No sentido de verificar o grau de qualidade da água depurada por estes sistemas, seguiu-se a seguinte metodologia: deve-se recolher o volume de amostra necessário para proceder a análise, normalmente para frasco de 500 mL com tampa e a recolha e manuseio dos frascos deverão ser feitos com cuidado, mantendo-os sempre limpos e descontaminados, para evitar contaminação química e/ou microbiológica da amostra e posteriormente proceder às análises físico-químicas. Para análise microbiológica, os frascos deverão ser previamente esterilizados e o ponto de amostragem deve ser limpo com etanol a 70°.

Em ambas as amostragens para as duas análises deve-se abrir a torneira, no ponto de amostragem, e deixar escoar a água por alguns minutos antes da recolha e abrir os frascos somente no momento de efectuar a colecta da amostra e pelo tempo necessário para seu preenchimento, devendo ser fechados imediatamente após o procedimento de amostragem

Após amostragem, procede-se à verificação do sistema de água purificada lida directamente em cada equipamento e regista-se os resultados indicados dos parâmetros relativos à qualidade da água purificada.

**Tabela 3.2 - Parâmetros das verificações do sistema de água purificada com as respectivas unidades e limites de controlo.**

Parâmetro	Unidades	Limite de controlo
Condutividade da água de alimentação	$\mu\text{S/cm}$	$\leq 2000$
Condutividade da água de OR	$\mu\text{S/cm}$	2 – 3500
Temperatura da água de OR	$^{\circ}\text{C}$	< 35

Parâmetro	Unidades	Limite de controlo
Pressão da água de OR	bar	0 - 15.0
Condutividade do permeado	$\mu\text{S}/\text{cm}$	< 100
Rejeição da OR	%	> 50
Resistividade da água do Elix	$\text{M}\Omega.\text{cm}$	>5
Temperatura da água do Elix	$^{\circ}\text{C}$	<35
Resistividade (Milli-Q)	$\text{M}\Omega.\text{cm}$	16.4 - 20.0
Temperatura (Milli-Q)	$^{\circ}\text{C}$	<35
TOC (Milli-Q)	ppb	<5

As análises realizadas semanalmente contemplam análises físico-químicas e microbiológicas para cada depósito e dispensador (E-POD e Q-POD), de acordo com a monografia da Farmacopeia Europeia, no entanto de todos os parâmetros analisados os mais relevantes foram a condutividade efectuada no equipamento Seven multi S-70K da Mettler Toledo, a análise de carbono orgânico total efectuada no equipamento 900 LAB da Sievers e a análise microbiológica. A tabela 3.3 apresenta os parâmetros estudados, bem como os respectivos limites de alerta e de acção.

No caso do TOC, realiza-se o ensaio apenas para a água purificada do E-POD do Integral 3 e para a água altamente purificada do Q-POD do Integral 3.

**Tabela 3.3 - Parâmetros relevantes ao estudo e respectivas unidades, limites de alerta e de acção**

Parâmetro	Unidades	Limite de Alerta	Limite de Acção
Condutividade (Depósito, E-POD)	$\mu\text{S}/\text{cm}$	> 2	> 3.5
Condutividade (Q-POD)	$\mu\text{S}/\text{cm}$	> 0.75	> 1.1
TOC	ppb	> 100	> 250
Contagem Bacteriana (Depósito, E-POD)	ufc/ml	> 20	> 75
Contagem Bacteriana (Q-POD)	ufc/ml	> 0.05	> 0.075

A água purificada deve apresentar um mínimo de contaminação microbiológica possível, tendo sido estabelecidas especificações de limite de alerta de 20 ufc/ml e limite de acção 75 ufc/ml e no caso da água altamente purificada especificações ainda mais rigorosas.

Os resultados obtidos “ $\leq 1\text{ufc}/\text{ml}$ ” até ao lote AP-280312 foram informaticamente tratados como 0 ufc/ml.

### 3.1.2 Sistema ORION

Para o iniciar da nova área de Produção na indústria farmacêutica BASI de Mortágua houve Para o iniciar da nova área de Produção na indústria farmacêutica Basi em Mortágua houve necessidade de implementar um novo sistema de água purificada, denominado por ORION, que abrangesse desde a área de Produção até à área do Controlo de Qualidade.

Este sistema tem ainda um impacto maior devido à sua responsabilidade directa na qualidade final do produto/análises, sendo desta forma considerado como um sistema crítico e por isso sujeito a um rigoroso método para a validação deste novo sistema de água purificada.

O objectivo é avaliar o desempenho do sistema em fornecer água purificada com as características, qualidades e especificações exigidas na farmacopeia europeia – esta etapa é denominada por qualificação de desempenho, ou, através de uma tradução mais literal do Inglês (*Performance qualification*) para qualificação de performance.[7]

Em caso de eventuais discordâncias dos critérios de aceitação deve-se abrir um desvio de qualidade que instituirá as investigações e a necessidade de eventuais acções correctivas.

O conhecimento exacto de todo o processo é essencial para o estabelecimento de uma correcta e racional estratégia de amostragem durante a qualificação de performance.

A realização da qualificação de performance deste sistema irá consistir numa primeira fase, com uma duração de 2 semanas, na caracterização da realização de amostragens e análises a todos os pontos de consumo do sistema. Durante este período o sistema deve funcionar continuamente, sem erros ou desvios na sua performance. Período durante o qual são igualmente elaborados procedimentos internos para a realização da manutenção, operação, limpeza e sanitização do sistema.

Os ensaios a realizar contemplaram as análises físico-químicas e microbiológicas descritas nas monografias de referência e padrões internacionais (Farmacopeia Europeia para a Água Purificada).

Inicialmente, recolheu-se amostras do ponto da água de rede e do ponto após a adição de sulfitos para a remoção de cloro na água, de modo a verificar se o tratamento com sulfitos é adequado na remoção de cloro e ausência da dureza total da água. A recolha de amostras de água purificada para análise físico-química e microbiológica, é realizada em cada fase de produção de água purificada e nos diferentes pontos de uso, localizados nas áreas destinadas à Produção e Controlo de Qualidade. Os diversos pontos para a recolha de água e respectiva localização encontram-se listados nas tabelas A1.1 e A1.2 no anexo A1.

Para proceder à amostragem para análise microbiológica dos pontos na sala de águas o analista deve utilizar uma técnica asséptica e ferramentas de amostragem adequadas (luvas, bata, equipamento limpo e estéril), utilizar etanol a 70°, cumprir o tempo de purga necessário antes de proceder à amostragem do ponto de água e recolher para material estéril, o volume de amostra necessário para proceder a análise.

Na amostragem para a análise físico-química basta recolher as amostras directamente para frascos de vidro com rosca devidamente limpos e descontaminados, devendo depois ser bem fechado. É necessário especial cuidado em não utilizar álcool que altera a análise de TOC, e por essa razão, proceder sempre à amostragem antes da recolha microbiológica.

Após aprovação da primeira fase, dá-se início à segunda fase, sendo que a frequência de análises para esses pontos continuará elevada. Análises diárias e completas a todos os pontos, com duração de 2 semanas. Nesta fase, e uma vez aprovada a fase anterior, pode-se iniciar a sua utilização em produção.

A última etapa corresponde ao restante período de testes da qualificação de performance, necessário para ter dados anuais de testes (de forma a verificar possíveis variações sazonais na qualidade da água produzida e garantir que o sistema permanece com a performance requerida para este). A duração será até completar um ano.

### 3.1.3 Especificações do sistema de água purificada

De seguida é apresentada uma tabela com as especificações da água purificada, segundo a farmacopeia europeia, com os valores de referência que devemos ter em consideração para cada um dos ensaios realizados.

Estas especificações (tabela 3.4) são indicativas para ambos os sistemas de água purificada e estes resultados obtidos devem ser posteriormente registados por cada colaborador envolvido nas análises.

**Tabela 3.4 - Especificações dos ensaios da água purificada dos dois sistemas.[22]**

Ensaio	Especificações
1 – Aparência	Límpida
2 – Cor	Incolor

Ensaio	Especificações
3 – Odor	Inodoro
4 – Sabor	Insípido
5 – Acidez ou alcalinidade	a) A solução não cora de vermelho b) A solução não cora de azul
6 – Substâncias oxidáveis	A solução fica levemente corada de róseo
7 – Condutividade	$\leq 4,3 \mu\text{S/cm}$
8 – Amónia	$<0,2\text{ppm}$
9 – Cloretos	Ausência
10 – Sulfatos	Ausência
11 – Cálcio e magnésio	Apresenta coloração azul
12 – Resíduo por evaporação	$\leq 1\text{mg (0,001\%)}$
13 – Nitratos	$<0,2\text{ppm}$
14 – Metais Pesados	$<0,1\text{ppm}$
15 – Microorganismos aeróbios viáveis totais	$\leq 10^2 \text{ ufc/mL}$
16 – Carbono Orgânico Total	$< 0,5\text{mg/L}$

Para a água altamente purificada, todas as especificações mostradas na tabela anterior são iguais, excepto a condutividade e os microorganismos aeróbios viáveis totais (respectivamente  $\leq 1,3 \mu\text{S/cm}$  e  $\leq 0.15 \text{ ufc/mL}$ ).[23]

## 3.2 Validação do grau de descontaminação do material de laboratório

Neste item descrevem-se os processos de limpeza, métodos de amostragem e por fim a metodologia adoptada para pesquisa de detergente e substância activa. Esta validação é de elevada importância numa indústria farmacêutica para provar que os processos de limpeza são adequados e eficazes e o material não contém qualquer vestígio de resíduos que influenciem nos ensaios do LCQ.

### 3.2.1 Material

O material seleccionado para validação de limpeza é o material de laboratório utilizado na análise do produto seleccionado como o “*pior caso*”, neste caso, a Nimesulida.

É muito importante saber o tipo de material a utilizar e respectivas características, uma vez que se se tratar de um artigo simples (ex. copo de precipitação ou erlenmeyer), com nenhuma ou poucas áreas onde a contaminação se pode acumular e de fácil limpeza, o risco de contaminação é substancialmente inferior quando comparado, por exemplo, com um balão de 5mL ou um filtro poroso, onde há um excesso de áreas de possível contaminação, podendo tornar a limpeza e eliminação de resíduos difícil. Assim, materiais com cantos ou recantos, e tubos de diâmetro estreito (inclui p. ex. balões e pipetas volumétricas de baixo volume), são considerados como “*pior caso*” e devem ser contemplados neste estudo.

A tabela mostra a listagem de material de laboratório utilizado para a análise de Nimesulida (matéria-prima, comprimidos e pomada), de vidro e inox, e qual o tipo de lavagem que o material foi sujeito.

**Tabela 3.5 - Listagem de material de laboratório usados na análise da Nimesulida (matéria-prima, comprimidos e pomada).**

Material	Tipo de Material	Lavagem	Amostra (Nimesulida)
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	Material de Vidro	Automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Pipeta Graduada escoamento parcial classe A 5 mL	Material de Vidro	Automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Balão volumétrico com rolha classe A 100 mL	Material de Vidro	Manual e automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Balão volumétrico com rolha classe A 20 mL	Material de Vidro	Manual e automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Balão volumétrico com rolha plástico, 10mL.	Material de Vidro	Manual e automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Balão volumétrico com rolha plástico, 5mL	Material de Vidro	Manual e automática	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Copo de Dissolução, 1000 mL	Material de vidro	Manual	Comprimidos
Almofariz	Material de Vidro	Manual	Comprimidos
Copo forma baixa, 100 mL	Material de Vidro	Manual	Matéria-prima, comprimidos e pomada
Filtro de inox	Inox	Manual	Pomada
Holder para seringa	Inox	Manual	Pomada
Espátula Inox 150mm Dupla ponta curva plana	Inox	Manual	Matéria-prima, comprimidos e pomada



Também é importante validar o material utilizado na amostragem da matéria-prima, antes de chegar ao laboratório de controlo de qualidade para serem realizadas as análises. A matéria-prima nimesulida vinda da produção é retirada com uma sonda e essa amostra vai ser passada para frasco que irão para o controlo de qualidade.



**Figura 3.1 - Amostragem da nimesulida (matéria-prima) com o auxílio de uma sonda.**

O tabuleiro de amostragem de inox mostrado na figura 3.2 também tem que ser validado, porque a nimesulida entra em contacto com ele ao ser retirada da sonda para o tabuleiro e depois esta é passada para os frascos.



**Figura 3.2 - Tabuleiro de amostragem da matéria-prima.**

## 3.2.2 Reagentes

Neste ponto são descritos e enumerados as matérias-primas utilizados durante o projecto assim como os reagentes para a análise da formulação.

### 3.2.2.1 Água purificada

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada obtida por osmose inversa (sistema Elix). Daí a importância de validar o sistema de água purificada para *a posteriori* realizar a validação de limpeza. A sua descrição já foi mencionada no capítulo 2.1.

### 3.2.2.2 Agentes de limpeza

A qualificação de um agente de limpeza demonstra que este é apropriado às condições de limpeza, que as superfícies limpas não são afectadas e não são gerados nem transferidos agentes contaminantes.

Para a limpeza do material de laboratório no LCQ BASI utilizam-se diferentes agentes de limpeza de acordo com o tipo de lavagem.

Na lavagem manual o detergente utilizado é Extran MA 03 isento de fosfatos (Merck), caracterizado por ser uma solução aquosa alcalina contendo: agentes tensioactivos aniónicos e não iónicos, agente complexante e hidróxido de sódio. Apresenta-se como um líquido alcalino, isento de fosfatos e cloretos, isento de odores e corantes. A concentração da solução a usar é de 2% v/v em água purificada, isto é, 20 mL/litro; O valor de pH de uma solução a 2% v/v é de pH = 11,6.

Para a lavagem automática é utilizado o detergente Extran AP 15 líquido, alcalino e Detergente Extran AP 22 líquido, acidificado com ácido cítrico.

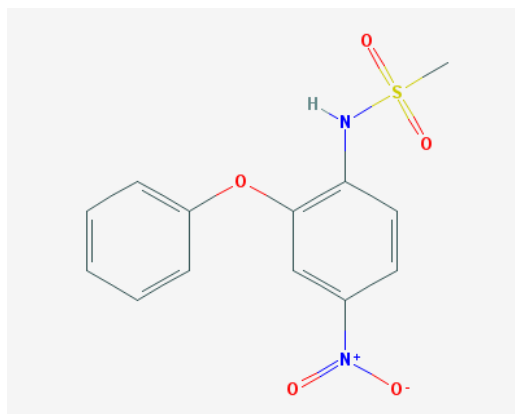
O detergente Extran AP 15 líquido, alcalino (Merck) é composto por uma solução de hidróxido de sódio e agente complexante. Caracteriza-se por ser um agente de lavagem universal, adequado para o ciclo principal de lavagem automática, limpa e remove materiais muito contaminados / sujos. Em virtude de não conter agentes tensioactivos / surfactantes e agentes emulsionantes, caracteriza-se por não criar espuma, mesmo durante agitação forte da solução na máquina de

lavar. A concentração da solução a usar depende do nível de dureza da água de rede e do nível de contaminação / sujidade dos materiais a limpar. A concentração de uso é de 0,3 a 0,5%, i.e. 30 – 50 mL de Extran AP 15 para aproximadamente 10L de água purificada. O valor de pH de uma solução a 0,3% é de pH = 12.2.

O detergente Extran AP 22 líquido, acidificado com ácido cítrico (Merck), contém ácido cítrico, surfactantes não iónicos, baixos níveis de excipientes e é isenta de fosfatos. O Extran AP 22 líquido caracteriza-se por ser um agente ácido de pré-lavagem e agente neutralizante, à base de ácido cítrico. Esta solução de limpeza ácida pode ser utilizada quer como agente de pré-lavagem quer como agente de lavagem com um efeito neutralizante. Quando usado como agente de pré-lavagem, dissolve principalmente carbonatos e hidróxidos dos resíduos presentes. Substâncias proteicas e bases orgânicas, tais como aminas, são normalmente removidas melhor numa pré-lavagem ácida do que num ciclo de lavagem principal alcalino. Como agente de limpeza, i.e. após um ciclo de lavagem principal alcalino, é especialmente adequado para remover vestígios remanescentes de alcalis no material limpo ou, em caso de solução carry-over, para neutralização. Este agente de limpeza ácido é também adequado para a remoção de depósitos calcários nas máquinas de lavar. O produto é recomendado para casos em que condições suaves devem ser mantidas por razões particulares. É adequado de forma particular para remoção suave de depósitos calcários, i.e. nas torneiras ou metal e superfícies de vidro. Adicionado automaticamente por intermédio de um doseador ou de modo manual. Em condições normais, a concentração de uso é de 0,1 a 0,3%, i.e. 10 – 30 mL de Extran AP 22 para aproximadamente 10L de água purificada. O valor de pH de uma solução pronta a usar é de pH = 3,0.[24]

### 3.2.2.3 Nimesulida

A nimesulida é um derivado da sulfonilida cuja fórmula estrutural está mostrada na figura 3.3. O seu nome químico é N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanosulfonamida, com fórmula molecular  $C_{13}H_{12}N_2O_5S$ . [25]



**Figura 3.3 - Estrutura química da Nimesulida.[26]**

Esse fármaco apresenta-se sob a forma de cristais, levemente amarelados, com ponto de fusão cerca de 149 °C e é praticamente insolúvel em água (10 µg/mL). Esta propriedade, associada à sua baixa solubilidade, aumenta as dificuldades na formulação farmacêutica de soluções orais, suspensões, granulados e injectáveis. Porém, é solúvel em solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona e dimetilformamida (DMF).

A nimesulida é um fármaco anti-inflamatório não-esteróide (AINE) que apresenta efeitos anti-inflamatórios, analgésico e antipirético.[28]

A nimesulida é quimicamente diferente dos demais fármacos da sua classe devido ao grupo sulfonamida. Assim como os AINEs, a nimesulida age inibindo a síntese de prostaglandinas via inibição da enzima ciclo-oxigenase. A ciclo-oxigenase produz as prostaglandinas, estando algumas delas implicadas no desenvolvimento e manutenção da inflamação. Este fármaco inibe a produção de radicais livres de oxigénio, que contribuem para a inflamação e dor.[28, 29]

A nimesulida tem sido amplamente utilizada no tratamento de processos inflamatórios, osteoartrite, febre, dor aguda, disminorréia e em infecções do aparelho locomotor.

Neste projecto a nimesulida vai ser estudada na validação da limpeza nas três formas distintas são: matéria-prima, Jabasulide e Reumolide.

Nimesulida Jabasulide é um comprimido amarelo, circular, biconvexo, insípido e inodoro. Cada comprimido de Nimesulida contém 100 mg de substância activa e Reumolide é em forma de gel (30 mg/g).

#### 3.2.2.4 Fase móvel

A fase móvel utilizada no método de substâncias aparentadas da nimesulida em HPLC consiste numa mistura de 35 mL de ACN e 65 mL de uma solução de hidrogenofosfato de amónio R a 1.15 g/L, ajustada a pH 7.0 com amónia R.. A fase móvel obtida é filtrada através de filtro membrana GHP de 47 mm de diâmetro e 0.45 µm de porosidade e desgaseificada sob vácuo.

O acetonitrilo (ACN) em grau gradiente para HPLC é um líquido incolor e solúvel em água, fórmula química  $\text{CH}_3\text{CN}$ , massa molar de 41.05 g/mol e densidade de 0.786 g.cm<sup>-3</sup>.

O dihidrogenofosfato de amónio é um sal anidro cristalino ou em forma de pó, incolor ou branco, fórmula química  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , massa molar 132.05 g/mol, densidade 1.619 g/cm<sup>3</sup> e pH entre 7.6 - 8.2. E a amónia a 25% utilizada é fortemente alcalina de modo ajustar o pH da fase móvel.

#### 3.2.2.5 Solução teste

Para um balão de 20 mL dissolveu-se 20 mg de nimesulida padrão, juntou-se 8 mL de ACN e levou-se 10 minutos ao ultrassons. Depois de agitar novamente fez-se o volume com água purificada do sistema Elix (C= 1 µg/mL). De acordo com a solução teste da farmacopeia europeia, nimesulida.

#### 3.2.2.6 Solução teste diluída

Diluiu-se 0.5 mL de solução teste para um balão de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel.

#### 3.2.2.7 Solução padrão a 100%

Para um balão de 10 mL, retirou-se 1 mL da solução teste diluída e completou-se o volume com fase móvel.

### 3.2.3 Processo de limpeza

Os processos de limpeza devem seguir métodos de execução cuidadosamente elaborados, estabelecidos e validados para que os níveis de contaminação estejam dentro de limites aceitáveis pré-estabelecidos.

Para limpeza do material de laboratório são utilizados dois tipos de processos de limpeza, lavagem manual e lavagem automática.

No presente estudo vão ser comparados os métodos de lavagem manual *versus* automático, para o produto seleccionado, a Nimesulida, de modo a poder confirmar que ambos os processos são adequados, eficazes e permitem obter o fim proposto: demonstrar que os resíduos de produto seleccionado estão dentro dos limites de aceitação.[30, 31] Todo o material deve ser lavado à parte do restante material de laboratório para não haver contaminação, incluindo na utilização de uma esponja nova.

#### 3.2.3.1 Lavagem manual

A limpeza do material de laboratório é executada de acordo com uma instrução de trabalho “Limpeza de Material de Laboratório”.

Esta lavagem requer a limpeza directa do material, por um operador treinado, com recurso a meios manuais e o agente de limpeza Extran MA 03 isento de fosfatos, a 2% v/v em água purificada, isto é, 20 mL/litro. Depois da lavagem com o detergente, o material é passado com água de rede corrente e seguido de três passagens com água purificada. Por fim, o material é seco a 60°C na estufa.

O controlo da limpeza é garantido pelo treino do operador e consiste num exame visual.

#### 3.2.3.2 Lavagem automática

Em termos operativos, encontra-se descrito na instrução de trabalho “Limpeza de material de laboratório” o procedimento operativo e modo de utilização da máquina de lavar de material de laboratório existente no Laboratórios FQ Basi S.A.

Para este tipo de lavagem não envolve a intervenção directa dos operadores no processo de limpeza. A intervenção do operador apenas é necessária para iniciar, parar e acompanhar as diversas fases do processo. Este faz a selecção do material adequado que pode ir à máquina de lavar e no fim da lavagem retira o material da máquina e coloca-o na estufa a 60°C. A máquina de lavar o material de laboratório foi a MIELABOR, modelo G7883 CD.

Em termos de lavagem automática, a selecção do programa de lavagem é feito consoante as características do produto e material a lavar (i.e. tipo de material e grau de sujidade); O programa seleccionado foi o programa A, com as seguintes características abaixo indicadas na tabela 3.6.

**Tabela 3.6 – Procedimento de lavagem de material volumétrico designado por Programa 1 (A).**

<b>Programa 1 (A) – Lavagem de Material Volumétrico</b>
<b>Pré-lavagem:</b> Água de rede; fria; 1 minuto.
<b>Lavagem Principal:</b> Solução a 0,35% de Extran® AP 15 líquido, alcalino (Merck); água quente; 60°C; 5 minutos.
<b>Neutralização:</b> Solução a 0,10% de Extran® AP 22 líquido, neutralizante ácido (Merck); água quente
<b>Lavagem 1:</b> Água de rede; água quente.
<b>Lavagem 2:</b> Água purificada.
<b>Lavagem Final:</b> Água purificada; 60°C; 3 minutos.
<b>Secagem Inicial:</b> 60°C; 30 minutos.
<b>Secagem final:</b> 60°C; 35 minutos.

### 3.2.4 Método de amostragem

Com o objectivo de avaliar o método de limpeza, é necessário fazer uma amostragem da substância activa e estabelecer o nível de resíduos presentes. A escolha dos métodos de amostragem e análise depende do tipo de material.[7]

Geralmente há dois tipos de amostragem que são aceites, o método de amostragem directo na superfície do material, e outro método por enxaguamento.

#### 3.2.4.1 Enxaguamento

Após lavagem, o enxaguamento refere-se a adição de um solvente adequado para solubilização do princípio activo, neste caso, será o ACN, no material. Em inglês é comumente referida como post

final rinse, ou seja, solvente seguinte à água utilizada na última lavagem Deve-se utilizar o menor volume de enxaguamento possível.

### 3.2.4.2 Esfregaço

O método de esfregaço, traduzido do inglês *swab*, é uma técnica de amostragem amplamente utilizada, [32] e aplica-se quando se pretende amostrar uma determinada área específica. Este método de amostragem deverá ser feito por esfrega com a ponta de algodão da zaragatoa, completamente embebido (sem derramar/pingar) no solvente mais adequado para solubilizar a substância (neste caso, o ACN), numa área amostrada delimitada [33] do material definido para o efeito. A esfrega também deve ser realizada de forma padronizada sempre com os mesmos movimentos (figura 3.4), à mesma velocidade e durante o mesmo período de tempo (1 minuto).

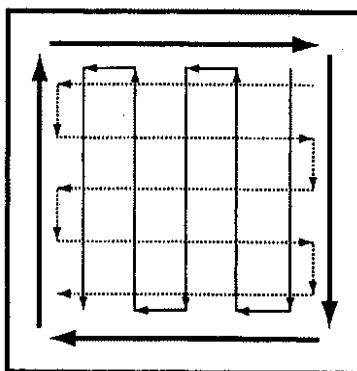


Figura 3.4 - Esquema representativo do procedimento de amostragem (esfregaço) para verificação de limpeza da substância activa no material que se pretende avaliar.

No presente estudo devem ser pesquisadas substâncias activas, eventuais impurezas associadas, bem como a presença de detergente.

Com base nos dados existentes, avaliados nos pontos anteriores concluiu-se que as substâncias às quais poderá estar associado um maior risco e que devem ser contempladas na validação da limpeza são: matéria-prima, comprimidos (Jabasulide) e pomada (Reumolide), como mostra o organograma seguinte.



### 3.2.5 Ensaio a realizar

No presente estudo devem ser pesquisadas substâncias activas eventuais impurezas associadas, bem como a presença de detergente.

Com base nos dados existentes, avaliados nos pontos anteriores concluiu-se que as substâncias às quais poderá estar associado um maior risco e que devem ser contempladas na validação da limpeza são: matéria-prima, comprimidos (Jabulide) e pomada (Reumolide), como mostra o organograma seguinte.

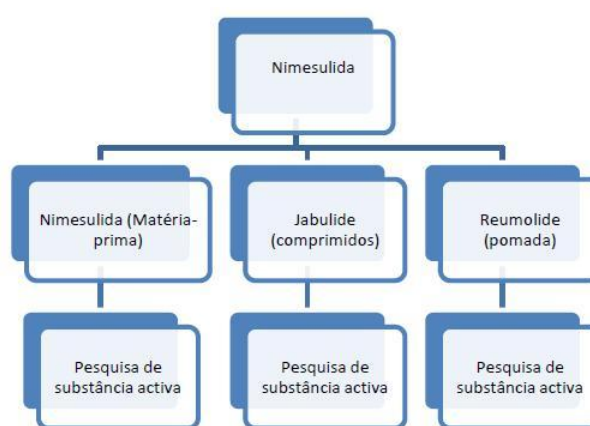


Figura 3.5 - Organograma dos diferentes tipos de nimesulida para análise da substância activa.

#### 3.2.5.1 Pesquisa de detergente

Para confirmar se o material está convenientemente lavado e sem resíduos de detergente, deve-se medir o pH, a condutividade e a quantidade de carbono orgânico total (através da análise TOC) da água purificada da última lavagem de todo material.

A pesquisa de resíduos de detergente é realizada ao material de laboratório após limpeza manual e automática (3.2.2.1 e 3.2.2.2) e depois de seco na estufa a 60°C. A tabela 3.7 apresenta o procedimento de amostragem em cada tipo de material seleccionado da nimesulida matéria-prima.

Tabela 3.7 - Procedimento de amostragem para pesquisa de detergente da Nimesulida (matéria-prima).

Material de Amostragem	Método de amostragem	Procedimento de amostragem
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.
Pipeta graduada escoamento parcial cl- A, 5 mL	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.
Balão volumétrico com rolha classe A, 100 mL	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 50 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 50 mL em frasco âmbar.
Balão volumétrico com rolha plástico, 5mL	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.
Tabuleiro	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.
Holder + filtro	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.
Sonda	<i>Enxaguamento</i>	Recolher 25 mL da água de lavagem para análise de pH, condutividade. Para análise de TOC serão recolhidos 25 mL em frasco âmbar.

Todas estas soluções serão submetidas à realizando de três determinações para cada tipo de material em cada ensaio, e a um branco contendo 250 mL de água purificada.

Para a lavagem automática deve-se realizar os mesmos ensaios de pH, condutividade e TOC para a pesquisa de detergente dos balões com volume mínimo que possam ser lavados na máquina de lavar.

Como critério de aceitação, o pH da última água purificada de enxaguamento deve estar compreendido entre 5 e 7, a condutividade da última água purificada de enxaguamento deverá ser inferior a 4,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (a 20°C) e o TOC deverá ser superior a 500ppb.

### 3.2.5.2 Pesquisa de microorganismos

Para quantificar, identificar bactérias e endotoxinas associadas ao material de laboratório procede-se à contagem microbiológica.

O material de laboratório é submetido ao procedimento de lavagem manual ou automática e amostragem de água para avaliação microbiológica será com água estéril a seguir à última água de lavagem (enxaguamento). Cerca de 25 mL dessa água é filtrada para o meio de cultura Agar

Reasoner's 2A (R<sub>2</sub>A) e para o meio Agar caseína de soja (TSA) e/ou é realizada outro tipo de amostragem, com uma zaragatoa e de seguida inocular nos mesmos meios. A contagem microbiológica foi realizada pelos analistas do laboratório de microbiologia BASI.

São seguidas as especificações da última edição da Farmacopeia Portuguesa para a água purificada a granel. Em condições normais é considerado como limiar de intervenção apropriado um número de germes aeróbios viáveis totais de 100 ufc/ml.

### 3.2.5.3 Curva de calibração

A substância activa é quantificada por uma metodologia analítica em cromatografia líquida (HPLC) que deve ser devidamente validada, com maior sensibilidade disponível (e consequentemente menor limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)).

Deverá ter-se em especial atenção a validação dos limites de detecção e de quantificação, até porque o limite de detecção do método deve ser o critério de aceitação a estabelecer para a pesquisa de resíduos de substância activa. A validação de limpeza normalmente está associada a baixos limites de aceitação, dificultando por vezes o desempenho do método. Deste modo o limite de aceitação adoptado para o contaminante deve estar dentro do limite de quantificação da metodologia adoptada.

Utilizam-se, inicialmente, padrões de concentração conhecida testando a resposta do equipamento que fará a quantificação. As curvas de calibração são preparadas a partir das soluções padrão, utilizando diluições sucessivas para cada concentração.

Os padrões da curva de calibração devem ser preparados com o máximo rigor analítico possível para que, desta forma, a sua fonte de erro associada seja desprezável quando comparada com o erro da variável dependente. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear.

O limite de detecção (XLD) corresponde á menor quantidade de analito que é possível detectar com uma certa confiança estatística, mas não necessariamente quantificar. Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco. Através da estimativa com base no desvio padrão residual ( $\delta_{fit}$ ) do ajuste da curva de calibração através de mínimos quadrados e m o declive da curva de calibração, o limite de detecção é determinado pela equação 3.1:

$$X_{LD} = 3.3 X \frac{\delta_{fit}}{m} \quad (3.1)$$

O limite de quantificação ( $X_{LQ}$ ) corresponde à menor concentração de analito que é possível quantificar com precisão e exactidão definidas e nas condições de operação especificadas. Através da estimativa com base no desvio padrão residual ( $\delta_{fit}$ ) do ajuste da curva de calibração através de mínimos quadrados e  $m$  o declive da curva de calibração, o limite de quantificação é determinado pela equação 3.2:

$$X_{LQ} = 10 X \frac{\delta_{fit}}{m} \quad (3.2)$$

Prepararam-se seis padrões com concentrações diferentes como mostra a tabela 3.8, e a partir das condições das soluções teste 3.2.2.5, mencionadas na monografia da nimesulida da Farmacopeia europeia.

**Tabela 3.8 - Concentrações dos padrões para curva de calibração.**

<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	
<b>P1</b>	1
<b>P2</b>	0.75
<b>P3</b>	0.6
<b>P4</b>	0.5
<b>P5</b>	0.4
<b>P6</b>	0.25

#### **3.2.5.4 Pesquisa de substância activa**

De seguida passaremos aos respectivos ensaios para pesquisa de substância activa para cada tipo de Nimesulida.

Para se compreender melhor todo o procedimento realizado para a pesquisa de substância activa, o organograma da figura 3.6 mostra em esquema os passos executados tendo em conta a escolha do processo de lavagem (manual ou automática), com e sem passagem de acetona.

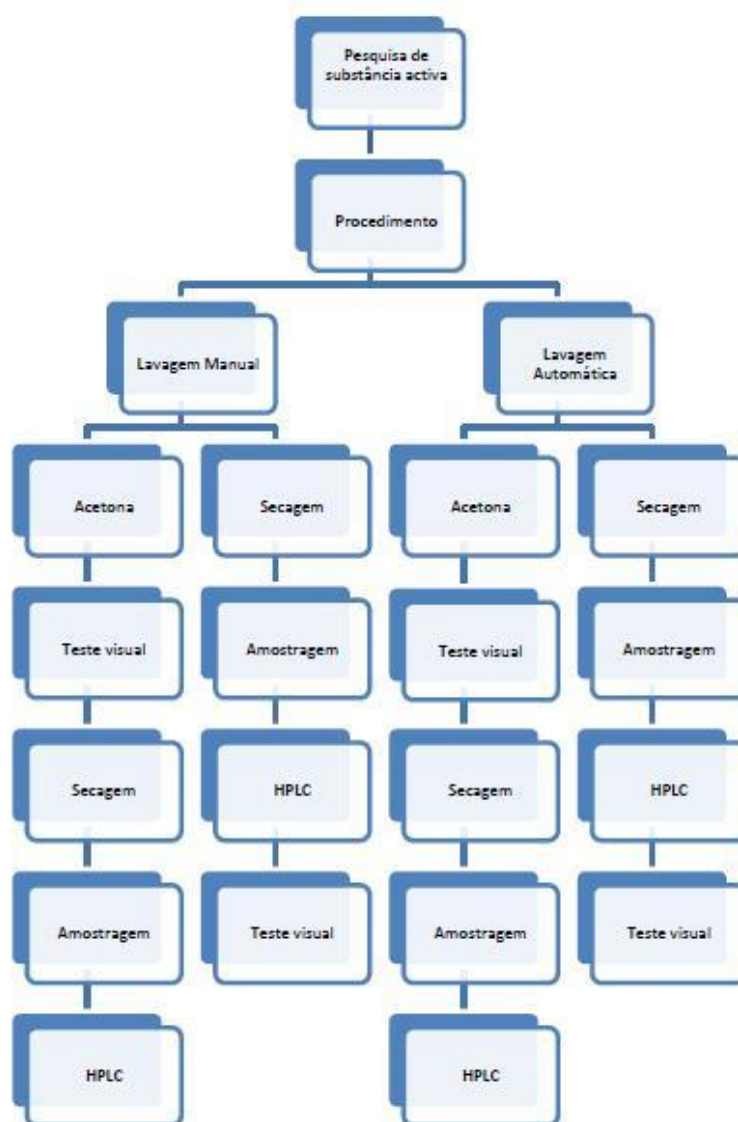


Figura 3.6 - Organograma do procedimento com e sem passagem de acetona na pesquisa de substância activa.

Em ambos os processos de lavagem desenvolveram-se duas estratégias distintas designados de sem acetona e com passagem de acetona. Como a acetona é o solvente que a nimesulida é solúvel, o objectivo foi provar se esse solvente ajuda na remoção total dos vestígios de nimesulida ou se, por sua vez, a sua passagem no material é meramente visual devido ao aparecimento da cor amarela indicativo da presença da nimesulida.

**SEM ACETONA**

Selecionou-se o material que é usado nas substâncias aparentadas da Nimesulida, este “sujo” com uma solução de maior concentração, a solução teste (concentração a 1 µg/mL). Esse material é lavado manualmente usado conforme descrito no processo de limpeza (ponto 3.2.3) e seco em estufa a 60°C, sem passagem com acetona ou etanol.

Como cada material tem um método de amostragem, enxaguamento e/ou esfregaço, a tabela seguinte mostra o procedimento de amostragem para pesquisa de substância activa da nimesulida.

**Tabela 3.9 - Procedimento de amostragem para pesquisa da substância activa da Nimesulida (matéria-prima) – após lavagem manual.**

<b>Material de Amostragem</b>	<b>Processo de lavagem</b>	<b>Método de amostragem</b>	<b>Procedimento de amostragem</b>
Balão volumétrico com rolha cl-A, 20 mL	<i>Manual e automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Balão volumétrico com rolha cl-A, 10 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Balão volumétrico com rolha cl-A, 5 mL	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Espátula inox	<i>Manual</i>	<i>Esfregaço</i>	Realizar o esfregaço como indicado em 5.5.2 e diluir em 10 mL de fase móvel.
Tabuleiro	<i>Manual</i>	<i>Esfregaço</i>	Realizar o esfregaço como indicado em 5.5.2 e diluir em 10 mL de fase móvel.
Tabuleiro	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 8 mL de ACN no material, recolher para um balão de 20 mL e completar com água
Sonda	<i>Manual</i>	<i>Esfregaço</i>	Realizar o esfregaço como indicado em 5.5.2 e diluir em 10 mL de fase movél.
Sonda	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 2 mL de ACN no material, recolher para um balão de 5 mL e completar com água
Pipeta Graduada escoamento parcial cl-A, 5 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água

Como as áreas de amostragem por esfregaço têm que ser delimitadas, estas são indicadas na tabela 3.10.

Tabela 3.10 - Áreas de amostragem

Material de Amostragem	Área total (cm <sup>2</sup> )	Área de amostragem (cm <sup>2</sup> )
Tabuleiro	5200	25
Espátula	3	2
Sonda	857.5	16

Todas as amostras recolhidas, serão doseadas por HPLC, de modo a pesquisar a presença de algum resíduo de composto. Como modo de comparação preparou-se adicionalmente a solução padrão a 100% (3.2.2.7).

O método utilizado é o das substâncias aparentadas, da monografia da nimesulida da farmacopeia europeia.

Por fim, esse material contaminado é recolhido para proceder ao teste visual, que consiste na passagem com acetona no material depois de utilizado. Assim, verifica-se a ausência de coloração amarela (acetona caracteriza-se por ser um líquido límpido e incolor), permitindo assim confirmar visualmente a ausência de resíduos de substância activa no material utilizado.

### **COM PASSAGEM DE ACETONA**

Na estratégia com passagem de acetona, após lavar o material manualmente usado nos ensaios da Nimesulida, o teste visual é logo realizado para verificação da ausência de coloração amarela e permitindo assim confirmar visualmente a ausência de resíduos de substância activa nesse material. Só depois o material é seco na estufa a 60°C e procede-se à amostragem e análise em HPLC. Através do organograma da figura 3.5 é mais simples perceber a sequência dos passos nas duas estratégias.

Para os comprimidos Jabasulide o procedimento com a lavagem manual, sem e com passagem de acetona é exactamente igual à matéria-prima apresentado no ponto anterior. No entanto, o que difere é o tipo de material de amostragem, devido à sua selecção ser de acordo com o material usado nos ensaios respectivos de Jabasulide. A tabela seguinte mostra o tipo de material que tem um método de amostragem, enxaguamento e/ou esfregaço e o respectivo procedimento de amostragem, e processo de lavagem.

Tabela 3.11 - Procedimento de amostragem para pesquisa da substância activa da Nimesulida (comprimidos).

Material de Amostragem	Processo de lavagem	Método de amostragem	Procedimento de amostragem
Balão volumétrico com rolha cl-A, 20 mL	<i>Manual e automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Balão volumétrico com rolha cl-A, 5 mL	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Almofariz	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 10 mL de ACN no material, recolher para um balão de 25 mL e completar com água
Espátula inox	<i>Manual</i>	<i>Esfregaço</i>	Realizar o esfregaço como indicado em 5.5.2 e diluir em 10 mL de fase móvel.
Copos de dissolução	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 10 mL de ACN no material, recolher para um balão de 25 mL e completar com água
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 2 mL de ACN no material, recolher para um balão de 5 mL e completar com água
Pipeta Graduada escoamento parcial cl-A, 5 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água

A área de amostragem da espátula ao utilizar o método de amostragem esfregaço foi de 2 cm<sup>2</sup> correspondente à parte plana da espátula que entra em contacto com a nimesulida.

Para a pomada Reumolide o procedimento é exactamente igual à matéria-prima, sem e com passagem de acetona. No entanto, o que difere é o tipo de material de amostragem, devido à sua selecção ser de acordo com o material usado nos ensaios respectivos do Reumolide. A tabela seguintes mostram o tipo de material seleccionado para o Reumolide, o método de amostragem utilizado, enxaguamento e/ou esfregaço, e o respectivo procedimento de amostragem.

Tabela 3.12 - Procedimento de amostragem para pesquisa da substância activa da Nimesulida (pomada).

Material de Amostragem	Processo de lavagem	Método de amostragem	Procedimento de amostragem
Balão volumétrico com rolha cl-A, 50 mL	<i>Manual e automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Balão volumétrico com rolha cl-A, 5 mL	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 2 mL de ACN no material, recolher para um balão de 5 mL e completar com água
Espátula inox	<i>Manual</i>	<i>Esfregaço</i>	Realizar o esfregaço como indicado em 5.5.2 e diluir em 10 mL de fase móvel.
Filtro inox	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Holder para seringa	<i>Manual</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 2 mL de ACN no material, recolher para um balão de 5 mL e completar com água
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 5 mL	<i>Automática</i>	<i>Enxaguamento</i>	Passar 4 mL de ACN no material, recolher para um balão de 10 mL e completar com água



### 3.2.6 Determinação da Taxa de Recuperação

O factor de recuperação é um parâmetro utilizado para se avaliar a eficiência do processo de amostragem, a fim de demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados da superfície dos materiais utilizados. O método analítico deve demonstrar o nível de recuperação do resíduo (percentagem do resíduo que pode ser recuperada do meio em que se encontra), e a sua consistência (dispersão dos valores encontrados para amostragens repetidas, feitas sob a mesma condição).

O produto deverá ser recuperado com as mesmas técnicas de amostragem para o caso real, sendo o material “sujo” com o mesmo produto nas condições mais próximas e possíveis das reais. Como não é viável a utilização do material ou suas partes para a avaliação da recuperação foi utilizada uma peça de material semelhante com dimensões estabelecidas  $5 \times 5 \text{ cm}^2$  (área total e de amostragem  $25 \text{ cm}^2$ ), como mostra a figura 3.7.



**Figura 3.7 - Tabuleiro para calcular a taxa de recuperação.**

Colocou-se o menor volume possível da solução teste no tabuleiro igual ao da figura acima indicado e deixa-se evaporar todo o solvente de modo a finar no tabuleiro apenas o resíduo de nimesulida. Para ajudar a evaporar colocou-se o tabuleiro na estufa a  $60^\circ\text{C}$ , sendo essa a temperatura máxima para não degradar a Nimesulida. Com a zaragatoa retira-se a nimesulida do tabuleiro e coloca-se a zaragatoa num balão contendo ACN. De seguida as amostras são feitas de igual modo como no indicado no método de amostragem esfregaço (3.2.4.2) para análise de HPLC. Esses resultados são depois comparados com a solução padrão com uma concentração igual à minha amostra.

Esta determinação é feita em triplicado, devendo a taxa de recuperação ser superior a 60% da quantidade teórica para que se considere a técnica como adequada.

A recuperação é calculada utilizando a seguinte expressão, em que o *WP* corresponde à quantidade de composto na amostra no esfregaço, o *A* é a área total da superfície do equipamento e o *AP* a área da superfície do esfregaço.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{WP \cdot A}{AP} \quad (3.3)$$

### 3.3 Validação do grau de descontaminação dos vials

O objectivo é descrever as metodologias a levar a cabo para a validação da limpeza dos Vials utilizados para análise TOC nos Laboratórios Basi, de forma a demonstrar que estes podem ser reutilizados em análises posteriores após lavagem, caso sejam tratados de acordo com a instrução de trabalho “Limpeza de material de laboratório” ou com o reagente ácido crómico.

Neste sentido, serão feitas análises de TOC, depois de executado alguns métodos de lavagem, de forma a assegurar os limites baixos de carbono comparando com resultados dos vials novos.

#### 3.3.1 Materiais e equipamentos

Esta validação é realizada para a limpeza do seguinte material: vials para TOC, parafilm e um copo 500 mL e o analista convém usar luvas, sem pó e óculos de protecção. Os vials são frascos de vidro de 40 mL da VMR, com tampa e septos de teflon revestidos de polipropileno de acordo com as normas internacionais.

A água altamente purificada obtida no equipamento Integral 3 do sistema Elix foi a matéria-prima utilizada na validação que contém menos de 100 ppb de Carbono total ou inorgânico.

Para realização das análises utilizou-se o equipamento TOC, Sievers 900 Instruments, Inc.

### 3.3.2 Cuidados e precauções

Ao analisar amostras nos vials para o carbono total, pode ocorrer contaminação de base de várias fontes diferentes. Uma das maiores contribuições pode vir directamente da fonte de água.[35] Por isso deve-se: esperar até passar vários volumes e limpar a linha de água do Q-POD antes de recolher uma amostra. A água utilizada no preparo das soluções foi classificada como ultrapura (TOC<100 ppb) e obtida pelo sistema da Milli-Q da Millipore.

A segunda maior fonte de contaminação pode ser proveniente da limpeza de vials. Para determinar o grau inicial de TOC, deve-se usar um procedimento de limpeza agressivo. Um método que é amplamente utilizado na indústria farmacêutica para limpar material de vidro de laboratório é uma solução de ácido crómico.

O terceiro passo na redução da contaminação por carbono é observar estritamente a técnica de preparação da amostra e ambiente. Evitar recolher as amostras num ambiente em que alguns solventes, como o etanol, tenham sido utilizados, pois influencia nos resultados.

Manipulação do equipamento que entram em contacto com as amostras é um desafio especial, porque a contaminação de carbono orgânico é, essencialmente, em todos os lugares.

A quantidade de contaminação de carbono pode ser um reflexo do grau de contacto com as mãos sujas ou superfícies durante a preparação da amostra. Por isso deve-se colocar luvas novas de modo a evitar contaminação, evitar o contacto da ponta do vial no equipamento Q-POD, tapar o vial sempre o mais rápido possível, evitar manipulação de pipetas, outros materiais, e equipamentos que entram em contacto directo com a amostra. Assim, deve-se fazer a amostragem e leitura directamente no vial.

### 3.3.3 Selecção do agente de limpeza

Em termos de detergente, a selecção feita tem como base o tipo de lavagem. Neste caso, vai-se tentar validar para a lavagem manual com o detergente Extran MA 03 isento de fosfatos e a lavagem com o ácido crómico.

### 3.3.3.1 Lavagem com detergente isento de fosfatos

O detergente Extran MA 03 isento de fosfatos que será agora utilizado na lavagem manual dos vials do TOC é o mesmo detergente que é referido no 3.2.2.2 para a lavagem manual do material de laboratório. A limpeza dos vials vai ser executada da mesma forma que o processo de limpeza manual, referido no ponto 3.2.3.1, no entanto é necessário alguns cuidados específicos para este procedimento, tais como: utilizar luvas lavadas, isolar os vials do TOC do resto de material de laboratório e proceder à sua lavagem manual separadamente do resto de material de laboratório, de modo a evitar qualquer tipo de contaminação. Ao enxaguar com água deve-se evitar tocar com a extremidade dos vials em qualquer superfície ou utilizar esponja ou escovilhão e no fim de passar com água altamente purificada antes da secagem a 60°C na estufa. Após estarem completamente secos e arrefecidos, os vials devem ser tapados imediatamente. É muito importante considerar todos os cuidados e precauções referidos (3.3.2).

### 3.3.3.2 Ácido crómico

O agente de limpeza utilizado neste estudo é o ácido crómico-sulfúrico da Prolabo, composto por >85% de ácido sulfúrico e 1-2,5 % de trióxido de crómico.

É preciso ter extremo cuidado ao manusear este reagente, pois ele é tóxico, corrosivo e nocivo e pode provocar efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada por inalação e em contacto com a pele. Por isso deve ser manuseado na hotte, usar luvas e óculos de protecção.

O ácido crómico-sulfúrico não deve ser diluído com água, devido à grande quantidade de calor gerado na mistura do ácido com a água que pode originar salpicos são fortemente corrosivos. Outro cuidado a ter em consideração será guardar a solução num armário específico de armazenamento de produtos químicos, protegido da luz solar directa e os desperdícios devem ser despejados para um local apropriado para o mesmo, visto que o ião dicromato interfere com os procedimentos de tratamento de água municipal.[35]

De seguida apresenta-se a descrição do processo de limpeza dos vials com ácido crómico:

Colocou-se seis vials usados dentro do copo de 500 mL, dispondo a abertura do vial voltada para cima e encheu-se o vial com alguns mililitros da solução de limpeza de ácido crómico. Esta solução deve ser agitada lentamente, para permitir que a solução entre em contacto com todas as superfícies internas e cobrir a parte superior do copo com o lado limpo de parafilme (lado do

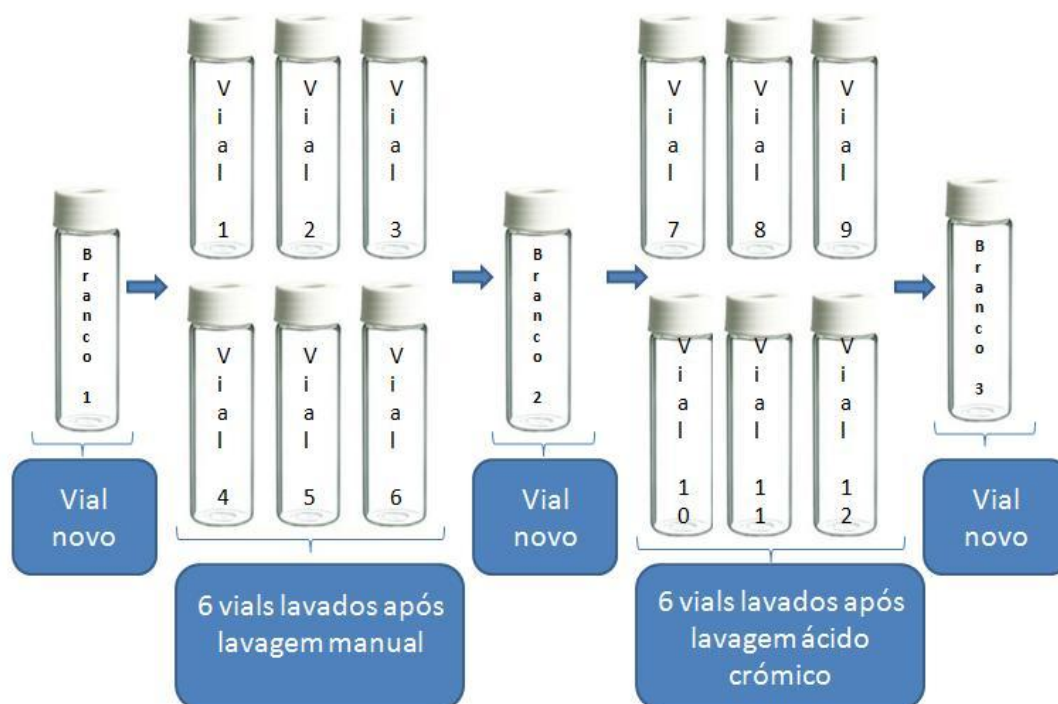
parafilme protegido pelo papel) com o canto de parafilme na ponta do copo dobrado para permitir a solução de limpeza drene para fora.[37]

Encher completamente cada vial no copo com água de baixo TOC (altamente purificada) e inverter o copo para permitir que a água esorra para fora de ambos, copo e cada vial, usando o parafilme para evitar que os vials caíam. (Permite apenas que o parafilme entrar em contacto com a ponta dos vials, pois qualquer outro contacto pode causar contaminação) e repetir o passo anterior cerca de 20 vezes. Para o escoamento completo, inverter o copo pelo menos 10 minutos e abrir um canto do parafilme para escoamento de toda a água adicional dos vials e do copo. Repetir os passos anteriores até que toda a água seja escorrida de ambos o copo e os vials.[36]

Os vials devem ir à estufa a 60°C e devem ser usados dentro de 24 horas de limpeza, de preferência fazer a análise do TOC após secagem.

### **3.3.4 Análise de TOC**

Após a lavagem dos vials deve-se colocar luvas novas de modo a evitar contaminação, deixar correr água do Q-Pod e depois encher cada vial com a água altamente purificada de baixo IC e TC. Colocar cada vial no analisador de TOC com a seguinte ordem de leitura dos vials (Figura 3.8). Deste modo pode-se comparar os valores da água altamente purificada num vial novo (branco) antes e após cada enchimento dos seis vials com cada método.



**Figura 3.8** - Esquema da análise de TOC dos vials com o branco e as amostras após a lavagem manual e com ácido crómico.

Todo o processo é repetido 3 vezes em 3 dias consecutivos (lavagem e análise). O analisador de TOC expressa os resultados em ppb e após os resultados deve-se comparar com os vials novos. Os frascos de TOC 40 mL são certificados pela marca Sievers para serem inferiores a 10 ppb, dando-lhe confiança na qualidade das suas medições TOC.

### 3.4 Tratamento estatístico de dados

Os testes estatísticos servem para auxiliar na tomada de decisões e interpretação dos resultados tendo em conta alguns critérios. Qualquer teste estatístico depende do nível de confiança ao qual se pretende tirar conclusões e do número de graus liberdade em cada caso específico.[38]

Em quase todos os estudos, são feitas análises estatísticas para uma melhor interpretação dos dados obtidos.

### 3.4.1 Diagnóstico de valores discrepantes

Tal como com o comportamento não aleatório, uma única referência que se afaste substancialmente da série de dados, um outlier, assim designado, pode afectar os resultados obtidos. São valores discrepantes que não pertencem a uma determinada distribuição. Assim, para evitar este efeito de má estimativa, é essencial que, inicialmente, qualquer conjunto de dados seja testado antes de se proceder a uma estimativa. Diversos testes estatísticos podem ser efectuados sendo os mais significativos os que comparam a posição do valor duvidoso em relação à estimativa central.[39]

De entre os testes mais utilizados conta-se o teste de Grubbs, recomendado pelas normas ISO. O teste de Grubbs é um teste estatístico, utilizado essencialmente para analisar a dispersão de valores dentro de uma dada medição. De uma forma geral, pretende verificar a existência de valores discrepantes nas extremidades do conjunto, ou seja, ou valores suspeitos corresponderão a máximos ou a mínimos da medição.

Ao se realizar uma primeira análise e for detectado um dos dois valores discrepantes, ele será automaticamente excluído do conjunto; de seguida novo teste será efectuado até que não se verifique a existência de mais nenhum outlier.

Durante esta análise, os valores dos extremos serão comparados com o valor médio ( $\bar{x}$ ) dividido pelo respectivo desvio padrão ( $s$ ), de acordo com a seguinte equação (3.4) a seguir representada:

$$G = \frac{|x^? - \bar{x}|}{s} \quad (3.4)$$

De seguida compara-se este valor ( $G$ ) com um valor crítico ( $G_{crit}$ ) tabelado da norma ISO 5725, (tabela A2.2 em anexo) para um intervalo de confiança de 95%. Caso o  $G$  seja superior ao valor crítico, então estamos na presença de um outlier e é necessário eliminar esse valor, de modo a que este não influencie incorrectamente os resultados e tratamentos estatísticos.[38, 41, 42]

### 3.4.2 Comparação de métodos

Num estudo emparelhado, temos duas amostras mas cada observação da primeira amostra é emparelhada com uma observação da segunda amostra. O teste apropriado para a diferença entre

medidas de amostras emparelhadas consiste em determinar, primeiro, a diferença entre cada par de valores e então testar se a medidas das diferenças é igual a zero, onde:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_1 + d_2 + \dots + d_n}{n} \quad \text{e} \quad s_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2}{n-1}} \quad (3.5 \text{ e } 3.6)$$

Considerando que as medidas tenham distribuição o normal, a diferença entre elas também terá distribuição normal, portanto as distribuições t são apropriadas para testar a hipótese nula de que a média das diferenças é igual a zero. Os graus de liberdade são o número de unidades amostrais menos 1 e a estatística utilizada para testar a hipótese de que não existe diferença entre as condições antes e depois é: Este teste é referido como teste t-student emparelhado (equação 3.7).

$$TV = \frac{|\bar{d}-0|}{s_d/\sqrt{N}} = \frac{|\bar{d}|\cdot\sqrt{N}}{s_d} \quad (3.7)$$

Para tal podemos realizar um teste de significância em que testamos a verdade de uma hipótese, nomeada de hipótese nula. Assim, se a hipótese nula for confirmada, significa que a diferença entre um valor medio e o valor crítico, não é significativa. Apesar de o critério de aceitação da hipótese nula diferir de acordo com a situação e significância pretendida, geralmente aceita-se a hipótese nula ao nível de confiança de 95%.

### 3.4.3 Análise da variância

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada.

A ANOVA permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatória e a contribuição sistemática entre amostras. Deste modo, permite verificar se as amostras (ou factores) exercem um efeito significativo fazendo com que estes se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si.

A ANOVA permite comparar em simultâneo várias médias (níveis diferentes do factor) e estimar as diversas contribuições de variabilidade: a puramente aleatória (estimada dentro de cada amostra), a variabilidade entre amostras, entre outros.



Como pressupostos assume-se que as distribuições em causa são normais e independentes e que existe homogeneidade de variância (variabilidade interna).

A ANOVA é algo insensível à falta de homogeneidade da variabilidade interna, contudo, por motivos de melhor racionalização dos valores em análise deve ser sempre efectuado previamente um teste de homogeneidade.

A análise de variância apresenta inúmeras aplicações, nomeadamente, na amostragem, limite de repetibilidade e de reprodutibilidade, planeamento experimental e análise de factores, estudo de interferentes, robustez e coerência e na validação do modelo de calibração.

Existem três abordagens diferentes desta análise: ANOVA de uma via ou de factor único, ANOVA de duas vias ou de dois factores sem réplicas e com réplicas.

### 3.4.3.1 Factor único

A ANOVA de factor único estuda o efeito de um factor (aqui designado A) sobre a variabilidade do sistema em análise. Segundo esta abordagem estatística, a soma de quadrados total ( $SS_T$ ) pode ser decomposta nas componentes puramente aleatória ( $SS_{pe}$ ) e na componente devida ao factor ( $SS_A$ ),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A \quad (3.8)$$

Dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade,  $(N.M-1)$ ,  $(N(M-1))$  e  $(N-1)$ , obtêm-se as variâncias totais, puramente aleatória e devida ao factor

$$\delta_T^2 = \delta_{pe}^2 + \delta_A^2 \quad (3.9)$$

O teste ANOVA pretende verificar se o factor em causa (A) é responsável por introdução de variabilidade nos dados além da contribuição puramente aleatória.

No caso de o factor não possuir efeito, a contribuição do factor em causa aproxima-se da componente puramente aleatória; caso contrário o factor manifestasse através da sua contribuição específica ( $\delta_A^2$ ), sendo esta superior à contribuição aleatória.

A hipótese nula ( $H_0$ ) vai no sentido de que o factor não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada, enquanto a hipótese alternativa ( $H_1$ ) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados.

O valor de prova ( $\alpha = p[H_0]$ ) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor. Valores de prova superiores a 0.05 indicam franca aceitação de  $H_0$  enquanto valores inferiores a 0.01 sugerem a sua rejeição. Valores intermédios revelam que a aceitação de  $H_0$  é dúbia podendo ser utilizado o valor de referência de 0.03 como termo de desempate - superior a 0.03 aceitação dúbia, inferior a 0.03 rejeição dúbia.

### 3.4.3.2 Factor duplo sem réplicas

Esta abordagem destina-se a verificar o efeito simultâneo de dois factores. Neste caso em concreto, a ANOVA permite a decomposição da variabilidade total (T) em três componentes: a puramente aleatória ( $pe$ ), a devida ao factor linha (factor A) e a devida ao factor coluna (factor B) de acordo com a equação,

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B \quad (3.10)$$

dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade ( $N \cdot M - 1$ ),  $N(M - 1)$ ,  $(N - 1)$  e  $(M - 1)$  obtêm-se a equação,

$$\delta_T^2 = \delta_{pe}^2 + \delta_A^2 + \delta_B^2 \quad (3.11)$$

permitindo a individualização de cada uma das contribuições da variabilidade. Deste modo, podem ser testados individualmente os efeitos dos factores A e B, designados de "F", através das hipóteses:

A hipótese nula ( $H_0$ ) vai no sentido de que o factor F não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada, enquanto a hipótese alternativa ( $H_1$ ) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados. O valor de prova ( $\alpha = p[H_0]$ ) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor [46].

### 3.4.3.3 Factor duplo com réplicas

Neste caso a matriz de dados contém o factor A nas linhas e o factor B nas colunas sendo que cada conjunto de Q linhas reflecte o número de réplicas. Neste caso a ANOVA permite a decomposição da variabilidade total (T) em quatro componentes: a puramente aleatória ( $pe$ ), a devida ao factor linha (factor A), a devida ao factor coluna (factor B) e ao termo de interacção entre factores (AB),

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A + SS_B + SS_{AB} \quad (3.12)$$

dividindo os termos desta equação pelos respectivos graus de liberdade (N.M.Q-1), N.M.(Q-1), (N-1), (M-1) e (N-1)(M-1) obtêm-se a equação da variabilidade total ( $\delta_T^2$ ) em função das contribuições dos factores e respectiva interacção

$$\delta_T^2 = \delta_{pe}^2 + \delta_A^2 + \delta_B^2 + \delta_{AB}^2 \quad (3.13)$$

Variabilidade que contabiliza a interacção dos dois factores em estudo, permitindo a individualização de cada uma das contribuições da variabilidade.

De igual modo podem ser testados individualmente os efeitos dos factores A e B e respectiva interacção AB através das hipóteses: a hipótese nula (H0) vai no sentido de que o factor F não apresenta qualquer efeito sobre a variabilidade observada; a hipótese alternativa (H1) sugere que o factor apresenta efeito sobre a variabilidade observada nos dados; e o valor de prova ( $\alpha = p[H0]$ ) traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece uma importante indicação sobre o efeito do factor [46].

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão apresentados os resultados mais relevantes obtidos pela mesma ordem temática e o tratamento estatístico utilizado como ferramenta na interpretação desses resultados, como forma de validar todos estes sistemas.

### **4.1 Sistema de água purificada**

Devido à extensa compilação de dados dos equipamentos do sistema de depuração de água, apresentarei os resultados mais pormenorizados para um equipamento Integral 3 e esse será comparado com os resultados da qualificação de performance do sistema ORION.

#### **4.1.1 Integral 3 -CQEQ0203200**

Após semanalmente terem sido realizados diversos ensaios físico-químicos nas amostras recolhidas, apresentam-se os resultados dos parâmetros analisados mais relevantes. Os resultados de condutividade, TOC, análise microbiológica e verificação são expostos através de cartas de controlo para o depósito e dispensadores do equipamento Integral 3 –CQEQ0203200 no período de Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012, no entanto para tratamento estatístico fez-se num período representativo entre os meses de Novembro, Dezembro de 2011 e Janeiro de 2012. O anexo A3 apresenta a tabela com os resultados dos parâmetros mais relevantes (condutividade, TOC e análise microbiológica) de todos os lotes das amostras recolhidas no E-POD, Q-POD e depósito do equipamento Integral 3.

### 4.1.1.1 Condutividade

De seguida são apresentados as respectivas cartas de controlo com os resultados compilados desde Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012 do relevante parâmetro condutividade.

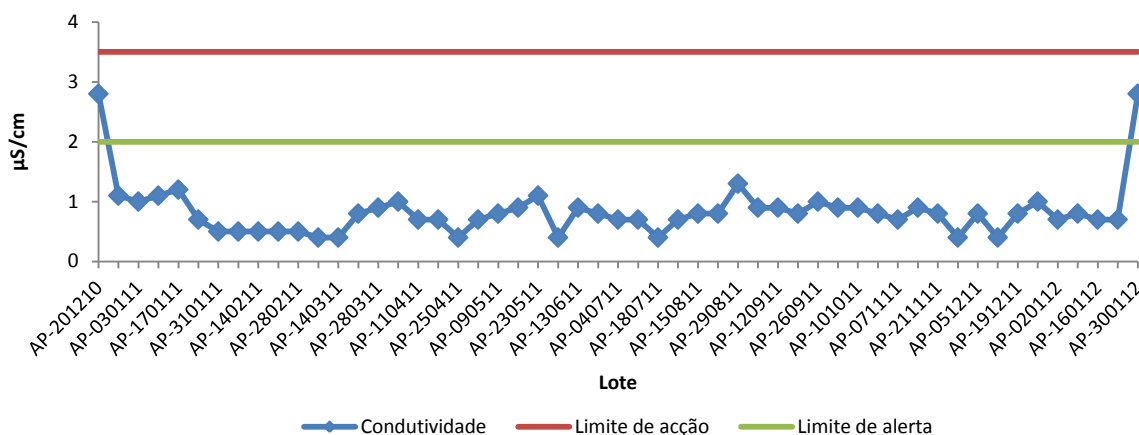


Figura 4.1 - Medidas de condutividade da amostra de água purificada recolhida no depósito (Integral 3 – CQE0203200).

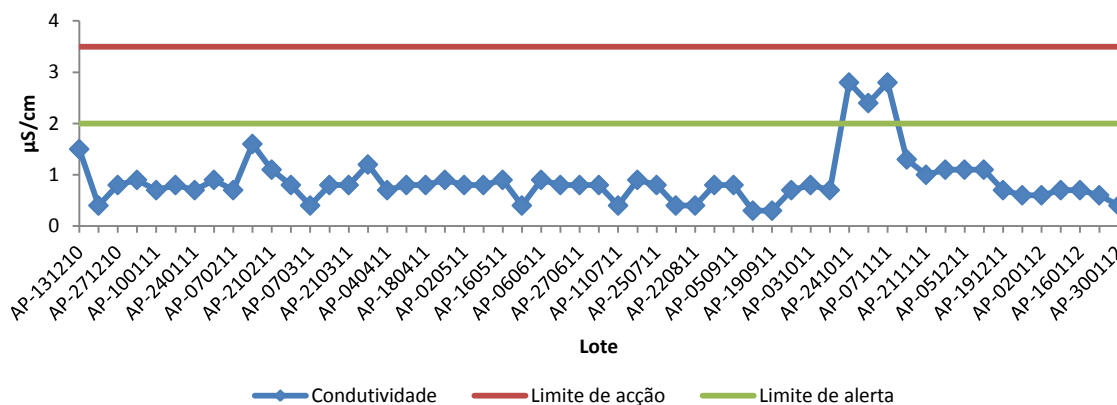


Figura 4.2 - Medidas de condutividade da amostra de água purificada recolhida do E-POD (Integral 3 – CQE0203200).

A partir desta carta de controlo, pode-se assumir que os valores de condutividade obtidos para as amostras recolhidas do equipamento Integral 3, no decorrer do estudo, encontram-se dentro das especificações estabelecidas, logo em conformidade. No entanto, houve dois valores nos lotes AP-241011 e AP-071111, respeitantes ao depósito e E-POD que estiveram acima do limite de alerta (valor 2.0 µS/cm). Estes valores pontuais e dentro de especificação não se repetiram em leituras posteriores, pelo que não foi desencadeada nenhuma acção correctiva/preventiva.

A figura 4.3 mostra os valores de condutividade nos lotes de água purificada do Q-POD no Integral 3.

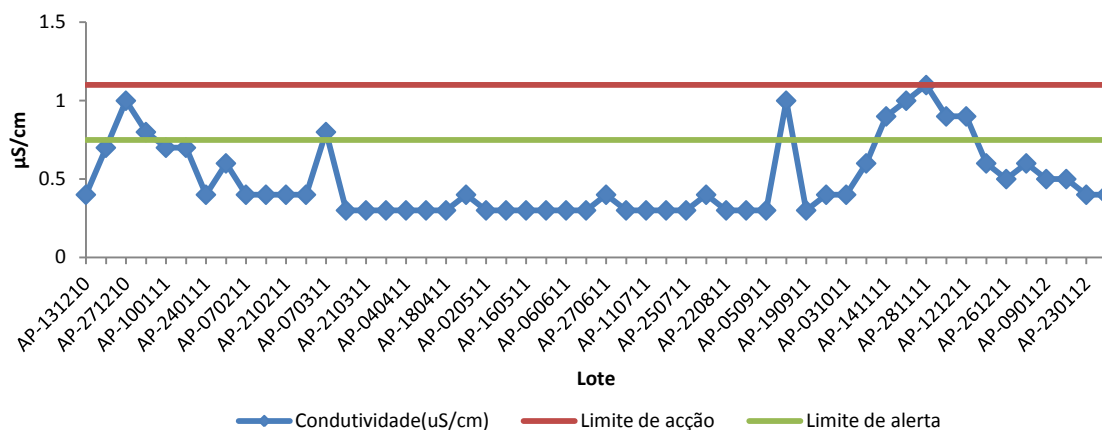


Figura 4.3 - Medidas de condutividade da amostra de água purificada recolhida no Q-POD (Integral 3 – CQEQ0203200), de Dezembro de 2010 a Julho de 2011.

Apesar da condutividade da água altamente purificada (Q-POD) ser mais baixa que a água purificada representante no depósito e E-POD, alguns lotes deram valores superiores aos limites de alerta.

No processo de validação em estudos colaborativos usa-se a análise de variância (ANOVA), que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos. Assim, através da ANOVA de factor único comparou-se a variabilidade entre a água recolhida no dispensador E-POD, Q-POD e o depósito.

O valor do teste obtido ( $TV = 0.78$ ) é inferior ao valor crítico previsto pela distribuição de Fisher unilateral referente a 2 e 36 graus de liberdade no numerador e denominador ao nível de confiança de 95% ( $F_{0.05}(2,36) = 3.26$ ) o que indica que a hipótese nula é válida – estatisticamente a produção de água nos três acessórios são semelhantes. A mesma conclusão é ainda reforçada pela respectiva estimativa da probabilidade de ocorrência da hipótese nula (valor de prova de 0.468 o que corresponde a uma probabilidade relativa de 47%).

Tabela 4.1 - ANOVA factor único do E-POD, Q-POD e depósito.

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (gl)	Média quadrática (MQ)	F	Valor prova	F crítico
Entre grupos	0.45	2	0.22	0.78	0.47	3.26
Dentro de grupos	10.35	36	0.29			

### 4.1.1.2 TOC

Semanalmente, a leitura do TOC é apenas realizada neste equipamento (Integral 3) para verificar o TOC da água purificada (E-POD) e altamente purificada (Q-POD). As figuras 4.4 e 4.5 mostram os valores de TOC desses dos dispensadores.

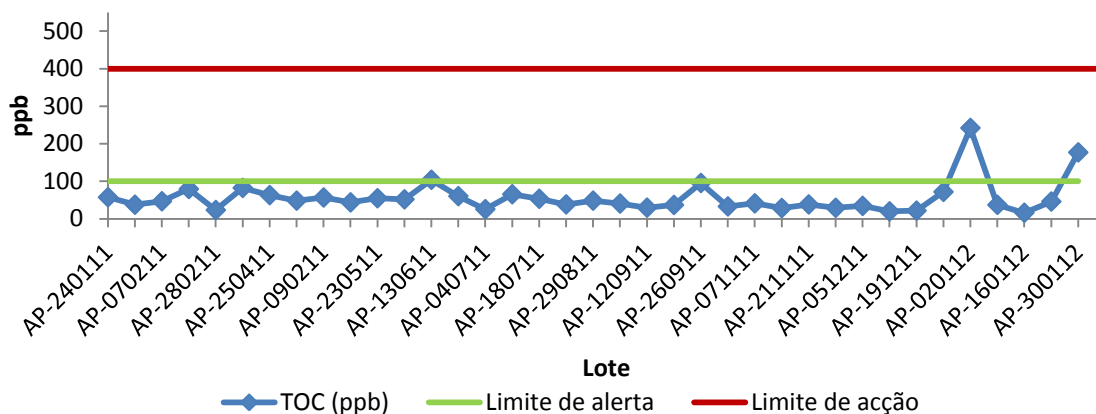


Figura 4.4 - Valores de Carbono Orgânico Total (TOC, em ppb) da água purificada do E-POD do equipamento Integral 3), referentes aos meses entre Janeiro e Julho de 2012.

Todos os valores obtidos de TOC da água purificada recolhida do E-POD encontraram-se dentro das especificações estabelecidas no processo de validação (TOC<500 ppb). Como o parâmetro TOC é influenciado por diversos factores, nomeadamente contaminações no acto de amostragem, nos vials de TOC e ambiente, sendo que a contaminação de carbono orgânico é, essencialmente, em todos os lugares, pode justificar valores pontuais acima do limite de alerta como é o caso do lote de AP-020112 no E-POD.

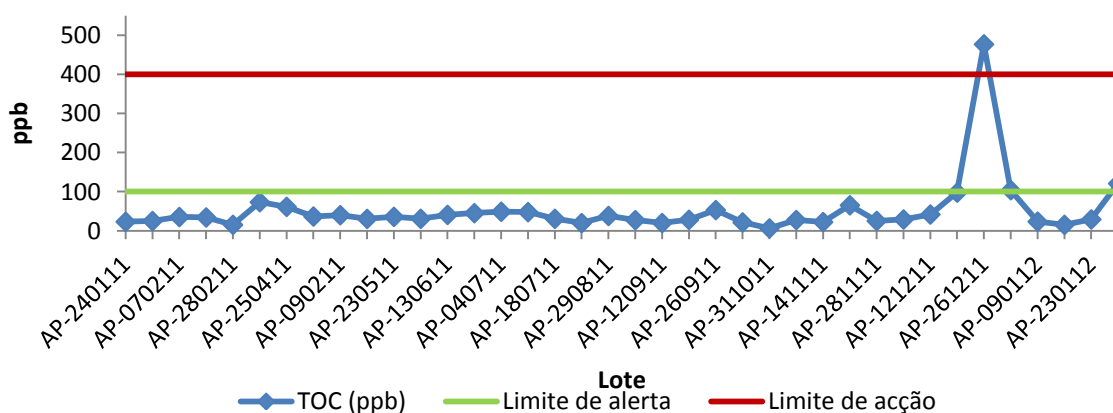


Figura 4.5 - Valores de Carbono Orgânico Total (TOC) da água altamente purificada do Q-POD (integral 3), de Janeiro a Julho de 2011.

Pela análise da figura 4.5, encontra-se um valor de TOC do lote AP-261211 no Q-POD completamente díspar dos restantes lotes e acima do limite de acção, no entanto este resultados encontra-se dentro de especificação (TOC<500 ppb).

Em ambos os dispensadores E-POD e Q-POD recolha da água do lote AP-300112 foi acima do limite de alerta.

Após analisar cada caso, verificou-se na folha de registo da recolha da água que a microbiologia recolheu nestes dias antes da recolha da físico-química. Como a microbiologia antes de recolher a água borrifa com etanol a superfície do equipamento, tais valores podem ter sido influenciados pela presença de etanol ainda na atmosfera, após recolha das análises para microbiologia. Este facto foi provado ao recolher uma amostra mesmo antes recolha na microbiologia (TOC=66 ppb) e outra depois (TOC=129 ppb), este resultado foi bem significativo.

Foi realizado o estudo estatístico do TOC para saber a influência do factor semana / mês, através da ANOVA factor duplo sem repetição para o dispensador E-POD (tabela 4.2). Cada semana corresponde a um lote.

**Tabela 4.2 - Resultado da ANOVA factor duplo sem repetição do E-POD do equipamento Integral 3, respeitantes aos meses Novembro, Dezembro e Janeiro.**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Semana	39407.69	3	13135.90	0.77	0.55	4.76
Mês	39975.18	2	19987.59	1.17	0.37	5.14
Erro	102349.71	6.00	17058.29			

Os valores do teste obtidos de 0.77 e 1.17 são inferiores aos valores crítico previstos pela distribuição de Fisher unilateral referente a 3 e 2 graus de liberdade na semana e mês ao nível de confiança de 95% ( $F_{0.05} = 4.76$  e  $5.14$ ) o que indica que a hipótese nula e válida – os factores testados (tempo, meses de Novembro a Janeiro e semana, lotes) não afectam significativamente os valores de TOC do E-POD medidos . A mesma conclusão e ainda reforçada pela respectiva estimativa da probabilidade de ocorrência da hipótese nula (valor de prova de 0.55 e 0.37 o que corresponde a uma probabilidade relativa de 55 e 37%). Foi feito a mesma ANOVA para o Q-POD e comprovou-se o mesmo que o E-POD – os valores do teste foram inferiores aos valores críticos, aceita-se a hipótese nula, então não há influência destes dois factores.



### 4.1.1.3 Análise microbiológica

Os dois gráficos seguintes não indicam o limite de alerta (20 ucf/mL) e de ação (75 ucf/mL), pois todos os resultados obtidos foram 0 ucf/mL ou bastante próximos desse valor. Assim podemos perceber a pequena diferença que existe entre cada tipo de equipamento (depósito e E-POD).

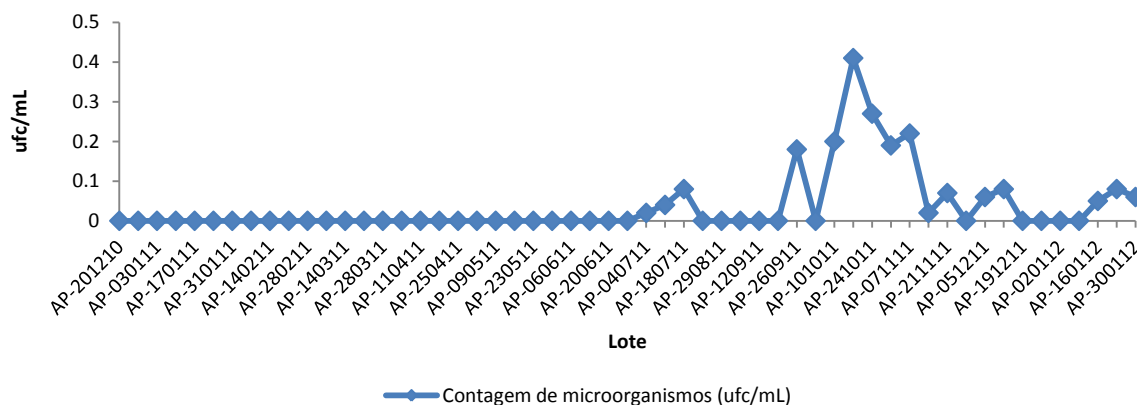


Figura 4.6 - Análise microbiológica realizada na amostra de água purificada recolhida no depósito – CQEQ0203200, de Dezembro de 2010 a Julho de 2011.

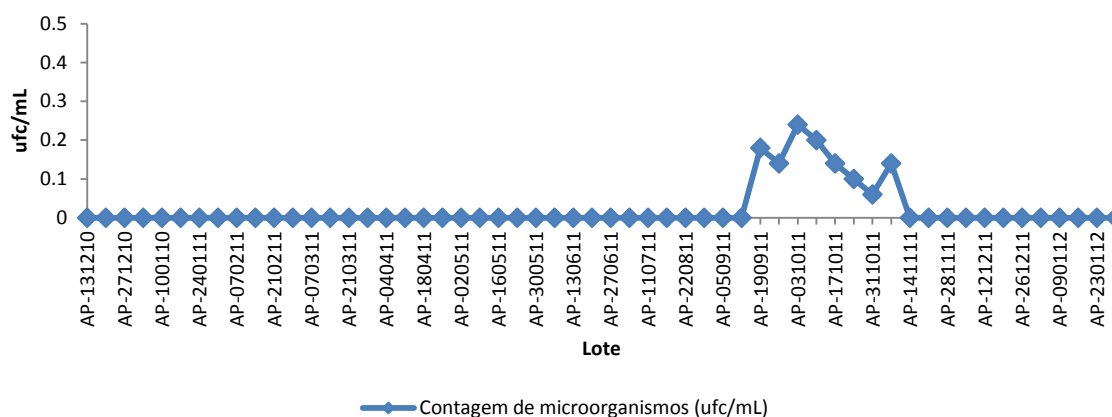


Figura 4.7 - Análise microbiológica realizada na amostra de água purificada recolhida no E-POD – CQEQ0203200, de Dezembro de 2010 a Julho de 2011.

Considerando todos os valores experimentais, através da ANOVA de um factor mostrou diferenças entre o E-POD e o depósito.

No sentido de testar se há mudanças significativas no valor entre o dispensador e depósito para o parâmetro de microbiologia foi implementado o teste t-student. Considerando todos os valores

experimentais,  $TV=3.93$ , ( $pH0=0.2\%$ ) mostrou diferença significativa na análise microbiológica entre o E-POD e o depósito. Desprezando os outliers mantém-se a diferença, como mostra os resultados obtidos sistematizados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Resultados da diferença entre o E-POD e o depósito.

Diferença entre E-POD e depósito	
media ( $X_{med}$ )	-0.04
desvio padrao ( $s_x$ )	0.03
n	12
TV	3.513
T (0.05)	2.201
pH0	0.005

Este resultado faz sentido, visto que o E-POD deve ter uma contagem microbiológica menor devido a ter um sistema de filtração da água produzida nesse depósito. As figuras mostram que se obtêm ligeiramente valores mais baixos de contaminação.

Para o gráfico do Q-POD já não foi necessário a mudança de escala do eixo de YY com os limites de alerta e acção mais baixos, respectivamente 0.075 ufc/mL e 0.1 ucf/mL, pois trata-se da análise à água altamente purificada.

Os valores obtidos do Q-POD foram mais baixos que os do E-POD e do depósito, sendo este o previsto devido a tratar-se de ser água altamente purificada, o que indica que tem menos contaminação microbiológica.

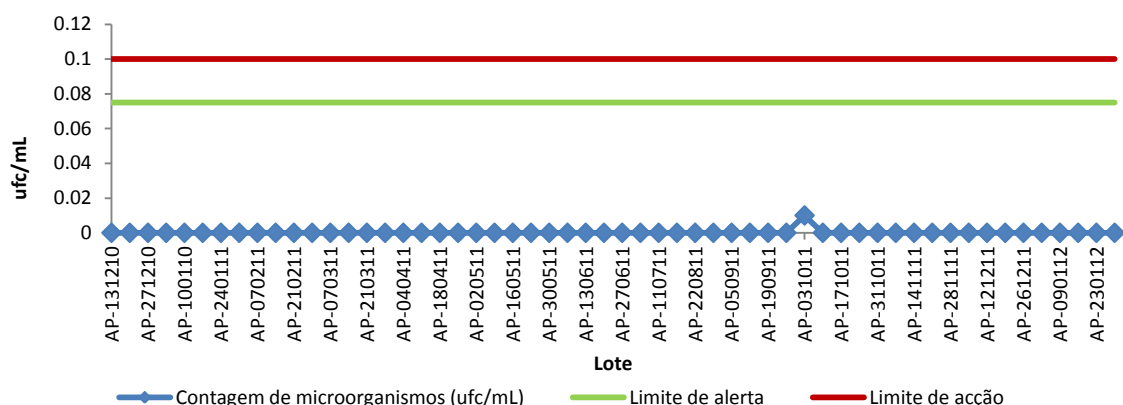


Figura 4.8 - Análise microbiológica realizada na amostra de água purificada recolhida no Q-POD – CQEQ0203200, de Dezembro de 2010 a Julho de 2011.

Todos os valores obtidos para todo o equipamento Integral 3 encontram-se dentro dos parâmetros estabelecidos, ou seja, em conformidade, o que permite demonstrar que o sistema de água purificada e água altamente purificada funcionou correctamente durante o período de estudo.

#### 4.1.1.4 Verificação do sistema de água purificada

As figuras seguintes são respeitantes aos dados obtidos pelo próprio equipamento do sistema Elix, neste caso o Integral 3 dos diferentes parâmetros mencionados na tabela 3.2. O operador regista semanalmente estes valores de modo a verificar se estes parâmetros se encontram dentro de dos limites estabelecidos.

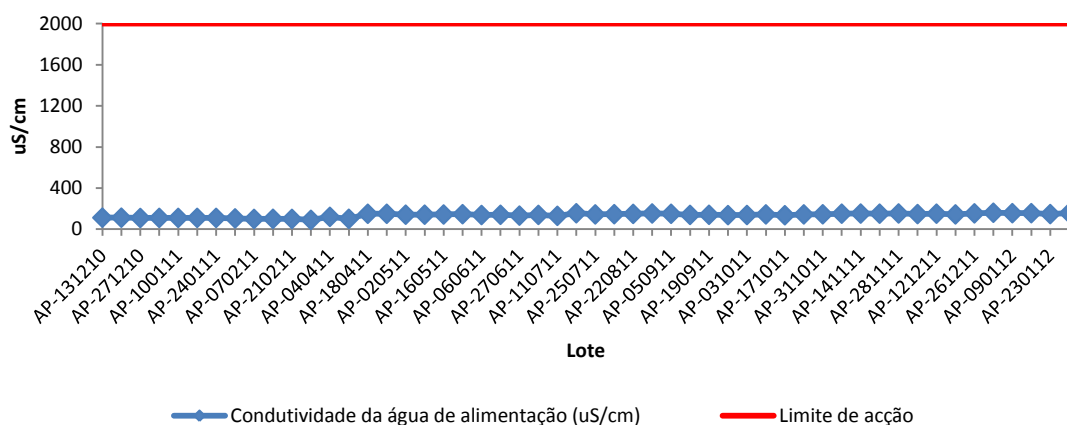


Figura 4.9 - Valores de condutividade da água de alimentação obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

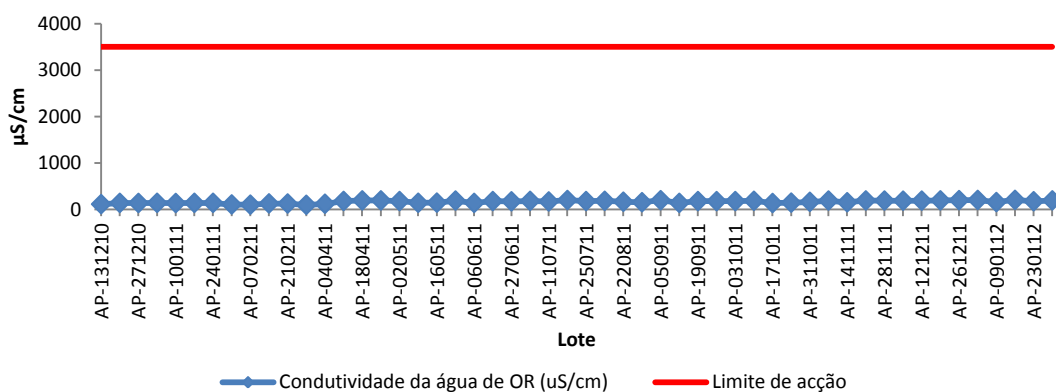


Figura 4.10 - Valores de condutividade da água de OR obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

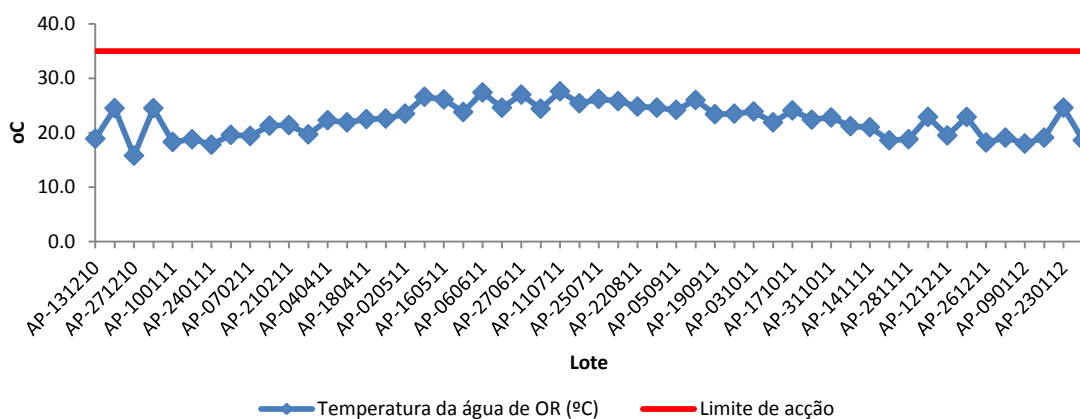


Figura 4.11 - Valores da temperatura da água de OR obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

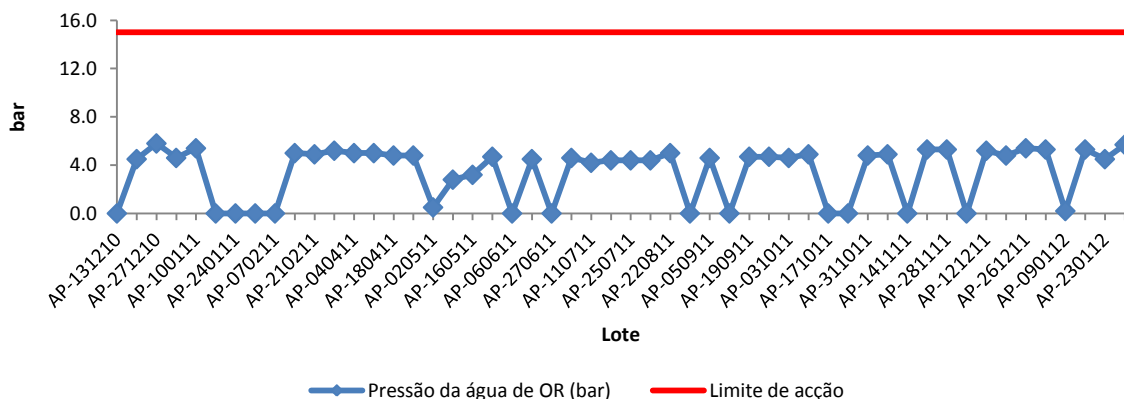


Figura 4.12 - Valores da pressão da água de OR obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

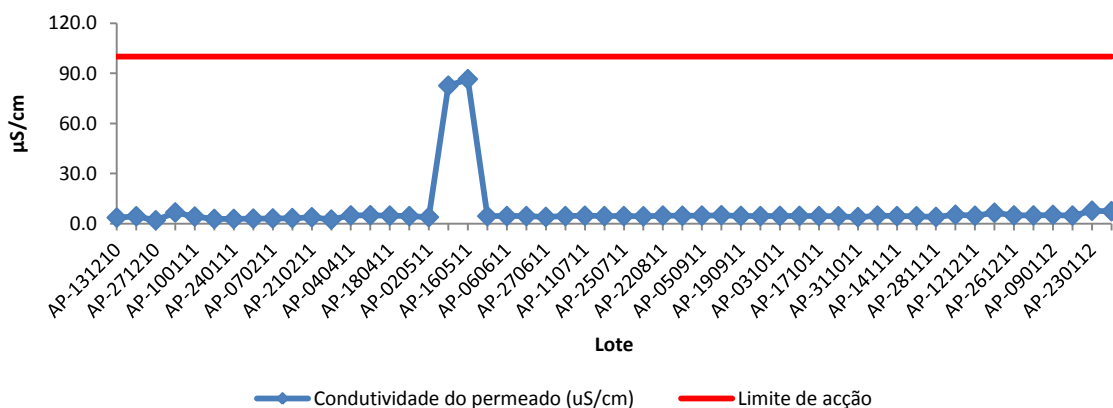


Figura 4.13 - Valores de condutividade do permeado obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

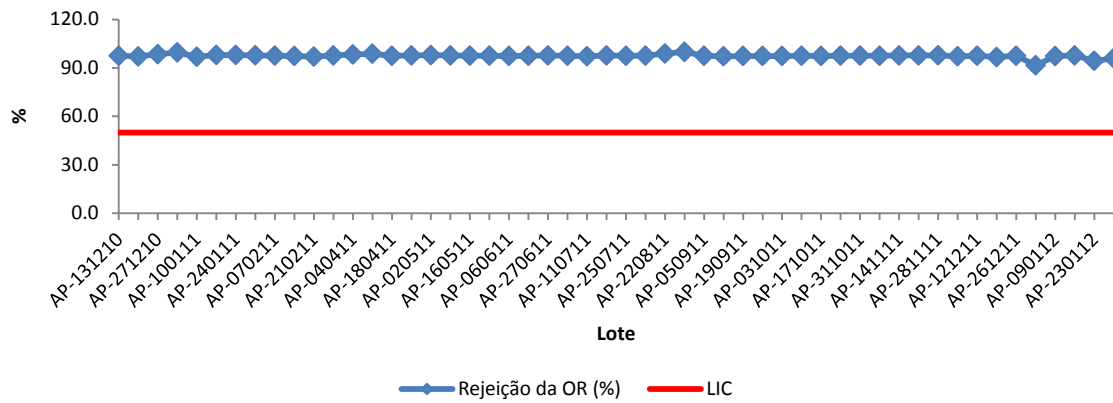


Figura 4.14 - Valores da rejeição da OR obtida no sistema de água Integral 3 CQE0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

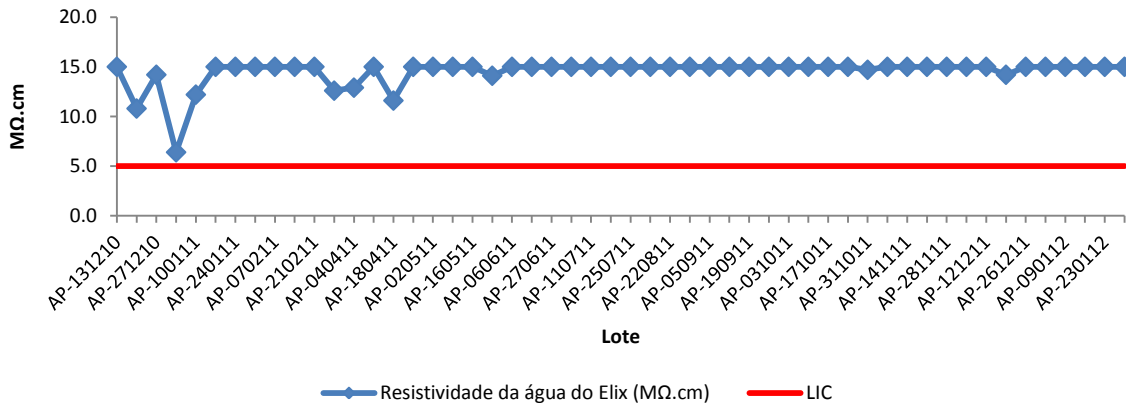


Figura 4.15 - Valores de resistividade da água do Elix obtida no sistema de água Integral 3 CQE0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

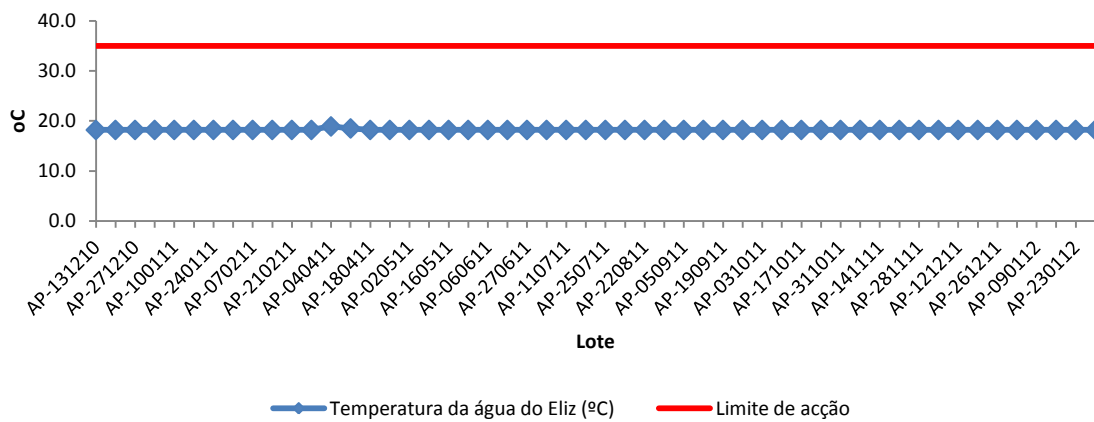


Figura 4.16 - Valores de temperatura da água do Elix obtida no sistema de água Integral 3 CQE0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

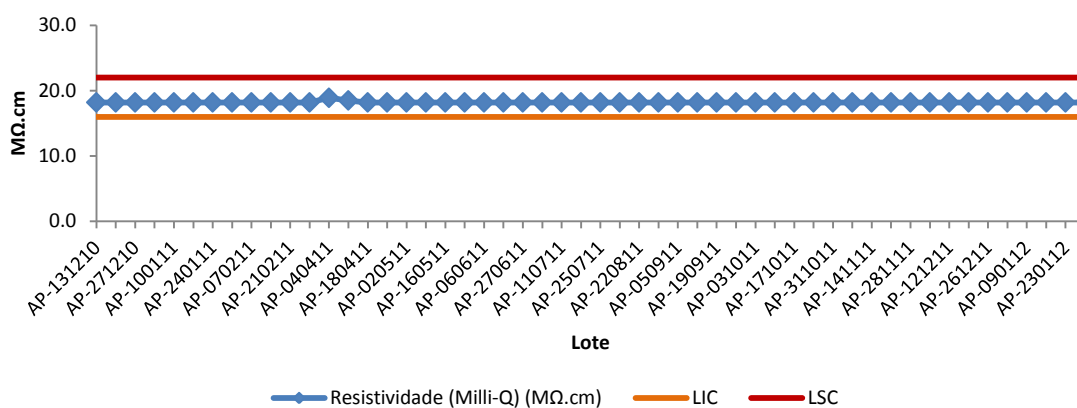


Figura 4.17 - Valores de resistividade obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

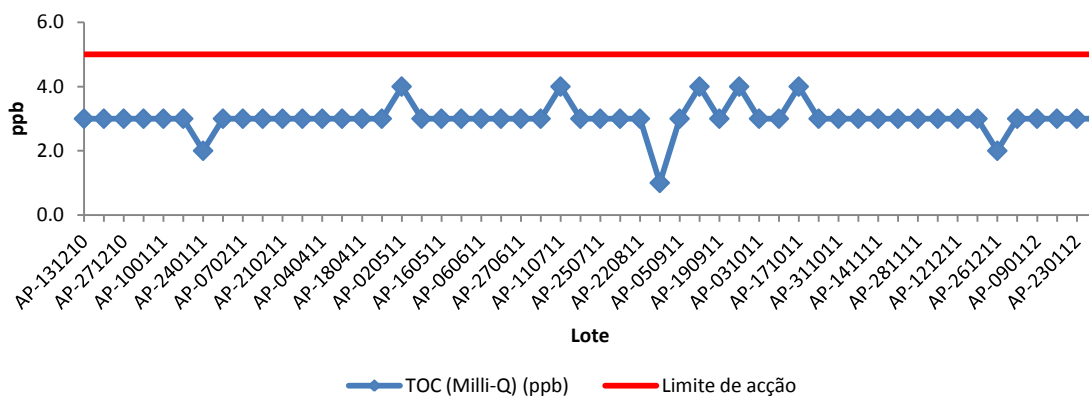


Figura 4.18 - Valores de TOC (Milli-Q) obtida no sistema de água Integral 3 CQEQ0203200, referentes aos meses entre Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

Todos os valores obtidos encontraram-se dentro das especificações estabelecidas (tabela 3).

#### 4.1.1.5 Manutenção

No que respeita às manutenções no equipamento Integral 3 – CQEQ0203200 Milli-Q, estas foram realizadas de acordo com a instrução de trabalho referente à manutenção do sistema Elix *Advantage*, e incluem manutenções internas e manutenções externas, realizadas pelos técnicos da Interface e abrangidas pelo contrato de manutenção anual. Apresenta-se no anexo 4 as

manutenções preventivas efectuadas desde a instalação do equipamento até ao fim da data do presente estudo.

#### 4.1.2 Restantes equipamentos ELIX

Realiza-se o mesmo estudo do Integral 3 para validar os restantes equipamentos ELIX. Como para tratamento estatístico fez-se a recolha dos dados num período representativo entre os meses de Novembro, Dezembro de 2011 e Janeiro de 2012, de seguida apresenta-se uma tabela com esses resultados que irão ser tratados posteriormente.

**Tabela 4.4 – Medidas de condutividade, microbiologia para os restantes equipamentos Elix, durante os meses Novembro, Dezembro de 2011 e Janeiro de 2012.**

Parâmetro	Equipamento	Acessórios	AP-071111	AP-141111	AP-211111	AP-281111	AP-051211	AP-121211	AP-191211	AP-261211	AP-020112	AP-090112	AP-160112	AP-230112	AP-300112
Conductividade (µS/cm)	Elix 3- CQEQ020800	E-POD	2.8	1.1	1.2	1.3	1.1	1	FU	FU	FU	FU	FU	FU	FU
		DEPÓSITO	2.9	1	1.1	1.1	1	1.1	0.5	0.6	0.6	0.7	0.5	0.5	0.6
	Elix 5- CQEQ0203000	Depósito	3	1.1	1.1	1.1	1.0	0.8	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.8	0.5
		Elix 3 - CQEQ020900	E-POD	3	1	1.1	1.1	1.1	1.1	F.U	F.U	FU	FU	FU	FU
	Q-POD		2.9	1	1	1.1	1.1	1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.5
	Elix 5- CQEQ0203100	Depósito	3	1.1	1.1	1.2	0.8	0.9	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5
		Elix 3- CQEQ020800	E-POD	0.04	0	0	0	0	0.04	FU	FU	FU	FU	FU	FU
	Depósito		0.2	0.16	0.13	0.14	0.14	0.1	0.02	0.1	0	0.04	0.03	0.06	0.1
Microbiologia (µcf/mL)	Elix 5- CQEQ0203000	Depósito	0.12	0.1	0.06	0	0.1	0.1	0.04	0.12	0	0.1	0.12	0.12	0.2
		Elix 3 - CQEQ020900	E-POD	0	0	0	0	0	0	F.U	F.U	F.U	F.U	F.U	F.U
	Q-POD		0.04	0.02	0.02	0.04	0	0.1	0.02	0	0	0	0	0.02	0.04
	Elix 5- CQEQ0203100	Depósito	0.24	0.12	0.1	0.1	0.2	0	0.2	0	0	0.08	0.04	0.06	0

Saliento que a partir do dia 23.12.11 do Elix 3 – CQEQ0202800 e CQEQ0202900 não foram realizados mais ensaios ao E-POD devido a este se encontrar fora de uso.

Os valores de condutividade obtidos para as amostras recolhidas dos equipamentos ELIX, no decorrer do estudo, encontram-se dentro das especificações estabelecidas, logo em conformidade.

Assim permite-nos demonstrar que o sistema de água purificada e água altamente purificada funcionou correctamente durante o período de estudo. No entanto, o lote AP-071111 está acima do limite de alerta ( $2 \mu\text{S}/\text{cm}$ ) em todos os equipamentos e correspondentes acessórios.

Tal facto pode estar relacionado com o material para o qual foi recolhida a amostra (frascos de 500 mL) estarem mal lavados, pois como a condutividade eléctrica de uma solução é uma medida da quantidade de carga transportada pelos iões, quando a fonte de iões provém de impurezas a condutividade transforma-se numa medição de pureza. Quando maior a condutividade, menos pura é a solução. Outra razão que pode indicar que seria do material é o facto dos resultados da microbiologia ter dado muito bem e a recolha da água para análise microbiológica ser feita para frascos esterilizados. Também pela verificação do equipamento indica valores muito baixos respeitantes à condutividade.

Através da ANOVA de factor único vamos comparar a variabilidade entre os E-POD do sistema ELIX 3 com o E-POD do Integral 3 em relação ao parâmetro condutividade. O valor do teste obtido ( $TV = 0.03$ ) é inferior ao valor crítico previsto pela distribuição de Fisher unilateral referente a 1 e 24 graus de liberdade no numerador e denominador ao nível de confiança de 95% ( $F_{0.05}(1,24) = 4.26$ ) o que indica que a hipótese nula é válida – estatisticamente a produção de água nos três acessórios são semelhantes. A mesma conclusão é ainda reforçada pela elevada estimativa da probabilidade de ocorrência da hipótese nula, tende um valor de prova de 0.88, o que corresponde a uma probabilidade relativa de 88%. Assim, estatisticamente os dois sistemas na produção de água são semelhantes.

**Tabela 4.5 - Resultados da comparação entre os E-PODs do Elix 3 e Integral 3, pela ANOVA de factor único.**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.01	1	0.01	0.03	0.88	4.26
Dentro de grupos	9.37	24	0.39			

No uso estatístico geral, e segundo a ferramenta de correlação do Excel referente a medida da relação entre duas variáveis (Elix 3 e Integral 3) resultou em 98% .

Comparou-se estatisticamente a condutividade dos depósitos de todos os diferentes equipamentos, chegando à conclusão que são todos semelhantes. A probabilidade de concordância dos resultados é de 99.6%, uma vez que o valor de teste obtido ( $TV=0.05$ ) é inferior ao valor crítico respectivo ( $F_{crítico}= 2.53$ ), previsto pela distribuição unilateral de Fisher, aceita-se a hipótese nula.



Tabela 4.6 - Resultados da comparação entre os depósitos de todos os equipamentos, pela ANOVA de factor único.

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0.08	4	0.02	0.05	0.996	2.53
Dentro de grupos	25.60	60	0.43			

Através do estudo ANOVA factor duplo sem repetição, verificou-se a influência da semana/mês dos resultados de microbiologia em todos os depósitos. Os resultados são apresentados na tabela 4.7. Cada semana corresponde a um lote.

Tabela 4.7 - Influência semana/mês no resultado estatístico de microbiologia nos depósitos de todos os equipamentos, pela ANOVA factor duplo sem repetição, durante Novembro, Dezembro e Janeiro.

<i>Equipamento</i>	<i>Fonte de variação</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Integral 3 -CQEQ0203200	Semana	0.54	0.67	4.76
	Mês	0.49	0.63	5.14
Elix 3 -CQEQ0202800	Semana	1.27	0.37	4.76
	Mês	12.44	0.007	5.14
Elix 5 -CQEQ0203000	Semana	0.14	0.93	4.76
	Mês	0.13	0.88	5.14
Elix 3 -CQEQ0202900	Semana	0.47	0.71	4.76
	Mês	0.82	0.48	5.14
Elix 5 -CQEQ0203100	Semana	0.82	0.53	4.76
	Mês	1.35	0.33	5.14

Uma vez que o valor teste (TV) é inferior ao valor crítico previsto pela distribuição de Fisher unilateral (Fcrit), aceita-se a hipótese nula, que diz que os factores semana/mês não interfere nos resultados obtidos pela análise de microbiologia. Este foi o resultado para todos os equipamentos, excepto no depósito do Elix 3 – CQE0202800. Neste equipamento mostra que o factor mês do ensaio microbiológico influi, pois o valor teste (TV=12.44) é superior ao valor crítico (Fcrit=5.14) e assim a hipótese nula é rejeitada. Sendo ainda mais afirmada esta rejeição da hipótese nula pelo resultado do valor de prova inferior a 0.01 (Valor P = 0.007).

Foi realizado o mesmo estudo, no entanto para o parâmetro condutividade de todos os depósitos. Sendo que o resultado foi semelhante ao anterior. Os factores semana/mês não têm influência nos resultados, sendo que todos os valores teste foram inferiores aos valores críticos, excepto para um dos depósitos, o do integral 3, em que o factor mês teve influência nos resultados.

Este tratamento de dados foi realizado também para o depósito do integral 3 (tabela 4.8), através da ANOVA factor duplo sem repetição.

**Tabela 4.8 - ANOVA factor duplo sem repetição da condutividade do depósito do Integral 3, respeitantes aos meses Novembro, Dezembro e Janeiro.**

<i>Fonte de variação</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Semana	2.57	0.15	4.76
Mês	6.04	0.037	5.14

Segundo o estudo ANOVA factor duplo sem repetição, há essa influência entre os meses considerados para este tratamento estatístico no depósito do integral 3, visto que o valor teste (TV =6.04) é superior ao valor crítico previsto pela distribuição de Fisher unilateral ( $T_{crit}=5.14$ ) e a hipótese nula é rejeitada. No entanto, O valor de prova encontra-se posicionado numa faixa de estatística dúbia. Assumindo como valor de desempate os 3%, o valor obtido 3.7 % é favorável assumir eventual igualdade ao nível de meses. Contrariamente, os resultados microbiológicos entre semanas são estatisticamente semelhantes. Pela análise dos resultados obtidos e discutidos no presente relatório podemos verificar que o sistema de produção de água purificada existente nos Laboratórios Basi S.A. se considera devidamente qualificado e validado, pois a água purificada produzida cumpre com as especificações estabelecidas para cada parâmetro testado. Assim, pode-se concluir que a água purificada produzida nos LB pode ser utilizada para os fins propostos como as análises de controlo de qualidade e lavagens.

Os resultados apresentados permitiram também concluir que todos os equipamentos e dispensadores se encontram devidamente validados e qualificados, fornecendo água purificada de acordo com os requisitos físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela Farmacopeia Europeia.

Tendo em conta os resultados do TOC obtidos ao longo do período de estudo, deve-se ter em conta uma amostragem mais cuidadosa, sem presença de etanol, portanto, antes da recolha para a microbiologia.

### **4.1.3 Comparação com o sistema ORION**

O seguinte tabela mostra os resultados de TOC efectuados em quinze dias na qualificação de performance do sistema de água purificada ORION.

Tabela 4.9 - ANOVA factor duplo sem repetição da condutividade do depósito do Integral 3, respeitantes aos meses Novembro, Dezembro e Janeiro.

Pontos de uso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b>V45-01</b>	61	48.5	43.8	66.5	42.3	53.4	53.9	95.6	40.1	33.1	40.2	32.8	47.2	49.6	40.4
<b>V70-01</b>	68.4	60.3	36.5	49.5	35.8	35.5	42.9	96.3	36.9	25.5	35	29.2	57	33.3	35.9
<b>V80-01</b>	56.5	33	32.9	33.9	28.2	43.2	42.3	84.3	26.6	25.7	22.7	21.7	38	26.3	26.6
<b>SSP1601</b>	165	35.9	24.9	60.9	71	45.8	50.2	29.7	24.9	28.5	48.1	46.4	39.7	56.9	30.3
<b>SSP1602</b>	117	40.1	25.3	28.5	28.1	41.3	36.5	29.4	27.2	30.5	27.6	45.7	40.1	44.7	25.7
<b>SSP1603</b>	144	44.8	32.2	21.4	27.6	43.5	32.1	32.8	27.7	22.5	23.5	35.3	42.8	33.2	27.4
<b>SSP1604</b>	136	42.7	25.7	32.5	49.9	43.5	43.9	31.2	40.6	24.1	26.1	39.7	39.1	33.7	22.9
<b>HV1701</b>	57.6	57.5	26.9	22.9	27.1	35.6	34.7	37.3	28	51.2	26.5	47	47	36.5	44.9
<b>HV1702</b>	235	41.1	35	26.3	40.5	29.2	29.4	33.4	27.3	28.3	23	43	39.8	46.2	26.4
<b>HV1703</b>	118	35	40.7	31.7	30.7	47.4	41.7	41.9	55.1	29.6	62.2	48.4	74.6	36.9	35.3
<b>HV1704</b>	62.3	45.2	49.5	62.9	52.4	37.9	31.8	44.8	44	31.7	57.5	63.9	83.2	45	40
<b>HV1705</b>	82.5	41.4	39.7	32.8	29.2	31.7	37.2	47.7	31.5	35.9	32.4	44.6	43.6	33.2	54.1
<b>HV1706</b>	61.9	32.3	26.5	34.9	33.5	31.2	32.4	45.2	30.7	25.6	24.5	61.6	44	35.6	64.6
<b>HV1707</b>	71.3	39.4	31.2	29.1	34.6	39.1	36.7	38.9	32.6	30.7	33.9	41.3	49.8	47.3	41.8
<b>HV1708</b>	87.7	58.5	50.8	31.5	37	126	65	91	39.5	158	125	61.5	82.9	132	80.5
<b>HV1709</b>	141	47.5	67.8	42.3	41	116	66.1	66.7	48.2	62.4	49.7	53	91.3	52.2	70.4
<b>HV1710</b>	216	180	167	61.8	62.5	45.7	291	76.7	51.7	43	38.1	56	53.7	55.8	55.2
<b>HV1711</b>	585	107	131	48.2	47.3	35.4	73.5	36.1	46.9	34.8	39.9	52.4	43.8	54	68.5
<b>HV1712</b>	42.8	35.4	132	50.5	56.4	34.4	36.1	43.2	37.7	32.3	35.9	67.9	48.6	39.9	62.5
<b>HV1713</b>	163	49.1	48.5	50.9	32.9	36.5	82.2	35.9	28.8	26.8	30.9	58.2	53	57.1	44.4
<b>HV1714</b>	77.1	42.9	36.7	29.4	41.1	31.3	52.2	38.1	53.8	39.9	27.4	47.2	44.1	38.4	56
<b>XV1701</b>	55.6	47	82.5	52.8	38.2	59.4	31.2	54.6	28.7	30.4	29.9	111	57.2	34.6	27.4
<b>XV1702</b>	142	101	141	50.2	124	49.9	46.8	59.4	28.1	27.1	25.9	62.6	49.6	31.8	31
<b>XV1703</b>	78.2	57.7	85.4	68.9	132	110	46.4	83.6	47.7	25.1	29.4	68.2	70.2	35.7	33.9
<b>XV1704</b>	202	54.9	383	242	611	79.6	55.1	64.6	32.6	22.8	32.3	63.1	51.5	53.6	39.9

Comparando com os resultados semanais do TOC do sistema de água purificada ELIX. Todos os resultados deram abaixo do limite de alerta (100 pbb) e bastante semelhantes.

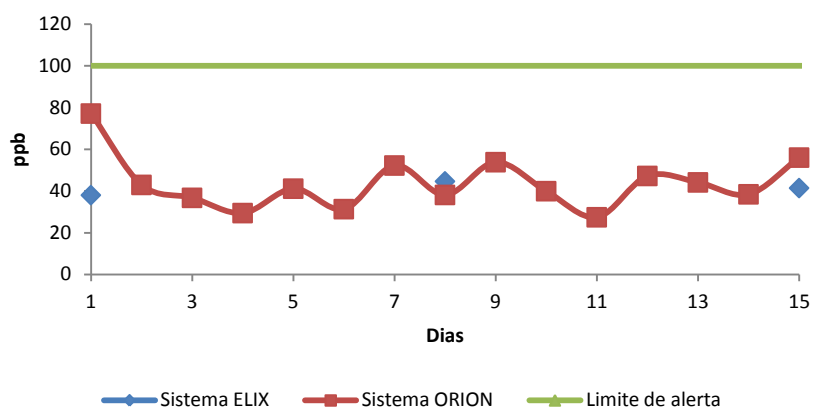


Figura 4.19 - TOC do sistema de água purificada ORION e ELIX.

No entanto se for a comparar resultados do TOC de pontos diferentes do sistema de água purificada ORION, obtive TOC acima do limite de alerta.

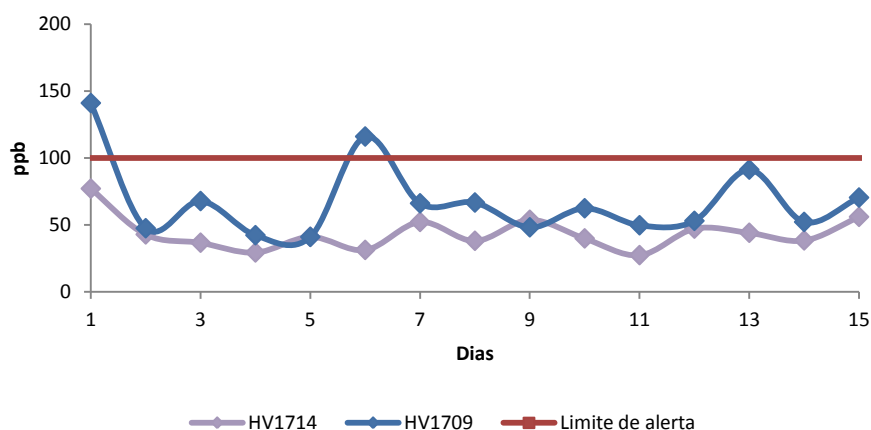


Figura 4.20 - TOC do sistema de água purificada ORION do ponto HV1714 e HV1709.

O ponto HV1709 é localizado na sala de lavagens do laboratório de físico-química, onde havia é muito susceptível a estar etanol ou detergentes na atmosfera, enquanto o outro ponto é localizado numa sala que ainda não tem qualquer movimentação. Mais uma vez prova que é muito fácil haver contaminação nas amostras de TOC e é preciso ter o máximo de cuidado na amostragem da água para análise, tendo em conta o ambiente envolvido.

Á posteriori foi finalizada com sucesso a qualificação de performance do sistema de água purificada ORION de todos os pontos de amostragem.

## 4.2 Validação do grau de descontaminação do material de laboratório

De seguida faz-se a apresentação dos resultados e conclusões da Validação de Limpeza do material de laboratório, quer utilizando a lavagem manual quer a automática, de forma a demonstrar que não há presença de resíduos de detergente e nimesulida. Neste sentido, foram realizados testes visuais e testes físico-químicos/microbiológicos, depois de executado o procedimento de limpeza, de forma a assegurar os limites de aceitação estabelecidos.

### 4.2.1 Pesquisa de resíduos detergente

O método de amostragem por enxaguamento foi utilizado para pesquisa de detergente no material, após lavagem manual e lavagem automática.[36] Foram realizadas três repetições dos ensaios de pH, condutividade e TOC para cada tipo de material.

#### 4.2.1.1 Lavagem manual

No que diz respeito aos ensaios realizados para detectar a presença de resíduos de detergente após a lavagem manual, todos os pontos de amostragem apresentam resultados semelhantes aos obtidos para a água purificada (branco), dentro dos critérios de aceitação.

Tabela 4.10 - Resultados obtidos para a pesquisa de detergente, com lavagem manual.

Ensaio	Última Água Purificada de lavagem do material Manual	pH (5-7)	Condutividade (< 4,3 $\mu$ S/cm , 20°C)	TOC (< 0.5mg/L)
1	Balão volumétrico, 100 mL	5.95	0.736	0.200
2	Balão volumétrico, 100 mL	5.84	0.722	0.224
3	Balão volumétrico, 100 mL	5.89	0.724	0.350
1	Balão volumétrico, 5mL	6.86	1.263	0.291
2	Balão volumétrico, 5mL	6.91	1.122	0.473
3	Balão volumétrico, 5mL	6.87	1.301	0.410
1	Holder + filtro	6.01	0.807	0.089

Ensaio	Última Água Purificada de lavagem do material Manual	pH	Condutividade	TOC
		(5-7)	(< 4,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 20°C)	(< 0.5mg/L)
2	Holder + filtro	5.98	0.837	0.057
3	Holder + filtro	6.09	1.230	0.124
1	Copo de dissolução	5.72	0.816	0.048
2	Copo de dissolução	5.77	0.840	0.114
3	Copo de dissolução	5.72	0.807	0.141
1	Sonda	5.89	0.848	0.075
2	Sonda	5.77	1.140	0.054
3	Sonda	5.75	0.920	0.045
1	Tabuleiro	5.64	1.040	0.078
2	Tabuleiro	5.73	1.061	0.106
3	Tabuleiro	5.82	1.007	0.237
	Branco	5.93	0.314	0.045

Realizou-se o teste de Grubbs que permite detectar a presença ou não de outliers para todo o tipo de material apresentado na tabela da lavagem automática. Após a realização deste diagnóstico de valores discrepantes verifiquei que não existem outliers em nenhuma das técnicas utilizadas (pH, condutividade e TOC) e em nenhum material, pois os valores de  $G_{\text{máx}}$  e  $G_{\text{mín}}$  experimentais deram inferiores ao valor de  $G_{\text{crítico}}$  para as três repetições ( $n=3$ ).

Como exemplo, a tabela 4.11 mostra o tratamento estatístico dos dados obtidos para o balão volumétrico 100 mL, com lavagem manual.

**Tabela 4.11 - Resultados do tratamento de dados obtidos para o balão volumétrico 100 mL, após lavagem manual.**

	pH	Condutividade	TOC
<b>Mínimo</b>	5.84	0.72	0.20
<b>Máximo</b>	5.95	0.74	0.35
<b>Média</b>	5.89	0.73	0.26
<b>Desvio Padrão</b>	0.06	0.01	0.08
<b>G<sub>mín</sub></b>	0.97	0.70	0.72
<b>G<sub>máx</sub></b>	1.03	1.14	1.14
<b>G<sub>crit</sub> (n=3)</b>	1.15	1.15	1.15
<b>TV</b>	169.61	52.00	5.20
<b>T<sub>crit</sub>(0.01)</b>	6.96	6.96	6.96
<b>pH<sub>0</sub></b>	0.00	0.00	0.02

Pelo teste de Grubbs não há outliers ( $G_{\min}$  e  $G_{\max}$  menor que o  $G_{\text{crit}}$ ), no entanto através do teste t-student o valor do teste TV é superior ao valor crítico para qualquer um dos ensaios (pH, condutividade e TOC), logo a hipótese nula é rejeitada. Esta conclusão é consolidada com o valor da probabilidade da hipótese nula ser inferior a 5%. Deste modo verifica-se que os resultados das três determinações para cada ensaio não são estatisticamente iguais, isto é, apresentam um erro sistemático. Os erros sistemáticos podem ter diversas causas, tais como instrumentais (calibração do equipamento, danos), do método (reações incompletas, degradação da amostra), e pessoais (estimativa de leituras, ponto de viragem, erros de paralaxe, uso de pipetas.

Como os critérios de aceitação são as especificações dos parâmetros, considera-se o método de limpeza validado no que respeita à capacidade de remoção do detergente com a lavagem manual. O mesmo acontece com o material de amostragem – Sonda e tabuleiro.

#### 4.2.1.2 Lavagem automática

Após a lavagem automática, todos os pontos de amostragem das pipetas apresentam resultados semelhantes aos obtidos para a água purificada (branco) e dentro dos critérios de aceitação. Para os balões volumétricos tentou-se saber o mínimo de volume dos balões que podem ser sujeitos a este tipo de lavagem. A tabela 4.12 mostra os resultados de pH, condutividade e TOC obtidos para a pesquisa de detergente.

**Tabela 4.12 - Resultados de pH, condutividade e TOC obtidos para a pesquisa de detergente, com lavagem automática.**

Ensaio	Última Água Purificada de lavagem do material Automática	pH	Condutividade	TOC
		(5-7)	(< 4,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 20°C)	(< 0.5mg/L)
1	Pipeta graduada, 1 mL	6.19	1.018	0.376
2	Pipeta graduada, 1 mL	6.00	0.778	0.399
3	Pipeta graduada, 1 mL	6.02	0.738	0.396
1	Pipeta Graduada, 5 mL	5.89	0.815	0.350
2	Pipeta Graduada, 5 mL	5.93	1.385	0.304
3	Pipeta Graduada, 5 mL	5.73	1.067	0.404
1	Balão volumétrico, 100 mL	5.88	0.934	0.068
2	Balão volumétrico, 100 mL	5.89	0.793	0.057
3	Balão volumétrico, 100 mL	5.86	0.722	0.053
1	Balão volumétrico, 50 mL	6.07	0.878	0.061

Ensaio	Última Água Purificada de lavagem do material Automática	pH	Condutividade	TOC
		(5-7)	(< 4,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 20°C)	(< 0.5mg/L)
2	Balão volumétrico, 50 mL	5.96	0.865	0.058
3	Balão volumétrico, 50 mL	6.00	0.880	0.050
1	Balão volumétrico, 25 mL	5.91	0.828	0.058
2	Balão volumétrico, 25 mL	5.78	1.060	0.060
3	Balão volumétrico, 25 mL	5.85	1.103	0.056
1	Balão volumétrico, 20 mL	5.88	0.845	0.119
2	Balão volumétrico, 20 mL	5.83	0.856	0.100
3	Balão volumétrico, 20 mL	5.90	0.815	0.075
1	Balão volumétrico, 10 mL	5.84	0.498	0.069
2	Balão volumétrico, 10 mL	5.75	0.664	0.062
3	Balão volumétrico, 10 mL	5.85	0.763	0.074
1	Balão volumétrico, 5 mL	6.30	1.018	0.850
2	Balão volumétrico, 5 mL	6.38	0.941	0.905
3	Balão volumétrico, 5 mL	6.27	1.318	0.806
	Branco	5.94	0.472	0.023

Os resultados dos balões até 10 mL estão dentro dos critérios de aceitação, excepto o TOC dos balões volumétricos de 5 mL. Assinalado a vermelho na tabela 4.12 mostra que se obteve o TOC fora de especificação, nas três repetições. Deste modo, considera-se o método de limpeza validado para as pipetas e balões no mínimo de 10 mL no que respeita à capacidade de remoção do detergente com a lavagem automática, sendo que para balões de 5 mL não podem ser sujeitos a lavagem automática.

Para o material seleccionado para a lavagem automática também foi realizado o teste de Grubbs. Após a realização deste diagnóstico de valores discrepantes verifiquei que não existem qualquer outliers em nenhuma das técnicas utilizadas (pH, condutividade e TOC), pois os valores de  $G_{\text{máx}}$  e  $G_{\text{mín}}$  experimentais são inferiores ao valor de  $G_{\text{crítico}}$ , para  $n=3$ .

#### 4.2.2 Pesquisa de microorganismos

Balões de 100 mL “sujos” com nimesulida (matéria-prima, comprimidos e pomada) e material de amostragem da nimesulida (tabuleiro) foram lavados após lavagem manual.



Para a validação de limpeza, preencheu-se com 100ml de água estéril os balões de 100 mL seleccionados. Em seguida filtrou-se 25ml tanto para meio R<sub>2</sub>A como meio TSA. O esfregaço foi realizado como outro método de amostragem e inoculado em meio R<sub>2</sub>A.

A tabela 4.13 indica os resultados obtidos na análise microbiológica pelo método de filtração.

**Tabela 4.13 - Resultados obtidos para análise microbiológica da última água de lavagem, pelo método de filtração, com meios TSA e R<sub>2</sub>A.**

		FILTRAÇÃO ufc/mL ( < 100 ufc/mL)					
		TSA			R <sub>2</sub> A		
	Lavagem	Rep. 1	Rep. 2	Média	Rep. 1	Rep. 2	Média
<b>Pomada</b>	Sem acetona	0	0	0	0	0	0
<b>Pomada</b>	Com acetona	0	0	0	0	0	0
<b>Comprimidos</b>	Sem acetona	0	0	0	10	3	0
<b>Comprimidos</b>	Com acetona	0,12	0,08	0,1	0,08	0,16	0,12
<b>Tabuleiro</b>	Sem acetona	NR	NR	NR	1,16	0,44	0,8
<b>Tabuleiro</b>	Com acetona	NR	NR	NR	0,04	0	0,02
<b>Matéria-prima</b>	Sem acetona	0	N.R	--	0.04	N.R	--
<b>Matéria-prima</b>	Com acetona	0.04	N.R	--	0	N.R	--

Por sua vez, a tabela 4.14 mostra os resultados obtidos na análise microbiológica pelo método do esfregaço, com o meio R<sub>2</sub>A

**Tabela 4.14 - Resultados obtidos para análise microbiológica da última água de lavagem, o método de zaragatoa.**

		ZARAGATOA ufc/mL ( < 100 ufc/mL )			
		R <sub>2</sub> A			
	Lavagem	Rep. 1	Rep. 2	Média	
<b>Pomada</b>	Sem acetona	0	0	0	
<b>Pomada</b>	Com acetona	0	0	0	
<b>Comprimidos</b>	Sem acetona	0	0	0	
<b>Comprimidos</b>	Com acetona	0	0	0	
<b>Matéria-prima</b>	Sem acetona	0	0	0	

Na pesquisa de microorganismos, para qualquer tipo de nimesulida, material de amostragem, e sem e com passagem de acetona os resultados obtidos estão dentro dos critérios de aceitação.

### 4.2.3 Curva de calibração

Foram obtidos os seguintes tempos de retenção e respectivas áreas da análise por HPLC dos padrões de nimesulida, sistematizados na tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Tempos de retenção e áreas obtidas para os padrões de nimesulida obtidas por HPLC\*.

	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo de retenção	Área
P1	1.03	6.867	139936
P2	0.77	7.02	104810
P3	0.62	7.147	82568
P4	0.51	7.113	70748
P5	0.41	7.12	54961
P6	0.26	7.06	35139

\* Condições cromatográficas foram: HPLC LaChrom Elite (desgaseificador e forno integrados e autoinjector) com detector U.V./visível, pré-coluna LiChroCart 4 – 4 LiChospher 100 RP – 18e 5  $\mu\text{m}$ , coluna LiChroCART 250 – 4 LiChospher 100 RP – 18 (5 $\mu\text{m}$ ), detecção Ultravioleta a 230 nm, fluxo 1,3 ml/min, temperatura do forno à temperatura ambiente 22 $^{\circ}$ , volume de injeção: 20 $\mu\text{l}$ , auto-injector à temperatura ambiente, tempo de corrida: 15 ou 30 minutos.

Na figura 4.21 encontram-se representados os valores obtidos na calibração bem como o segmento de recta do modelo polinomial de primeiro grau que melhor ajusta estes valores por mínimos quadrados não ponderados. A curva de calibração demonstra que os resultados da metodologia analítica são directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, correlacionando a área dos picos do cromatograma.

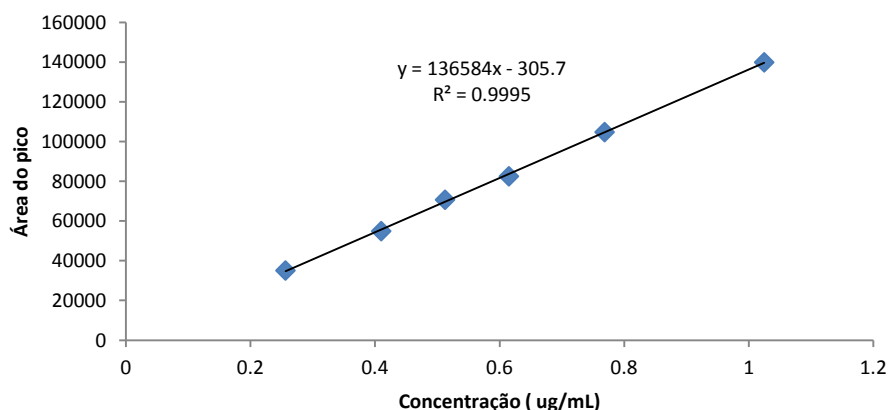


Figura 4.21 - Curva de calibração Nimesulida.

O coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva de calibração obtido foi de 0,9995.

Os resultados do limite de detecção e quantificação, calculados através das eqs.(2.14) e (2.15), respectivamente, conduziram aos valores de 0.02 e 0.07. Estes limites são muito mais baixos que os limites estabelecidos na monografia da Nimesulida, sendo eles respectivamente 0.5 e 1.6

#### 4.2.4 Pesquisa de resíduos de substância activa

Para pesquisar resíduos de nimesulida seguiu-se o esquema mostrado no organograma da figura 3.6.

Após proceder ao processo de limpeza escolhido, o material seleccionado foi enxaguado com a menor quantidade possível de ACN para solubilização de substância activa a pesquisar. As amostras foram preparadas nas mesmas condições da solução teste referida na parte experimental da Nimesulida e diluídas de 1/10 (v/v) com fase móvel. A solução teste tem o máximo de concentração de Nimesulida utilizados nos ensaios (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Essas amostras foram analisadas por HPLC LaChrom Elite (desgaseificador e forno integrados e auto injector) com detector U.V./visível, nas condições cromatográficas de trabalho:

- Pré-coluna: LiChroCART 4 – 4 LiChospher 100 RP – 18e 5  $\mu\text{m}$
- Coluna: LiChroCART 250 – 4 LiChospher 100 RP – 18 (5 $\mu\text{m}$ );
- Detecção: Ultravioleta a 230 nm;
- Fluxo: 1,3 ml/min;
- Temperatura do forno: temperatura ambiente (22°C);
- Volume de injeção: 20 $\mu\text{l}$ .
- Auto-injector: Temperatura ambiente
- Tempo de corrida: 15 ou 30 minutos
- Fase móvel: Solução tampão pH 7.0: Acetonitrilo (65:35,v/v)

Este ensaio foi repetido nas mesmas condições duas vezes. A tabela seguinte indica os resultados obtidos para a Nimesulida matéria-prima, com e sem passagem da acetona após lavagem manual, usando o método de amostragem enxaguamento.

**Tabela 4.16 - Resultados obtidos para a pesquisa de substância activa da Nimesulida (matéria-prima), usando enxaguamento como método de amostragem.**

Material (enxaguamento)	Concentração Máxima de Nimesulida (µg/mL)	Resultados HPLC (µg/mL)		LD	LQ
		Sem acetona	Acetona		
Balão volumétrico cl-A, 20 mL	1	0.02	N.D		
Balão volumétrico cl-A, 20 mL	1	N.D	N.D		
Balão volumétrico cl-A, 5 mL	1	N.D	N.D		
Balão volumétrico cl-A, 5 mL	1	N.D	N.D	0.02	0.07
Tabuleiro	1	0.01	N.D		
Tabuleiro	1	N.D	N.D		
Sonda	1	N.D	N.D		
Sonda	1	N.D	N.D		

Foram também feitas amostragens por esfregação nas espátulas, nos tabuleiros e sondas de amostragem da Nimesulida matéria-prima. A zaragatoa foi colocada num balão com ACN e foi levada ao ultrassons durante 10 min, e fez-se a solução com água nas mesmas condições das outras amostras. Esta solução sofreu uma diluição de 1/10 (v/v) com fase móvel antes da injeção no HPLC. Apresentam-se os resultados na tabela seguinte.

**Tabela 4.17 - Resultados obtidos para a pesquisa de substância activa da Nimesulida (matéria-prima) usando o esfregação como método de amostragem.**

Material (esfregação)	Área de amostragem (cm <sup>2</sup> )	Concentração Máxima de Nimesulida (µg/mL)	Resultados HPLC (µg/mL)		LD	LQ
			Sem acetona	Acetona		
Espátula inox	2	1	N.D	N.D		
Espátula inox	2	1	N.D	N.D		
Tabuleiro	25	1	N.D	N.D		
Tabuleiro	25	1	N.D	N.D	0.02	0.07
Sonda	16	1	N.D	N.D		
Sonda	20	1	N.D	N.D		

Após a passagem com acetona no material verificou-se a ausência de coloração amarela (acetona caracteriza-se por ser um líquido límpido e incolor), que permitiu assim confirmar visualmente a ausência de resíduos de substância activa no material utilizado.

**Tabela 4.18 - Resultados obtidos para a pesquisa de substância activa (teste adicional avaliação do aspecto da solução - solvente de pesquisa)- Lavagem manual.**

Amostra	Resultado	Critério de Aceitação
Balão volumétrico com rolha cl-A, 20 mL	Incolor	
Balão volumétrico com rolha cl-A, 5 mL	Incolor	Incolor
Espátula	Incolor	

Amostra	Resultado	Critério de Aceitação
Tabuleiro	Incolor	
Sonda	Incolor	
Branco Solvente (acetona)	Incolor	

A amostragem após a lavagem automática foi realizada do mesmo modo que a referida para a lavagem manual, tal como foi realizado o teste visual. A tabela 4.19 mostra que não foi detectado qualquer vestígio da substância activa nimesulida (matéria-prima), após o material ter sido sujeito à lavagem automática.

**Tabela 4.19 - Resultados obtidos para a pesquisa de substância activa da Nimesulida (matéria-prima) – lavagem automática.**

Material	Concentração Máxima de Nimesulida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resultado HPLC ( $\mu\text{g/mL}$ )		LD	LQ
		Sem acetona	Acetona		
Balão volumétrico cl-A, 20 mL	1	N.D	N.D		
Balão volumétrico cl-A, 20 mL	1	N.D	N.D		
Pipeta graduada, 1 mL	1	N.D	N.D		
Pipeta graduada, 1 mL	1	N.D	N.D	0.02	0.07
Pipeta graduada, 5 mL	1	N.D	N.D		
Pipeta graduada, 5 mL	1	N.D	0.01		

Após passagem com a acetona no material (teste visual) confirmou os resultados por HPLC devido à ausência de cor (tabela 4.20).

**Tabela 4.20 - Resultados obtidos para a pesquisa de substância activa (teste adicional avaliação do aspecto da solução - solvente de pesquisa)- Lavagem automática.**

Amostra	Resultado	Critério de Aceitação
Balão volumétrico com rolha cl-A, 20 mL	Incolor	
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 1 mL	Incolor	
Pipeta graduada escoamento parcial cl-A, 5 mL	Incolor	Incolor
Branco Solvente (acetona)	Incolor	

No que diz respeito aos ensaios realizados após lavagem manual e automática para detectar a presença de resíduos de substância activa no diverso material seleccionado, todas as análises efectuadas apresentaram resultados abaixo dos limites máximos estabelecidos ou até mesmo que não foi detectado qualquer pico de nimesulida como mostra o cromatograma obtido da amostra após análise em HPLC.

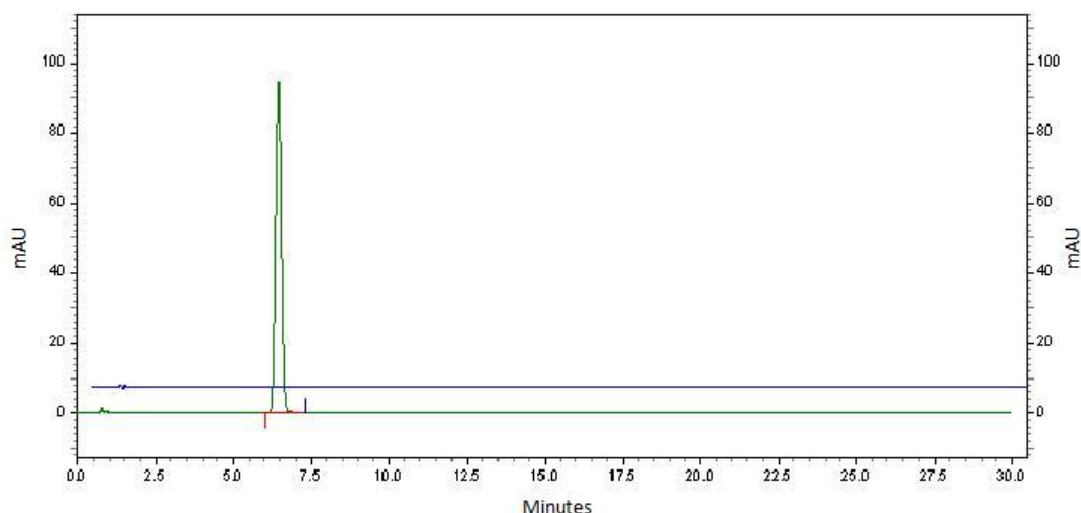


Figura 4.22 - Cromatograma com padrão de nimesulida (verde) e a amostra do material de laboratório (azul).

Todo o procedimento por HPLC anteriormente descrito para pesquisa da substância activa nimesulida matéria-prima foi o mesmo realizado para os comprimidos Jabasulide e a pomada Reumolide. Obteve-se resultados semelhantes, todos abaixo dos limites máximos estabelecidos. No teste visual a ausência de coloração amarela foi predominante em todo o material contaminado com Jabasulide e Reumolide, excepto no holder e filtro. Ao passar com acetona no holder e filtro mostrou uma coloração ligeiramente amarela, no entanto, como não foi detectada presença de nimesulida, permite também concluir que no final da lavagem a sua presença não tem significância.

Ao comparar a lavagem com e sem passagem de acetona, pode-se constatar que, apesar do valor ser muito baixo de Nimesulida, há uma maior tendência a encontrar algum vestígio de Nimesulida na lavagem manual, contudo ambas as lavagens, manual e automática, mostraram ser bastante eficazes na lavagem de todo o material.

Deverá ser feita uma revalidação de todo o protocolo e processo de validação da limpeza sempre que se verificarem alterações nos processos de limpeza ou análise, nomeadamente alteração de detergentes de limpeza, ciclos de lavagem, pré-lavagem, imersão das pipetas, etc. na medida em que a alteração de algum destes pontos irá afectar de forma significativa a eficácia da limpeza.

Não havendo alterações de maior ao processo de limpeza ou de análise, a revalidação da limpeza realizar-se-á bi-anualmente.

### 4.2.5 Taxa de recuperação

Segundo a equação 3.3, foi obtida uma taxa de recuperação em três determinações de 88%, 77% e 70%. Sendo a taxa de recuperação a média das três: 78%. O cromatograma seguinte mostra que o padrão coincide com amostra de nimesulida.

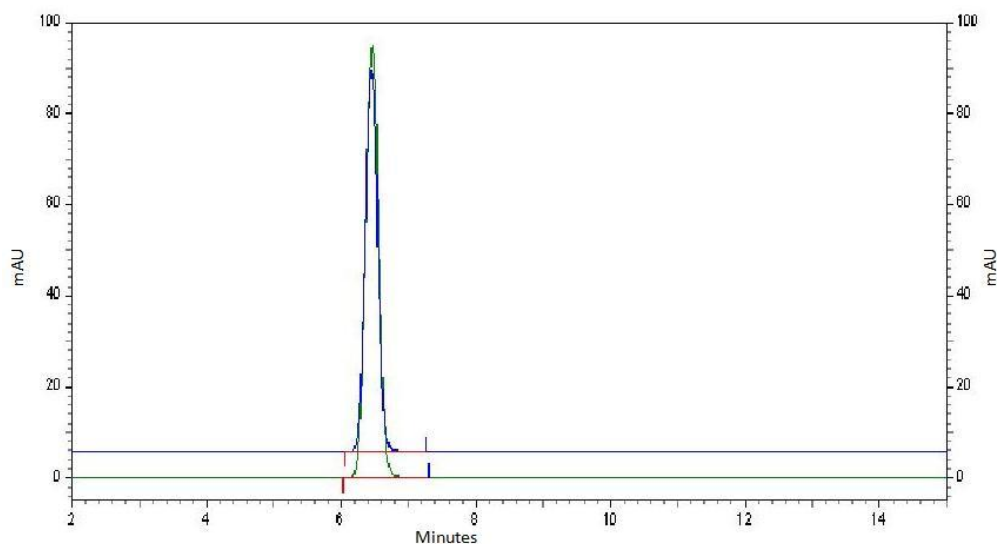


Figura 4.23 - Cromatograma do padrão (verde) e da amostra (azul) para cálculo da taxa de recuperação.

### 4.3 Validação do grau de descontaminação dos vials

De seguida faz-se a apresentação dos resultados e conclusões da validação de limpeza dos vials para análise de TOC de forma a demonstrar que estes podem ser reutilizados em análises posteriores após lavagem, caso este seja limpo de acordo com o método de “Limpeza de material de laboratório” ou com o reagente ácido crómico. Neste sentido, foram realizados três ensaios para análise de TOC, depois de executado alguns métodos de lavagem, de forma a assegurar os limites baixos de carbono comparando com resultados de vials novos.

### 4.3.1 Lavagem manual - Extran MA 03 isento de fosfatos

Após proceder à lavagem de 6 vials de acordo com as instruções mencionadas em 3.3.3.1, iniciou-se a recolhas para a análise de TOC. Primeiro recolheu-se água altamente purificada para um vial novo (branco 1), de seguida para os 6 vials diferentes de TOC lavados e por fim, novamente um branco 2 num vial novo. A análise de TOC foi realizada nessa mesma ordem, e em três dias diferentes (ensaio 1, 2 e 3). Os resultados das amostras e dos brancos são apresentados nas tabelas seguintes, respectivamente 4.21 e 4.22.

**Tabela 4.21 - Resultados obtidos do TOC após a lavagem manual dos vials, nos três dias consecutivos.**

Amostra	Método	Ensaio 1 (ppb)	Ensaio 2 (ppb)	Ensaio 3 (ppb)
1	Lavagem manual	31.4	21.3	29.2
2	Lavagem manual	45.4	22.2	18.8
3	Lavagem manual	51.0	24.5	27.3
4	Lavagem manual	44.3	20.2	20.8
5	Lavagem manual	49.3	25.0	29.4
6	Lavagem manual	42.2	20.8	23.8

**Tabela 4.22 – Resultados obtidos do TOC dos brancos 1 e 2, em três dias consecutivos.**

Branco	Ensaio 1 (ppb)	Ensaio 2 (ppb)	Ensaio 3 (ppb)
1	45.3	25.8	27.8
2	N.R	16.5	16.8
Média	45.3	21.2	22.3

A GE Analytical Instruments confirma a análise de um número representativo de unidades em conformidade com o estabelecido pela Quality Operating Instructions (QCI), de <10 ppb nos vials de TOC novos. Ao comparar os resultados do TOC dos brancos com os das seis amostras, verificamos que a diferença entre ambos é muito pouco significativa. Nem mesmo o valor mais baixo de TOC do branco difere em 10 ppb dos resultados dos vials lavados.

Não temos um valor de referência para comparar estatisticamente, mas se fizermos as diferenças entre as amostras da lavagem manual e a média do branco 1 e 2 dos diferentes ensaios (tabela 4.23) vamos poder comparar com o zero. Assim fazemos as diferenças e depois calculamos a média para poder comparar com o zero, através da equação 3.7.



**Tabela 4.23 - Diferença entre as amostras e a média do branco com os respectivos resultados da lavagem manual.**

Amostra	Ensaio1.1	Ensaio1.2	Ensaio1.3
1	-13.9	0.1	6.9
2	0.1	1	-3.5
3	5.7	3.3	5
4	-1	-1	-1.5
5	4	3.8	7.1
6	-3.1	-0.4	1.5

Pode-se contactar que o valor experimental ( $TV=0.68$ ) é menor que o valor crítico ( $T_{crit}=2.11$ ) a um nível de confiança de 95%, logo a hipótese nula é aceite, ou seja, não há diferença entre as amostras dos vials novos (brancos) e os vials lavados (lavagem manual). A probabilidade de aceitação da hipótese nula é superior a 5% o que indica que esta é válida: a lavagem manual e os brancos conduzem ao mesmo resultado.

**Tabela 4.24 - Resultados da diferença entre as amostras dos três ensaios (1.1, 1.2 e 1.3) e a média do branco**

<b>n</b>	18
<b>média</b>	0.78
<b>desviopadrão</b>	4.90
<b>TV</b>	0.68
<b>Tcrit(0.05)</b>	2.11
<b>pH0</b>	0.50

Assim, podemos concluir que se obteve valores de TOC semelhantes nos três dias consecutivos.

### 4.3.2 Lavagem com ácido crómico

Após a recolha do branco 2 mencionado no ponto anterior, recolheu-se água altamente purificada para 6 vials diferentes de TOC lavados com ácido crómico e por fim, novamente um branco 3 num vial novo. A análise de TOC foi realizada nesta mesma ordem, e em 3 dias diferentes.

**Tabela 4.25 – Resultados obtidos do TOC após a lavagem com ácido crómico dos vials, nos três dias consecutivos**

Amostra	Método	Ensaio 1 (ppb)	Ensaio 2 (ppb)	Ensaio 3 (ppb)
1	Ácido crómico	42.6	21.7	19.1
2	Ácido crómico	37.7	20.5	19.6
3	Ácido crómico	39.8	21.6	15.7

Amostra	Método	Ensaio 1 (ppb)	Ensaio 2 (ppb)	Ensaio 3 (ppb)
4	Ácido crómico	41.8	19.3	16.9
5	Ácido crómico	42.5	19.2	17.2
6	Ácido crómico	35.9	18.6	16.1

**Tabela 4.26 - Resultados TOC dos brancos 2 e 3, após ensaios em três dias consecutivos.**

Branco	Ensaio 1 (ppb)	Ensaio 2 (ppb)	Ensaio 3 (ppb)
2	45.3	16.5	16.8
3	N.R	14.5	16.2
Média	45.3	15.5	16.5

Ao comparar os resultados do TOC dos brancos com os das seis amostras após lavagem com ácido crómico, verificamos que a diferença entre ambos é muito pouco significativa.

A diferença do valor dos brancos, em qualquer um dos ensaios, já é menos significativa entre eles e as amostras. Qualquer um dos resultados das seis amostras de TOC de vials lavados difere em <10 pbb dos resultados dos brancos com vials novos.

Á semelhança do tratamento de dados para a lavagem manual dos vials, fez a diferença entre as amostras da lavagem com ácido crómico e a média do branco 2 e 3 (tabela 4.27).

**Tabela 4.27 - Diferença entre as amostras e a média do branco com os respectivos resultados da lavagem com ácido crómico.**

Amostra	Ensaio2.1	Ensaio2.2	Ensaio2.3
1	-2.7	6.2	2.6
2	-7.6	5	3.1
3	-5.5	6.1	-0.8
4	-3.5	3.8	0.4
5	-2.8	3.7	0.7
6	-9.4	3.1	-0.4

Segundo os resultados da tabela 4.28, a hipótese nula é aceite, através da equação 3.7 o valor teste ( $TV=0.120$ ) é menor que o valor crítico ( $T_{crit}=2.11$ ) e com probabilidade para a ocorrência dessa hipótese bastante alta, de 92%.

**Tabela 4.28 - Resultados da diferença entre as amostras dos três ensaios (2.1, 2.2 e 2.3) e a média do branco.**

n	18
média	0.11
desviopad	4.60

TV	0.10
Tcrit(0.05)	2.11
pH0	0.920

### 4.3.3 Comparação dos métodos de lavagem

Ambos os resultados da lavagem dos vials do TOC foram obtidos dentro de especificação e com valores até abaixo do limite de alerta (100 ppb), mostrando que esses métodos podem ser utilizados para a reutilização dos vials de TOC.

Foram comparados os dois métodos de lavagem de modo a mostrar se havia diferenças significativas entre eles, através da análise de variância factor duplo sem repetição.

A tabela 4.29 contém os resultados do ensaio 1.2 e 2.2 que levaram à realização de ANOVA (tabela 4.30).

Tabela 4.29 - Resultados do ensaio 1.2 e 2.2.

Amostra	Lavagem manual	Ácido crómico
1	6.9	2.6
2	-3.5	3.1
3	5	-0.8
4	-1.5	0.4
5	7.1	0.7
6	1.5	-0.4

Tabela 4.30 - ANOVA factor duplo sem repetição para os ensaios 1.2 e 2.2.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Amostras	48.55	5	9.71	0.76	0.61	5.05
Lavagens	8.17	1	8.17	0.64	0.46	6.61
Erro	63.77	5	12.75			

A lavagem com o ácido crómico mostrou ter um valor de prova superior à lavagem manual e resultados de TOC mais baixos. No entanto, os resultados entre ambas as lavagens, lavagem manual e com ácido crómico, foram bastantes semelhantes como mostra ANOVA factor duplo sem repetição. O valor do teste obtido para as lavagens (TV = 0.64) é inferior ao valor crítico previsto pela distribuição de Fisher unilateral (Tcrit= 6.61) o que indica que a hipótese nula é válida – o tipo de lavagem dá resultados semelhantes. A mesma conclusão é ainda reforçada pela respectiva estimativa da

probabilidade de ocorrência da hipótese nula (valor de prova de 0.46 o que corresponde a uma probabilidade relativa de 46%).

Tendo comprovado resultados semelhantes na lavagem dos vials, o produto de limpeza alcalino EXTRAN MAC 03, isento de fosfatos é menos corrosivo e menos agressivo que o ácido crómico. Assim, como alternativa ao agente de limpeza bastante corrosivo e nefasto para o meio ambiente sugere-se a utilização do método de lavagem manual para a reutilização dos vials para análise de TOC.

O objectivo foi cumprido, mas como o manuseio de reagentes e equipamentos que tenham contacto com a amostra é desafiador porque o Carbono Orgânico está em toda parte e a hipótese de contaminação é diversa, é muito importante não esquecer de todos os cuidados mencionados anterior na lavagem dos vials e na amostragem.

## 5 CONCLUSÕES

A validação do sistema de água purificada dos Laboratórios Basi foi realizada com sucesso através da compilação dos resultados analisados desde Dezembro de 2010 a Janeiro de 2012.

Na validação de limpeza do material de laboratório, todas as análises efectuadas para detectar a presença de resíduos de substância activa no diverso material seleccionado, apresentaram resultados abaixo dos limites máximos estabelecidos. Assim, após lavagem manual e automática, não foi detectada a presença de detergente nem de resíduos de substância activa no diverso material seleccionado, validando assim a limpeza do material de laboratório.

No entanto, houve uma excepção em que não foi validado a lavagem automática para os balões volumétricos de 5mL devido à presença de detergente nos mesmos. Estes só podem ser lavados através da lavagem manual.

Ao comparar a lavagem com e sem passagem de acetona, pode-se constatar que, apesar do valor ser muito baixo de Nimesulida, há uma maior tendência a encontrar algum vestígio de Nimesulida na lavagem manual. Especificamente para a lavagem do material usado na análise da Nimesulida, deve-se proceder à passagem de acetona realizando o teste visual de forma a assegurar a ausência de coloração amarela.

Deverá ser feita uma revalidação de todo o protocolo e processo de validação da limpeza sempre que se verificarem alterações nos processos de limpeza ou análise, nomeadamente alteração de detergentes de limpeza, ciclos de lavagem, pré-lavagem, imersão das pipetas, etc. na medida em que a alteração de algum destes pontos irá afectar de forma significativa a eficácia da limpeza.

Os resultados obtidos da lavagem dos vials para análise de TOC foram bastantes semelhantes e dentro dos critérios de aceitação em ambas as lavagens, lavagem manual e com ácido crómico. Tendo comprovado resultados semelhantes na lavagem dos vials, o produto de limpeza alcalino EXTRAN MA 03, isento de fosfatos é menos corrosivo e menos agressivo que o ácido crómico. Assim, como alternativa ao agente de limpeza bastante corrosivo e nefasto para o meio ambiente sugere-se a utilização do método de lavagem manual para a reutilização dos vials para análise de TOC.

O manuseio de reagentes e equipamentos que tenham contacto com a amostra é desafiador porque o carbono orgânico está em toda parte e a hipótese de contaminação é diversa. Foi notória a diferença do TOC até na primeira recolha da água altamente purificada para a recolha da água

seguinte. Assim, é muito importante proceder devidamente à lavagem dos vials e à amostragem para a realização da análise do TOC, tendo em conta todas as precauções e notas referidas na tese. Com a realização deste trabalho podemos concluir que a amostragem para análise de TOC deve ser realizada antes da recolha para análise da microbiologia que é usada etanol, pois este influencia os resultados de TOC da amostra.

Em suma, podemos concluir que todos os casos de estudo estão relacionados entre si. Sendo a água purificada o reagente mais utilizado em todas as análises, ao validar os sistemas de água purificada deu-nos a confiança necessária nos resultados das validações de limpeza.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Moreno, A.H.; Tozo, G.; Salgado, N., *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 2011, 32(1),69-75
- [2] Mierzwa JC. “*Tratamento da água na manipulação magistral*”, 2000, 57, 48-62.
- [3] WHO Technical Report Series – Annex 4, 2006, 937
- [4] Millipore, T , “Elix advantage sytem”, PB1221EN00, , EMD Millipore Corporation, 2012. Disponível em: <http://www.millipore.com/catalogue/module/C77083>
- [5] Millipore, T , “Milli-Q Integral sytem”, PB1008EN00, , EMD Millipore Corporation, 2012. Disponível em: <http://www.millipore.com/catalogue/module/C72876>
- [6] Veolia, W, “*ORION II - design Specification*”, DOVLON0004, 2008, 7-22
- [7] WHO Technical Report Series – Annex 3, 929, 2005
- [8] Peres CP. *Fármacos 1. & Medicamentos*, Ed. Brasileira, Novembro/Dezembro, 2001, 20-23
- [9] Clementino, N.; et al, *Rev. Bras.Farm.*, 2008, 89(1)
- [10] *Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants*, APCI, 2000, 23-29
- [11] Alencar, J; et.al, *Rev. Bras. Farm.*,2006, 87 (1)
- [12] *European Pharmacopoeia*, Council of Europe, 2010, 7th ed. , vol.1, 24-25
- [13] Hypólito R, Andrade S, Ezaki S, Marques JF, Nascimento SC. “Método para amostragem e detecção de íons em águas da zona não saturada. *Analytica*” 2009, 38:85-92.
- [14] *European Pharmacopoeia*, Council of Europe, 2010, 7th ed., vol.1, 59
- [15] *900 Laboratory Features and Benefits*. Disponível em: <http://www.geinstruments.com/products-and-services/toc-analyzers-and-sensors/900-laboratory-features-and-benefits.html>
- [16] *Operation and Maintenance Manual, Sievers 900 Series*, DLM 90688-03 Rev. A, 2011
- [17] Degani, A. ; Cass, B.; Vieira, C. “*Cromatografia: um breve ensaio. Atualidades em Química*”, 1998, 7, 21-25

- [18] European Pharmacopoeia, Council of Europe, 2010, 7th ed., vol.1, 45-46
- [19] Collins, H., *“Princípios básicos de cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos”* UNICAMP, 1997, 7, 11-27
- [20] Vogel, A. *“Análise Química Quantitativa”*. 6ª ed., 2002, 462
- [21] Harris, D., *“Análise Química Quantitativa.”* 6ª ed., 2005, 876
- [22] European Pharmacopoeia, Council of Europe, 2010, 7th ed., vol.2, 3222-3224
- [23] European Pharmacopoeia, Council of Europe, 2010, 7th ed., vol.2, 3224-3225
- [24] *Manual Extran detergents*, 6, 11, 14
- [25] European Pharmacopoeia. 7th ed., Council of Europe, 2010, 2577-2578
- [26] Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4495>
- [27] Tan, H.; et.al, *“Nimesulide – Induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure”*, 2007, 48, 6, 582
- [28] Rainsford, K., *“Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclo-oxygenase-2 NSAID, nimesulide. Inflammopharmacology.”* Vol. 54, 2006, 4, 120–137
- [29] Kulkarni, S., *“On the safety of nimesulide, a preferencial COX-2 inhibitor. Current Science.”*, Vol. 83, 12, 2002, 1442-1443
- [30] PIC/S guideline PIC/S PI006, *Validatability of cleaning procedures*, section 8.B
- [31] *EudraLex, “The Rules Governing Medicinal Products in the European Union”, 2010, 4 , 4*
- [32] PIC/S guideline PIC/S PI006, swab, section 8.F.1 . Disponível em: <http://www.gmpua.com/Validation/CV/index.html>
- [33] *Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants*, APCI, 2000, 9-14
- [34] Health Products and Food Branch Inspectorate - *Cleaning Validation Guidelines*, 2000, 7-9
- [35] PIC/S guideline PIC/S PI006, *Validatability of cleaning procedures*, section 8.B
- [36] Test Tube Preparation Guidelines for low Total Organic Carbon (TOC) analysis, Sievers, 914-80012, 2009
- [37] Chromic Acid Test Tube Cleaning Procedure, Siervers, 914-80005, 2009



- [38] Miller, D.J. and L. Yan, *Approximate maximum entropy joint feature inference consistent with arbitrary lower-order probability constraints: application to statistical classification*. *Neural Comput*, 2000, 12, 9, 2175-207
- [39] Miller, J.N. and J.M. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 5th ed. 2005: Pearson.
- [40]. ISO 5725-6, "*Accuracy trueness and precision of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values*", 1994
- [41]. Chui, Q.; Barros C.; , Silva, T., *Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial - Como usá-lo*, *Química Nova*, 2009, 32 [8], 2209-2213
- [42]. Oliveira, E., "*Comparação das diferentes técnicas para a exclusão de "outliers"*" ENQUALAB, 2008

# ANEXOS

**A1** – Codificação da localização dos diferentes pontos de uso e de controlo da água dos sistemas de depuração de água ORION.

**Tabela A1.1. Codificação da localização dos diferentes pontos de uso da água do sistema de depuração de água ORION.**

<i>Pontos de Uso</i>	<i>Tipo</i>	<i>Localização</i>
HV1701	Manual	Produção – Sala P.030 – Sala de Lavagens
HV1702	Manual	Produção – Sala P.030 – Sala de Lavagens
HV1703	Manual	Produção – Sala P.025 – Sala de Preparação de Líquidos
HV1704	Manual	Produção – Sala P.025 – Sala de Preparação de Líquidos
HV1705	Manual	Produção – Sala P.025 – Sala de Preparação de Líquidos
HV1706	Manual	Produção – Sala P.020 – Sala de Preparação de Pastosos
HV1707	Manual	Produção – Sala P.020 – Sala de Preparação de Pastosos
HV1708	Manual	CQ – Sala M023 – Sala de Lavagens
HV1709	Manual	CQ – Sala M010 – Laboratório FQ
HV1710	Manual	CQ – Sala M046 – Sala de Lavagens/Descontaminação
HV1711	Manual	CQ – Sala M054 – Sala de Preparação de Meios
HV1712	Manual	CQ – Sala M065 – Sala de Galénicos
HV1713	Manual	Produção – Sala P.017 – Sala de Lavagens de Fábrica
HV1714	Manual	Produção – Sala P.017 – Sala de Lavagens de Fábrica
XV1701	Automático	Produção – Sala P.025 – Sala de Preparação de Líquidos
XV1702	Automático	Produção – Sala P.025 – Sala de Preparação de Líquidos
XV1703	Automático	Produção – Sala P.020 – Sala de Preparação de Pastosos
XV1704	Automático	Produção – Sala P.018 – Sala das Águas

**Tabela A1.2. Codificação da localização dos diferentes pontos de controlo da água dos sistemas de depuração de água ORION.**

<i>Pontos de Controlo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Localização</i>
V10-02	Manual	Água de rede
V10-11	Manual	Água após tratamento do cloro
V45-01	Manual	Após Osmose Inversa
V70-01	Manual	Após CDI
V80-01	Manual	Saída do ORION II
SSP1601	Manual	Saída do Tanque de Armazenamento (antes de UV)
SSP1602	Manual	Saída do Tanque de Armazenamento (após UV)
SSP1603	Manual	Entrada do Tanque de Armazenamento (antes de UV)
SSP1604	Manual	Entrada do Tanque de Armazenamento (após UV)

**A2 – Tabela estatística.**

**Tabela A2.1 Valores críticos para o teste de Grubbs ( $\alpha=0.05$ ).**

<i>n</i>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<i>G</i>	1.15	1.48	1.71	1.89	2.02	2.13	2.21	2.29	2.34
<i>n</i>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<i>G</i>	2.41	2.46	2.51	2.55	2.54	2.62	2.65	2.68	2.71
<i>n</i>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
<i>G</i>	2.73	2.76	2.78	2.80	2.82	2.91	2.98	3.04	3.13
<i>n</i>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>110</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>
<i>G</i>	3.20	3.26	3.31	3.35	3.38	3.42	3.44	3.47	3.49

### A3 – Resultados do equipamento Integral 3.

Tabela A3.1 - Resultados do parâmetros condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), contagem microbiana ( $\mu\text{fc}/\text{mL}$ ) e TOC (ppb), nos diferentes dispensadores e depósito do Integral 3.

Lotes	Q-POD			E-POD			DEPÓSITO	
	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Contagem microbiana ( $\mu\text{fc}/\text{mL}$ )	TOC (ppb)	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Contagem microbiana ( $\mu\text{fc}/\text{mL}$ )	TOC (ppb)	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Contagem microbiana ( $\mu\text{fc}/\text{mL}$ )
AP-131210	0.4	0	N.R	1.5	0	N.R	N.R	N.R
AP-201210	0.7	0	N.R	0.4	0	N.R	0.8	0
AP-271210	1	0	N.R	0.8	0	N.R	0.9	0
AP-030111	0.8	0	N.R	0.9	0	N.R	1	0
AP-100111	0.7	0	N.R	0.7	0	N.R	0.7	0
AP-170111	0.7	0	N.R	0.8	0	N.R	0.7	0
AP-240111	0.4	0	23.2	0.7	0	57.5	0.4	0
AP-310111	0.6	0	25.1	0.9	0	37.6	0.7	0
AP-070211	0.4	0	35.4	0.7	0	46.8	0.8	0
AP-140211	0.4	0	34.3	1.6	0	79.4	0.9	0
AP-210211	0.4	0	15.4	1.1	0	23.4	1.1	0
AP-280211	0.4	0	N.R	0.8	0	N.R	0.4	0
AP-070311	0.8	0	N.R	0.4	0	N.R	0.9	0
AP-140311	0.3	0	N.R	0.8	0	N.R	0.8	0
AP-210311	0.3	0	N.R	0.8	0	N.R	0.7	0
AP-280311	0.3	0	N.R	1.2	0	N.R	0.7	0
AP-040411	0.3	0	N.R	0.7	0	N.R	0.4	0
AP-110411	0.3	0	N.R	0.8	0	N.R	0.7	0
AP-180411	0.3	0	73.4	0.8	0	82.4	0.8	0
AP-250411	0.4	0	61.4	0.9	0	63.1	0.8	0
AP-020511	0.3	0	36.7	0.8	0	48.4	1.3	0
AP-090511	0.3	0	40.1	0.8	0	56.8	0.9	0
AP-160511	0.3	0	30.6	0.9	0	43.8	0.9	0
AP-230511	0.3	0	35.8	0.4	0	54.8	0.8	0
AP-060611	0.3	0	30.8	0.9	0	51.9	1	0
AP-130611	0.3	0	40.8	0.8	0	104	0.9	0
AP-270611	0.4	0	45.2	0.8	0	60.4	0.9	0
AP-040711	0.3	0	48.9	0.8	0	25.6	0.8	0.02
AP-110711	0.3	0	47.9	0.4	0	65.5	0.7	0.04
AP-180711	0.3	0	30.8	0.9	0	53.4	0.9	0.08
AP-250711	0.3	0	N.R	0.8	0	N.R	0.8	N.R
AP-150811	0.4	N.R	N.R	0.4	N.R	N.R	0.4	N.R
AP-220811	0.3	0	19.8	0.4	0	38.4	0.8	0
AP-290811	0.3	0	38.1	0.8	0	48.4	0.4	0
AP-050911	0.3	0	27.4	0.8	0	40.7	0.8	0
AP-120911	1	0	20	0.3	0	29.7	1	0

<b>AP-190911</b>	0.3	0	28.2	0.3	0.18	36.9	0.7	0
<b>AP-260911</b>	0.4	0	53.1	0.7	0.14	95.4	0.8	0.18
<b>AP-031011</b>	0.4	0.01	21.6	0.8	0.24	33	0.7	0
<b>AP-101011</b>	0.6	0	N.R	0.7	0.2	N.R	0.7	0.2
<b>AP-171011</b>	N.R	0	N.R	N.R	0.14	N.R	N.R	0.41
<b>AP-241011</b>	N.R	0	N.R	2.8	0.1	N.R	2.8	0.27
<b>AP-311011</b>	N.R	0	6.23	2.4	0.06	N.R	N.R	0.19
<b>AP-071111</b>	N.R	0	27.7	2.8	0.14	41.2	2.8	0.22
<b>AP-141111</b>	0.9	0	22.5	1.3	0	28.7	1.1	0.02
<b>AP-211111</b>	1	0	65.4	1	0	38.3	1	0.07
<b>AP-281111</b>	1.1	0	25.4	1.1	0	29.4	1.1	0
<b>AP-051211</b>	0.9	0	29	1.1	0	34.4	1.2	0.06
<b>AP-121211</b>	0.9	0	41.8	1.1	0	19.9	0.7	0.08
<b>AP-191211</b>	0.6	0	97.8	0.7	0	21.8	0.5	0
<b>AP-261211</b>	0.5	0	477	0.6	0	71.8	0.5	0
<b>AP-020112</b>	0.6	0	104	0.6	0	242	0.5	0
<b>AP-090112</b>	0.5	0	23.6	0.7	0	37.2	0.5	0
<b>AP-160112</b>	0.5	0	15.4	0.7	0	16.2	0.5	0.05
<b>AP-230112</b>	0.4	0	29.2	0.6	0	46.1	0.4	0.08
<b>AP-300112</b>	0.4	0	121	0.4	0	177	0.4	0.06