

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Caroline Moura Ramirez Pribul

**AVALIAÇÃO DA SISTEMATIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE
LIMPEZA EM ROTA PRODUTIVA DE SÓLIDOS HORMONAIIS**

Rio de Janeiro
2012

Caroline Moura Ramirez Pribul

**AVALIAÇÃO DA SISTEMATIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE
LIMPEZA EM ROTA PRODUTIVA DE SÓLIDOS HORMONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Armi Wanderley Nóbrega

Rio de Janeiro
2012

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Pribul, Caroline Moura Ramirez

Avaliação da sistematização e desenvolvimento da validade de limpeza em rota produtiva de sólidos hormonais / Caroline Moura Ramirez Pribul. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

93 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Armi Wanderley Nóbrega

Caroline Moura Ramirez Pribul

**AVALIAÇÃO DA SISTEMATIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE
LIMPEZA EM ROTA PRODUTIVA DE SÓLIDOS HORMONAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Gemal
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Isabella Fernandes Delgado
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Prof^a. Dr. Marco Antonio Mota da Silva
Universidade Estadual da Zona Oeste

Prof. Dr. Armi Wanderley Nóbrega (Orientador)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui e por me dar forças para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais pelo eterno apoio e incentivo, me mostrando que saber nunca é demais.

Ao meu marido Bruno que soube aguentar os momentos estressados.

A todos os familiares, obrigada pelo carinho, em especial minhas avós que sempre me mostraram o valor que tem o estudo.

A Márcia Weiss, responsável técnica da empresa que possui a rota em questão, e Rosangela Veiga pela oportunidade de realizar este sonho.

Aos meus amigos de trabalho Vittorio Ferreira, Solange Oliveira, Valéria Celebrine, Alessandra Vieira, Ana Soares, Francenayde, Elaine Germano e Elson Couto pelo apoio no momento em que o tempo parecia faltar.

A Msc. Adriana Vaccari e Dra. Wania Renata pelo apoio e flexibilidade na reta final.

A Dra. Carla Monica pela ajuda para clarear as palavras no momento de escrever.

Aos amigos Jonicéia, Edmilson, Rodrigo, Marina, Alessandra, Ivone e Priscila pela enorme torcida.

As minhas amigas de mestrado Myrna, Bruna, Ana Paula, Ana e Marly, sem dúvida sem vocês isso não seria possível!

Ao Prof. Msc. Sérgio Alves por me ajudar a desvendar os mistérios da Estatística Aplicada.

Ao Prof. Dr. Armi por me aceitar como aluna mesmo depois de tantos anos, por todo aprendizado, sabedoria e principalmente amizade. Pessoas como você me fazem acreditar num futuro melhor para o nosso país.

Ao Prof. Dr. André Gemal e Profa. Dra. Isabela Delgado pelas considerações da qualificação que acredito terem lapidado o conhecimento que possuía e me deram outro ponto de vista.

Ao Profa. Dra. Márcia Sarpa pela revisão desta dissertação mesmo em um momento tão delicado e pela inspiração de vida.

Alguém que nunca cometeu erros nunca tratou
de fazer algo novo.

Albert Einstein

RESUMO

A contaminação cruzada é um problema de saúde pública, ao qual toda sociedade está exposta, a cada dia, ao comprar um simples analgésico ou qualquer outro medicamento vendido nas farmácias. Por isso a ANVISA cobra incisivamente a Validação de Limpeza e as empresas se interessam em garantir o atendimento integral a esta exigência, a fim de manter sua licença de funcionamento e, principalmente, garantir um medicamento de alta qualidade no mercado. O objetivo particular da Validação de Limpeza é garantir que através do procedimento de limpeza empregado não haverá contaminação cruzada significativa entre um produto e outro da mesma rota. Um fluxograma para sistematização da Validação de Limpeza foi elaborado e utilizado como guia no decorrer do trabalho. Os procedimentos de limpeza foram avaliados criticamente obtendo resultado positivo. O produto pior caso foi determinado pela solubilidade e toxicidade do ativo que o compunha. O limite foi calculado, sendo menor ou igual a 3,66 µg/mL para o etinilestradiol e menor ou igual a 14,50 µg/mL para o gestodeno. A metodologia analítica desenvolvida e validada para monitorar a ocorrência de contaminação cruzada foi a amostragem por “swab” e determinação cromatográfica simultânea de resíduos de gestodeno e etinilestradiol. O método apresentou limite de detecção de 0,004 µg/mL para etinilestradiol e 0,002 µg/mL para gestodeno. Este foi considerado seletivo, preciso, acurado e robusto de acordo com a Resolução nº899/2003 da ANVISA. O fator de recuperação por amostragem com “swab” foi de 90,45% para etinilestradiol e 83,52 % para gestodeno em superfície de inox e 87,31% para etinilestradiol e 81,21 % para gestodeno em superfície emborrachada. O método foi aplicado com sucesso e todos os pontos foram amostrados da superfície dos equipamentos. Os resultados obtidos nas análises foram corrigidos pelo fator de correção afim de estimar o pior caso. Todos os pontos de amostragem apresentaram resultados aceitáveis. Um ponto de amostragem do granulador com superfície emborrachada, no entanto, apresentou resultados discrepantes. Assim dedicou-se esta peça para cada produto afim de minimizar riscos na rota fabril. Conclui-se que os procedimentos de limpeza desta rota produtiva são eficientes removendo os resíduos ativos até níveis aceitáveis, evitando assim uma contaminação cruzada.

Palavras-chave: Validação de limpeza. Contaminação Cruzada. Amostragem por “swab”. Gestodeno. Etinilestradiol.

ABSTRACT

Cross contamination is a public health problem, to which every society is exposed every day to buy a simple analgesics or any medicine sold in pharmacies. So the ANVISA charges pointedly Cleaning Validation and the companies are interested in ensuring full compliance with this requirement in order to maintain its license to operate, and especially to ensure a high quality product on the market. The particular objective of cleaning validation is to ensure that through the cleaning procedure used there is no significant cross-contamination from one product to another at the same route. A flowchart for the systematization of Cleaning Validation was developed and used as a guide during the work. The cleaning procedures were critically evaluated obtaining a positive result. The worst case product was determined by the solubility and toxicity of the active composing. The limit was calculated, being less than or equal to 3,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ethinylestradiol and less than or equal to 14,50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for gestodene. . A cleaning validation method was developed and validated, based on swabbing sampling and simultaneous chromatographic determination of gestodene and ethinylestradiol residues. The method has a detection limit of 0,004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ethinylestradiol and 0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to gestodene. This was considered selective, precise, accurate and robust in accordance with Resolution No. 899/2003 of ANVISA. The recovery factor by sampling to swab was 90.45% to 83.52% for ethinylestradiol and gestodene, on the surface of stainless steel respectively, and 87.31% to 81.21% for ethinylestradiol and gestodene rubberized surface respectively. The method was successfully applied and all points were sampled from the surface of the equipments. The results obtained in this study were corrected by the correction factor in order to estimate the worst case. All sampling sites showed acceptable results, however a single point presented discrepant results of others as a way to eliminate this point that could potentially pose a risk, was used the strategy to dedicate this piece to each product in that productive route. This brings to conclusion that the cleaning procedures are efficient for this productive route, removing active residual to acceptable levels, thus avoiding cross-contamination.

Keywords: Cleaning Validation. Cross Contamination. Sampling "swab". Gestodene. Ethinylestradiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular do Etinilestradiol.....	28
Figura 2	Estrutura molecular do Gestodeno.....	29
Figura 3	Estrutura molecular da Tibolona.....	29
Figura 4	Fluxograma da sequencia cronológica de equipamentos da rota produtiva dos medicamentos.....	32
Figura 5	Fórmula para cálculo de Limite de Detecção e limite de Quantificação.....	38
Figura 6	Fluxograma lógico-sistemático para validação de limpeza.....	44
Figura 7	Lista de checagem para avaliação do procedimento de limpeza.....	46
Figura 8	Cálculo do Índice para escolha do pior caso.....	47
Figura 9	Relação teórica de dose-efeito para toxicidade aguda comparando o potencial da exposição em termos de ocupação, nível de exposição e possíveis efeitos biológicos.....	50
Figura 10	Fórmula para estimativa do NOEL.....	51
Figura 11	Critério de 0,1% da dose limite.....	53
Figura 12	Critério de 10 ppm.....	54
Figura 13	Tela inicial do software Geometry 1.0.....	55
Figura 14	Moinho Comasa da Rota Produtiva.....	56
Figura 15	Descarga – Parte do Moinho Comasa.....	56
Figura 16	Tela para cálculo de volume e área superficial do cilindro.....	56
Figura 17	Ensaio de linearidade para Etinilestradiol.....	59
Figura 18	Ensaio de linearidade para Gestodeno.....	59
Figura 19	Linearidade dos resultados do Analista 1 no dia 1 para Etinilestradiol.....	60
Figura 20	Linearidade dos resultados do Analista 1 no dia 1 para Gestodeno.....	60
Figura 21	Linearidade dos resultados do Analista 2 no dia 2 para Etinilestradiol.....	60
Figura 22	Linearidade dos resultados do Analista 2 no dia 2 para Gestodeno.....	61
Figura 23	Foto do swab utilizado nas amostragens.....	66
Figura 24	Modo de amostrar a superfície.....	66
Figura 25	Álbum do Misturador.....	70
Figura 26	Álbum do Granulador TK-Fielder.....	71
Figura 27	Álbum da Estufa.....	72
Figura 28	Álbum do Moinho Comasa.....	73

Figura 29	Álbum da Compressora Fette e seu desempoeirador.....	75
Figura 30	Álbum da Blisterizadora.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Vantagens e Desvantagens entre a amostragem por esfregaço e água de rinsagem.....	39
Quadro 2	Fator toxicidade (fT) em função da DL50.....	48
Quadro 3	Fator solubilidade em água (fS) em PPM.....	48
Quadro 4	Fator dificuldade (fD).....	48
Quadro 5	Fator Ocupação (fO).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes do HPLC Agilent.....	34
Tabela 2	Reagentes utilizados nos testes.....	35
Tabela 3	Materiais e equipamentos utilizados nos testes.....	35
Tabela 4	Padrões utilizados nos testes.....	35
Tabela 5	Avaliação da solubilidade em água e toxicidade (DL50) para os ativos da Rota de Fabricação.....	52
Tabela 6	Dados para cálculo do resíduo aceitável.....	57
Tabela 7	Resultados dos dois critérios para os dois ativos.....	57
Tabela 8	Resultados para o teste de especificidade/seletividade.....	58
Tabela 9	Avaliação da precisão intracorrída do Analista 1, intracorrída do Analista 2 e intercorrída.....	61
Tabela 10	Resultados da exatidão.....	62
Tabela 11	Resultado ensaio de Robustez.....	63
Tabela 12	Resultados do limite de Quantificação e Detecção em µg/mL pelo método matemático e experimental.....	64
Tabela 13	Fator de recuperação de ativos em superfície de aço inox.....	67
Tabela 14	Fator de correção de trabalho em superfícies de aço inox.....	67
Tabela 15	Fator de recuperação de ativos em superfície emborrachada.....	68
Tabela 16	Fator de correção de trabalho em superfícies emborrachada.....	68
Tabela 17	Critério de seleção de pontos para Misturador.....	70
Tabela 18	Critério de seleção de pontos para Granulador TK-Fielder.....	71
Tabela 19	Critério de seleção de pontos para Estufa.....	72
Tabela 20	Critério de seleção de pontos para Moinho Comasa.....	74
Tabela 21	Critério de seleção de pontos para Compressora Fette e seu desempoeirador.....	77
Tabela 22	Critério de seleção de pontos para Blisterizadora.....	79
Tabela 23	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Misturador.....	80
Tabela 24	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Granulador TK Fielder.....	80

Tabela 25	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Estufa.....	81
Tabela 26	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Moinho Comasa.....	81
Tabela 27	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Compressora Fette e seu desempoeirador	81
Tabela 28	Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Blisterizadora.	82
Tabela 29	Resultados das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Granulador TK Fielder após exclusão do ponto da Gaxeta.....	83

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACN	Acetonitrila
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DL50	Dose letal de 50%
fT	Fator de Toxicidade
fO	Fator de Ocupação
fS	Fator de Solubilidade
fD	Fator de Dificuldade
h	Altura
HPLC	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Resolução
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MaxTDsubs	Máxima dose diária do subsequente
MBSsubs	Tamanho mínimo do lote subsequente
MTDcont	Mínima dose diária do contaminante
NOEL	Nível de dose onde não é observado efeito
r	Raio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
S	Solubilidade
S.A.	Área superficial
SRSA	Área compartilhada pelos produtos
USP	United States Pharmacopeia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	VIGILÂNCIA SANITÁRIA E VALIDAÇÃO.....	20
1.1.1	Da vigilância sanitária ao conceito de validação de limpeza no Brasil.....	20
1.1.2	Validação.....	23
1.1.3	Validação de Limpeza.....	24
1.2	SUBSTÂNCIAS ATIVAS DA ROTA HORMONAL.....	26
1.2.1	Etinilestradiol.....	27
1.2.2	Gestodeno.....	28
1.2.3	Tibolona.....	29
2	RELEVÂNCIA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	SISTEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA.....	32
4.2	DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA.....	32
4.2.1	Lista de Checagem para Avaliação do Procedimento de Limpeza.....	33
4.2.2	Análise Crítica das Estratégias para Determinação de Pior Caso.....	33
4.2.3	Elucidação do Cálculo Utilizado para a Determinação de Resíduo Aceitável e Cálculo.....	33
4.2.4	Validação da Metodologia Analítica para Detecção de Resíduo Ativo.....	34
4.2.4.1	<i>Ensaio de Especificidade/Seletividade.....</i>	<i>35</i>
4.2.4.2	<i>Ensaio de Linearidade (Curva de calibração).....</i>	<i>36</i>
4.2.4.3	<i>Ensaio de Precisão inter e intra corrida / Exatidão.....</i>	<i>36</i>
4.2.4.4	<i>Ensaio de Robustez.....</i>	<i>37</i>
4.2.4.5	<i>Ensaio para Limite de Quantificação e Detecção.....</i>	<i>37</i>
4.2.5	Estabelecimento de parâmetros adequados para ensaio de recuperação de ativo.....	38
4.2.5.1	<i>Determinação do procedimento de amostragem.....</i>	<i>38</i>
4.2.5.2	<i>Recuperação de ativo.....</i>	<i>40</i>

4.2.6	Acompanhamento do processo de limpeza, inspeção visual, amostragem e análise das amostras após limpeza.....	40
4.2.6.1	<i>Determinação dos pontos de amostragem.....</i>	40
4.2.6.2	<i>Acompanhamento do processo.....</i>	41
4.2.6.3	<i>Inspeção Visual.....</i>	41
4.2.6.4	<i>Amostragem e Análise das Amostras.....</i>	42
4.2.7	Análise de impacto da inclusão de novo produto na rota de produção ou inclusão/substituição de equipamento diferente na rota.....	42
5	RESULTADOS E DICUSSÃO.....	43
5.1	SISTEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA.....	43
5.2	DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA.....	46
5.2.1	Lista de Checagem para Avaliação do Procedimento de Limpeza.....	46
5.2.2	Análise Crítica das Estratégias para Determinação de Pior Caso.....	47
5.2.3	Elucidação do Cálculo Utilizado para a Determinação de Resíduo Aceitável e Cálculo.....	52
5.2.4	Validação da Metodologia Analítica para Detecção de Resíduo Ativo.....	58
5.2.4.1	<i>Ensaio de Especificidade/Seletividade.....</i>	58
5.2.4.2	<i>Ensaio de Linearidade (Curva de calibração).....</i>	58
5.2.4.3	<i>Ensaio de Precisão inter e intra corrida / Exatidão.....</i>	59
5.2.4.4	<i>Ensaio de Robustez.....</i>	63
5.2.4.5	<i>Ensaio para Limite de Quantificação e Detecção.....</i>	64
5.2.5	Estabelecimento de parâmetros adequados para ensaio de recuperação de ativo.....	65
5.2.5.1	<i>Determinação do procedimento de amostragem.....</i>	65
5.2.5.2	<i>Recuperação de ativo.....</i>	65
5.2.6	Acompanhamento do processo de limpeza, inspeção visual, amostragem e análise das amostras após limpeza.....	69
5.2.6.1	<i>Determinação dos pontos de amostragem.....</i>	69
5.2.6.2	<i>Acompanhamento do processo.....</i>	79
5.2.6.3	<i>Inspeção Visual.....</i>	79
5.2.6.4	<i>Amostragem e Análise das Amostras.....</i>	80
5.2.7	Análise de impacto da inclusão de novo produto na rota de produção ou inclusão/substituição de equipamento diferente na rota.....	84
6	CONCLUSÃO.....	86

REFERÊNCIAS.....	88
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A constante evolução tecnológica, particularmente acentuada na indústria farmacêutica, exige dos profissionais desta área uma busca permanente por atualização a fim de garantir adequada qualidade e produtividade em suas ações. Esta busca por conhecimento é imprescindível para garantir as Boas Práticas de Fabricação (BPF) no desempenho de suas atividades, de forma a levar ao mercado produtos com alto grau de qualidade.

Segundo Fiocchi e Miguel (2006) na área de saúde, os fatores, como a qualidade e o desempenho profissional, estão ligados à garantia da eficácia e segurança dos produtos e/ou serviços oferecidos aos consumidores.

As BPF é um sistema designado para garantir que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados de acordo com padrões de qualidade, visando eliminar riscos envolvidos na produção (ARAÚJO et al, 2008). O cumprimento das BPF está direcionado para minimizar os riscos presentes na produção farmacêutica, que não podem ser detectados com a análise do produto final: contaminação cruzada, contaminação com material particulado ou alteração ou mistura de produtos (BOTET, 2006).

As agências regulatórias na área sanitária constantemente publicam normas, legislações, guias a fim de indicar e regular a área de medicamentos para que desta forma as indústrias farmacêuticas levem através de seu produto saúde, qualidade e segurança a população que o consome. Um dos principais focos no momento da auditoria e no registro do medicamento são as Validações.

Validação é definida como ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados, e esta é uma exigência regulatória no Brasil tanto para métodos, quanto para processos e procedimento de limpeza (ANVISA, 2010).

O objetivo particular da validação de Limpeza é garantir que através do procedimento de limpeza empregado não haverá contaminação cruzada significativa entre um produto e outros produzidos nos mesmos equipamentos.

A contaminação cruzada é um problema de saúde pública, ao qual toda sociedade está exposta, a cada dia, ao comprar um simples analgésico ou qualquer

outro medicamento vendido em qualquer farmácia. Por isso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cobra incisivamente a validação de limpeza e as empresas se interessam em garantir o atendimento integral a esta exigência, a fim de manter sua licença de funcionamento e, principalmente, garantir um medicamento de alta qualidade no mercado (ANVISA, 2010).

Um caso clássico que evidencia o quão danoso pode ser uma contaminação cruzada em casos extremos foi notificada em 1958 nos Estados Unidos da América, onde ocorreu uma intoxicação em massa de crianças entre cinco e dez anos que estavam recebendo tratamento com produto vitamínico para melhorar seu desenvolvimento. Houve aparecimentos de mamas e outras modificações relacionadas a estrógenos. A investigação chegou à conclusão que as cápsulas estavam contaminadas com estrógenos, já que nesta planta fabril eram produzidos produtos hormonais e vitamínicos e a limpeza não foi eficiente (BRANDÃO, 2009).

Outro caso de contaminação cruzada na indústria farmacêutica relatado na literatura científica ocorreu nos anos 60, quando graves e inesperados efeitos colaterais foram observados devido à contaminação de isoniazida (hidrazida do ácido isonicotínico) com dietilestilbestrol (WEBER et al., 1963). O dietilestilbestrol é um estilbeno que possui uma atividade estrogênica dez vezes mais potente que o estrógeno natural, 17 β estradiol (CARDOSO et al., 1999). Existem evidências científicas de que o dietilestilbestrol administrado via oral é absorvido e não destruído prontamente pelo fígado (ROE; 1984). Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos demonstraram o aparecimento de tumores vaginais em filhas de pacientes que utilizaram dietilestilbestrol como antiabortivo (JUKES, 1974), indicando que o dano gerado por este ativo poderia não só alterar o organismo do paciente que o ingere, como também age intrauterinamente no feto levando a desfechos drásticos. De acordo com o 32º Informe do Comitê Mixto do Codex Alimentarius/FAO/WHO (1988) a ingestão de alimentos contaminados pode levar ao aparecimento de distúrbios endócrinos tais como, indução de puberdade precoce em crianças, avanços na idade óssea com repercussões negativas no crescimento, modificações de caracteres sexuais, entre outros.

Nos últimos anos, vários produtos farmacêuticos foram retirados do mercado devido à contaminação cruzada com outros princípios ativos ou substâncias químicas (PROSEK; KRIZMAN; KOVAC, 2005; WISS; SCHMUCK, 2011).

No caso específico de uma rota produtiva hormonal, atualmente a fábrica que a compreende deve separá-la das rotas não hormonais. No entanto, mais de um hormônio podem ser processados nesta rota hormonal e sua contaminação cruzada poderia ser igualmente drástica, já que muitos hormônios em baixas doses podem gerar efeitos no sistema biológico humano. Desta forma, existe a necessidade de atestar a eficiência e eficácia do procedimento de limpeza em rota produtiva hormonal multiuso.

Os acidentes relatados acima chamam atenção para o fato de que o controle da qualidade do produto via de regra é específico para o ativo do mesmo, não sendo necessariamente sensível a possíveis contaminantes. Logo, embora o teor de vitaminas no produto americano causador do problema citado acima fosse adequado segundo análises do controle de qualidade, o contaminante não foi detectado. A validação de limpeza é, portanto, a melhor forma de garantir a segurança em relação à contaminação cruzada do produto, já que o método analítico utilizado para liberação de lote dos diferentes produtos não é necessariamente adequado para a determinação analítica de todos os ativos que passam naquela rota de equipamentos compartilhados.

Com os avanços nesta área de conhecimento torna-se necessário explorar e simplificar a sistematização desta prática, a fim de torná-la mais acessível e clara a toda e qualquer empresa farmacêutica. Esta tarefa trará benefícios significativos para a saúde pública uma vez que contribuirá para a segurança da população ao buscar saúde nos medicamentos brasileiros.

1.1 VIGILANCIA SANITÁRIA E VALIDAÇÃO

1.1.1 Da vigilância sanitária ao conceito de validação de limpeza no Brasil

Afirma-se que a vigilância sanitária teve origem na Europa entre os séculos XVII e XVIII e no Brasil dos séculos XVIII a XIX, quando emergiu a idéia de “polícia sanitária”, onde seu objetivo era de salvaguardar a cidade da propagação de doenças. No Brasil este conceito entrou em vigor na época da “teoria dos miasmas”. Com o tempo essa idéia de “polícia sanitária” foi sendo lapidada por tudo que acontecia naquele tempo, como conceitos bacteriológicos, teorias sistêmicas e de

planejamento e foi maturando até chegar ao ponto de incorporar o conceito de defesa da cidadania (EDUARDO; MIRANDA, 1998).

Com a constituição brasileira ditando a saúde como papel do Estado e direito de todo cidadão brasileiro, o conceito de vigilância sanitária passa a ser “um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde” (BRASIL, 1988).

Com este conceito abrangente a Vigilância Sanitária passa a controlar bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendendo todas as etapas e processos, da produção ao consumo, a prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde. Logo, o seu campo de atuação é bastante ampliado, já que se torna uma prática com poder de interferir em todos os fatores determinantes do processo saúde-doença.

No Brasil, com o objetivo de facilitar a promoção da proteção à saúde da população descrita na Constituição foi criada, em 1999 a ANVISA, responsável pelo controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras (BRASIL, 1999).

Em 2001, considerando a necessidade de atualizar as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos objetivando o acompanhamento do desenvolvimento de novas tecnologias nos últimos anos e sendo necessário padronizar as ações de Vigilância Sanitária, a ANVISA publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 314, onde:

- a) Determinava a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos;
- b) Instituiu e aprovava a Classificação e Critérios de Avaliação dos itens constantes do Roteiro de Inspeção para Empresas Fabricantes de Medicamentos, com base no risco potencial de qualidade e segurança, inerentes aos processos produtivos de medicamentos;
- c) Instituiu como norma de inspeção para fins da verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, para os órgãos de

vigilância sanitária do Sistema Único de Saúde, o Roteiro de Inspeção para Empresas Fabricantes de Medicamentos;

- d) Determinava que as empresas fabricantes de medicamentos devessem proceder auto inspeções.

Cabe destacar que nesta legislação foi estabelecido que atenção especial deva ser dada à validação de procedimentos de limpeza dos equipamentos utilizados na produção de medicamentos, ou seja, esta é a primeira vez que oficialmente a validação de limpeza foi citada dentro de uma legislação (ANVISA, 2001).

Em 2003 foi publicada a RDC nº 210 da ANVISA revogando a RDC nº 314/2001, que possui o mesmo objetivo da RDC anterior, no entanto esclarece algumas questões, se atualiza em relação às novas exigências nacionais e internacionais e é onde se estabelece claramente que a validação de limpeza figura como parte indispensável do “Plano mestre de validação”, onde são inequivocamente estabelecidos objetivos, procedimentos, prazos e responsabilidades relativos a uma determinada produção de medicamento.

O meio farmacêutico, todavia, não possuía real entendimento do significado do termo “validação de limpeza”. Somente em 2006, quando a ANVISA lançou “Guias relacionados à garantia da qualidade”, onde se incluiu um capítulo dedicado exclusivamente à validação de limpeza, foram descritos requisitos mínimos sobre a execução desta validação (ANVISA, 2006).

Atualmente, tem-se em vigor a RDC nº 17/2010, onde a validação de limpeza é claramente definida, onde novamente se reafirma sua extrema importância para assegurar Boas Práticas de Fabricação e se exige justificativa técnica para cada uma das etapas que compõem a validação em sua totalidade.

De acordo com a RDC nº 17/2010, a validação de limpeza é definida como “Evidência documentada que demonstre que os procedimentos de limpeza removem resíduos a níveis pré-determinados de aceitação, levando em consideração fatores tais como tamanho do lote, dosagem, dados toxicológicos, solubilidade e área de contato do equipamento com o produto.”.

1.1.2 Validação

A validação é a evidência documentada de que o processo, operado dentro de parâmetros estabelecidos, pode executar de forma eficaz e reprodutível a produção de intermediários ou ingredientes farmacêuticos ativos atendendo suas especificações pré-determinadas e atributos da qualidade.

Baseado nisto a validação figura como parte das Boas Práticas de fabricação garantindo a qualidade, a homogeneidade e repetibilidade de um produto ou processo. Afirmar que algo está validado significa dizer que ao realizar um processo da forma descrita sempre teremos produtos e resultados de processo dentro de um critério pré-estabelecido, ou seja, atendendo as especificações regulatórias atestando a qualidade e a demanda dos clientes oferecendo um produto de qualidade assegurada.

Conforme a RDC 17/2010 a validação deve ser realizada para instalações, utilidades (água, ar, ar comprimido, vapor,...), sistemas, processos e procedimento em intervalos periódicos e que quando uma mudança de grande relevância for realizada esta deve ser novamente realizada.

Um processo ou procedimento validado é a garantia que sempre se obterá um resultado dentro do previsto. Quando ocorre um desvio neste resultado este deve ser prontamente estudado, resolvido e revalidado a fim de atestar que aquele desvio não se repetirá.

Cabe ainda destacar a natureza documental e científica da validação. Tudo o que for realizado durante a validação deve ser documentado na forma de protocolo (documento que antecede a validação propriamente dita) e o relatório (onde se tem os resultados, as análises deste e o status de validado ou não). Além disto, todos os testes e análises devem ser pautados no método científico, aplicando-se conhecimentos multidisciplinares que comprovem a repetibilidade de processos, procedimentos e igualmente seus resultados.

1.1.3 Validação de limpeza

O principal objetivo da *Validação de Limpeza* é garantir que através do procedimento de limpeza empregado não haverá contaminação cruzada significativa entre um produto e outro da mesma rota, isto é, a contaminação de determinada matéria-prima ou produto intermediário por outras substâncias durante o processo de produção. Desta forma garante-se que, após a limpeza dos equipamentos, o próximo produto a ser fabricado não contenha substância do produto anterior (PERES, 2001; SAJID; ARAYNE; SULTANA, 2010).

No guia sobre validação de limpeza da ANVISA (2006) merece destaque o seguinte trecho “É importante estabelecer que não existe um único caminho para executar um processo de validação de limpeza e que o ponto comum a ser buscado é a existência de critérios, parâmetros e metodologias que sejam cientificamente justificáveis e que demonstrem claramente que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações pré-estabelecidas”.

Com esta afirmação a ANVISA chama atenção para a utilização do método científico nas rotinas de validação de limpeza, já que devem ser estabelecidos através da combinação de conhecimentos, critérios, parâmetros e metodologias que garantam uma validação de limpeza confiável para seu propósito final, isto é, assegurar que os medicamentos que cheguem à população não tenham sofrido contaminação cruzada.

Muitas metodologias de validação de limpeza de equipamentos têm sido testadas (MAZONAKIS et al, 2002; WESTMAN; KARISSON, 2000), porém cada indústria tem desenvolvido seus próprios critérios e metodologias (AGALLOCO, 1992).

Segundo Akl, Ahmed e Ramadan (2011) a validação de limpeza consiste em duas atividades separadas: a primeira é validar a metodologia analítica para quantificar os resíduos da superfície do equipamento e o segundo é validar o procedimento de limpeza quanto a sua efetividade.

É notório que as técnicas analíticas têm evoluindo em uma velocidade excepcionalmente elevada e que os resíduos de ativos ou detergentes podem ser detectados em quantidades extremamente reduzidas (LA ROCA et al, 2007). No entanto, não detectar um resíduo provável em uma superfície não é suficiente para

afirmar a sua inexistência naquela superfície após uma rotina de limpeza, mas sim que não há resíduo presente em concentração superior àquela que o método é capaz de quantificar. Portanto, os métodos analíticos que serão utilizados nestas rotinas devem possuir limite de quantificação abaixo do limite residual aceitável a fim de que se obtenham resultados confiáveis (ALVES et al, 2010). A validação do método analítico é, portanto, um requisito fundamental para a execução da validação de limpeza (GOMES; SOUZA, 2010). Desta forma, os métodos utilizados para analisar as amostras oriundas da limpeza dos equipamentos de produção dos medicamentos devem ser validados pela determinação de parâmetros de desempenho aplicáveis como linearidade, seletividade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação. Tais processos são estruturados em conformidade com regulamentos, como o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (ANVISA, 2003).

Na maioria das empresas farmacêuticas os equipamentos são multiuso, ou seja, em um mesmo equipamento são fabricados diferentes produtos, com diferentes princípios ativos, em diferentes concentrações, diferentes tamanhos de lote etc. O ideal seria validar a limpeza seguindo procedimento pré-estabelecido após a fabricação de cada produto. No entanto, quanto maior o “portfólio” de produtos, maior o número de possibilidades de sequências de fabricação. Portanto, uma quantidade enorme de testes e a avaliação de impactos do ativo de um produto sobre o próximo produto a ser fabricado naquele equipamento, deveriam ser realizados (ALENCAR et al, 2004). Visando contornar essa dificuldade, foi desenvolvido e passou-se a utilizar o procedimento denominado Seleção do Pior Caso, isto é, escolhe-se um produto que, com relação a parâmetros como solubilidade, toxicidade, dificuldade de limpeza, etc, mostre-se o mais difícil de ser removido do equipamento; admite-se, então, que a eficácia do processo de limpeza para os demais resíduos será sempre superior àquela demonstrada para o resíduo Pior Caso (ALENCAR et al, 2006a). São descritas estratégias como o cálculo de um índice empírico onde se considera simultaneamente solubilidade, toxicidade, dificuldade e ocupação da unidade de produção para determinação deste pior caso (ALENCAR; CLEMENTINO; ROLIM NETO, 2006).

Dentre as dez atividades que estão em ampliação em 90% da Rede Brasileira de Produção Pública de Medicamentos figura a validação de limpeza, já que esta

garante a qualidade e segurança do produto (MAGALHÃES; ANTUNES; BOECHAT, 2011).

Apesar de sua enorme importância, muito pouco tem sido publicado na literatura aberta sobre os métodos adotados nas indústrias para validação de processos de limpeza na indústria farmacêutica, o que remonta o caráter inovador de estudos nesta área (ALENCAR et al, 2004; ALENCAR et al, 2006b).

1.2 SUBSTÂNCIAS ATIVAS DA ROTA HORMONAL

Como alvo desta validação de limpeza tem-se procedimentos que visam eliminar resíduos de substâncias ativas hormonais, que em caso de contaminação cruzada podem ser considerados desreguladores endócrinos.

Os desreguladores endócrinos são suspeitos de provocar desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, alteração de glândulas tireóides, distúrbios nas funções do ovário (crescimento folicular e a ovulação), na fertilização e gravidez. Em animais podem desregular a reprodução e o desenvolvimento dos organismos, assim como, induzirem, irreversivelmente, características sexuais femininas em peixes machos, podendo levar a esterilização ou redução da reprodução (COLEMAN et al, 2005; SOUSA et al, 2011).

Várias são as substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. Dentre elas, substâncias naturais (fitoestrogênios), substâncias químicas sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, bifenilaspolicloradas e bisfenol A), estrogênios naturais (17β -estradiol, estrona e estriol) e estrogênios sintéticos (17α -etinilestradiol) (WARING; HARRIS, 2005).

É considerado um desregulador endócrino toda substância ou mistura de substâncias exógenas capaz de assumir função idêntica de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e causando efeitos adversos nos organismos ou em seus descendentes (WARING&HARRIS, 2005; SOUSA et al., 2011).

A estrogenicidade é a capacidade de uma substância acoplar-se ao receptor de estrogênio e levar uma resposta estrogênica, ou seja, similar aquela produzida pelo hormônio endógeno.

Os estrogênios, tanto os naturais quanto os sintéticos, possuem efeitos em níveis de ng/L, enquanto que a maioria dos compostos químicos apresenta atividade estrogênica em níveis de µg/L e o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteroides, da ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão. Os estrogênios têm sido considerados os maiores contribuidores, dentre os desreguladores endócrinos, em provocar alterações endócrinas em organismos presentes em águas superficiais (GOMES et al., 2004; LAI et al., 2002).

Estrogênios naturais e sintéticos exibem atividade estrogênica na faixa de cem a um milhão de vezes maior que a apresentada por compostos químicos (ROUTLEDGE, SUMPTER, 1996; TANAKA et al., 2001), razão pela qual esses estrogênios causam anomalias em organismos aquáticos em baixíssimas concentrações. (ppt) (NOGUEIRA, 2003).

No ambiente observa-se que estes desreguladores endócrinos podem diminuir a taxa de reprodução de peixes, aumentar a mortalidade precoce e a nidificação com o mesmo sexo em algumas espécies de aves, gerar pseudohermafroditismo e “imposex” em espécies marinhas, ocasionar mal formações ao nível genital de répteis e acarretar o declínio e extinção de espécies marinhas costeiras (NOGUEIRA, 2003). Baseado nisso pode-se exemplificar que uma contaminação desta natureza é capaz de alterar significativamente boa parte dos organismos vivos.

Abaixo se tem os ativos que são utilizados na rota que foi validada.

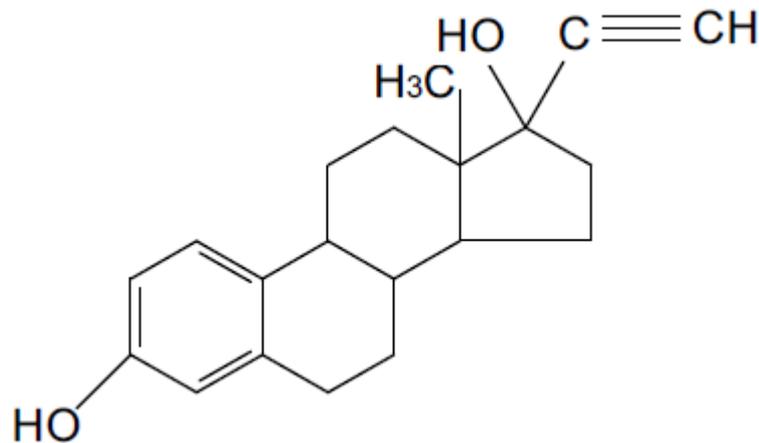
i. Etinilestradiol

O 17 α -etinilestradiol é o principal estrogênio sintético, encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado nas terapias de reposição hormonal. A ligação ao receptor da tiroide pode desregular o sistema neuroendócrino. Recentemente, foi mostrado que esses compostos podem alterar a síntese e o metabolismo de estrogênios (WARING & HARRIS, 2005).

Todos os hormônios esteroides exercem sua ação pela passagem através da membrana plasmática e ligando-se a receptores intracelulares (YING et al., 2002).

Os hormônios esteroides são um grupo de compostos biologicamente ativos que são sintetizados a partir do colesterol e têm em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal. Os estrogênios são caracterizados por seu anel fenólico, o qual tem um grupamento hidroxila responsável pela atividade biológica, ou seja, pela atividade estrogênica (FENG et al., 2005).

Figura 1: Estrutura molecular do Etinilestradiol



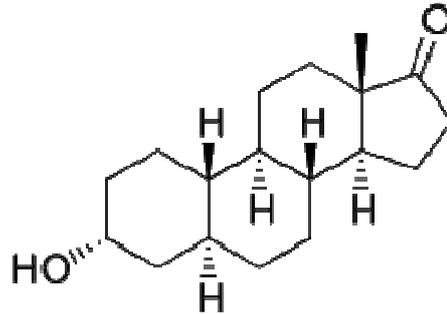
Fonte: FLÓREZ, 1999

ii. Gestodeno

O gestodeno é uma das mais novas moléculas progestogênicas sintéticas usadas na contracepção; leva a um menor número de efeitos adversos sobre os lipídeos do que os estrogênicos, no entanto eleva o risco de doença tromboembólica (RANG et al., 2007).

Os progestágenos agem em receptores nucleares, receptores estes que tem sua densidade modulada positivamente por hormônios estrogênicos. Já os receptores estrogênicos sofrem modulação negativa em interação com progestágenos (RANG et al., 2007).

Figura 2: Estrutura Molecular do Gestodeno

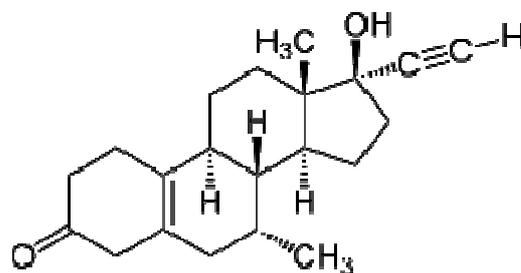


Fonte: FLÓREZ, 1999

iii. Tibolona

A tibolona é um fármaco usado para reposição hormonal feminina após a menopausa e na prevenção da osteoporose; embora cause a diminuição do HDL, não aumenta os riscos da mulher sofrer problemas nos vasos cardíacos (GALLAGHER et al., 2001). Também se verificou que a tibolona pode prevenir câncer em mulheres pós-menopausa (HANIFI-MOGHADDAM et al., 2005). Depois da administração oral ela é rapidamente convertida em três metabólitos, sendo dois estrogênicos e o terceiro progestênico (HAMMAR et al., 2007).

Figura 3: Estrutura molecular da Tibolona



Fonte: FLÓREZ, 1999

2 RELEVÂNCIA

No Guia de assuntos relacionados a garantia da qualidade (ANVISA, 2006) atenta-se que a validação de limpeza não tem um único caminho para ser executada, no entanto o ponto comum a ser buscado é a existência de critérios, parâmetros e metodologias que sejam cientificamente justificáveis e que demonstrem claramente que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações pré-estabelecidas.

Este trabalho visa exatamente estabelecer um modelo cientificamente justificável para gerenciar as práticas de validação de limpeza.

Embora estejam descritas na literatura as etapas que compõem a validação de limpeza, para a sua correta execução é imprescindível desenvolver, um modelo lógico-sistemático para gerir esta prática no que concerne a plantas de sólidos hormonais. Aquelas plantas podem ser consideradas de alto risco, uma vez que uma contaminação cruzada de origem hormonal pode alterar significativamente o organismo do paciente.

3 OBJETIVOS

a. OBJETIVOS GERAIS

- Sistematizar as etapas que constituem a validação de limpeza para uma planta de sólidos hormonais de forma a deixar claro suas relações de interdependência temporal
- Desenvolver a validação de limpeza utilizando a sistematização proposta a fim de testar sua efetividade para a planta de sólidos hormonais estudada.

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar uma lista de checagem de itens que devem ser descritos em um procedimento de limpeza para avaliação destes
- Realizar uma análise crítica das estratégias descritas na literatura para determinação de pior caso
- Elucidar o cálculo utilizado para determinação de resíduo aceitável
- Validar uma metodologia analítica para detecção de resíduos de ativos
- Estabelecer os parâmetros adequados para o ensaio de recuperação de ativo
- Proceder ao acompanhamento do procedimento de limpeza, inspeção visual, amostragem e análise das amostras após limpeza
- Analisar o impacto da inclusão de um novo produto ou da inclusão/substituição de um equipamento na rota de produção

4 MATERIAIS E MÉTODOS

a. SISTEMATIZAÇÃO DAS ESTAPAS DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

As etapas descritas na literatura e preconizadas nos guias relacionados à garantia da qualidade (ANVISA, 2006) foram dispostas e inter-relacionadas via fluxograma levando em consideração as ações de forma temporal. Esta sistematização teoricamente proposta foi testada com o desenvolvimento da validação de limpeza em planta de sólidos hormonais.

b. DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

Foi validada a limpeza de uma planta de sólidos hormonais de uma empresa estabelecida no estado do Rio de Janeiro, contendo uma rota com sete equipamentos, por onde os constituintes da formulação passam de forma cronológica respeitando a sequencia disponível na Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma da sequencia cronológica de equipamentos da rota produtiva dos medicamentos



i. Lista de Checagem para Avaliação do Procedimento de Limpeza

A lista de checagem foi elaborada na forma de quadro pontuando os requisitos, buscando ser o mais indutiva possível a fim de facilitar o preenchimento. Esta foi baseada em itens recomendados pelo guia relacionado à garantia da qualidade (ANVISA, 2006) específico da validação de Limpeza, tais como, entre outros: procedimentos de limpeza escritos, aprovados e com seus respectivos registros de treinamento anexados, pontos críticos do equipamento, a maneira como cada ponto deste deve ser limpo, solventes e detergentes utilizados, métodos empregados na limpeza, ou seja, quantas vezes uma determinada área deve ser esfregada.

ii. Análise Crítica das Estratégias para Determinação de Pior Caso

Foi realizado um levantamento das estratégias de Determinação de Pior Caso descritas na literatura, evidenciando os pontos negativos e positivos de cada e optando por uma destas ou criando uma nova estratégia associando o maior número de pontos positivos possíveis/menor número de pontos negativos.

iii. Elucidação do Cálculo Utilizado para a Determinação de Resíduo Aceitável e Cálculo

O cálculo utilizado para determinação do limite de resíduo aceitável foi realizado conforme guia relacionado à garantia da qualidade específico para validação de Limpeza (ANVISA, 2006), onde se utilizou o mais conservador entre o limite “0,1% da dose limite” e “10 ppm”, ou seja, o menor valor encontrado. As

etapas da fórmula foram logicamente justificadas correlacionando com o objetivo de projetar o efeito sobre a contaminação cruzada no produto final.

Para realizar este cálculo foram utilizadas a área total da rota de equipamentos em cm^2 (calculada usando o programa Geometry), o menor lote que pode passar pela rota (independente de a qual produto ele pertença), o maior peso médio de comprimido que pode passar pela rota (novamente independente de a qual produto ele pertença), a mínima dose diária do contaminante (termo que se refere ao ativo que foi determinado anteriormente como pior caso), área amostrada em cm^2 e o volume que foi utilizado para ressuspender à amostra.

iv. Validação da Metodologia Analítica para Detecção de Resíduo Ativo

A metodologia analítica foi validada conforme Resolução Específica (RE) nº 899/2003 (ANVISA, 2003), sendo realizados os testes de linearidade, precisão, seletividade, especificidade, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (LQ). Estabeleceu-se que se o limite de quantificação fosse menor do que o resíduo aceitável o método poderia ser utilizado para quantificação de amostras; em caso negativo seria desenvolvido novo método que atendesse esta necessidade. Foi utilizada Cromatografia em Fase Líquida de Alta Resolução (HPLC) a fim de estabelecer resultados com alta precisão no menor tempo possível. Um cromatógrafo de fabricação Agilent foi utilizado com os componentes descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Componentes do HPLC Agilent

Componente	Modelo
Degasser	G1322A
Bomba	G1311A
Interface	G1329A
Detector	G1314B
Forno	G1316A
Software	EZ Chrom Elite

O método analítico foi avaliado para as seguintes condições cromatográficas:

- Fluxo: 1,0 ml/min
- Comprimento de onda: 205 nm
- Temperatura: 25°C
- Volume de injeção: 20 microlitros
- Fase móvel: 60% Acetonitrila para HPLC: 40% Água purificada
- Coluna: Lichrospher RP-8, 125 X 4,6 mm, 100-5 mm

Os reagentes utilizados estão apresentados na Tabela 2, os demais materiais e equipamentos na Tabela 3 e os padrões na Tabela 4.

Tabela 2 – Reagentes utilizados nos testes

Nome do Reagente	Lote	Fabricante
Água Ultra Pura (Milli-Q)	-----	-----
Acetonitrila grau HPLC	B02C52	J.T.Baker
Detergente All Clean	JS392	Johnson Diversey
Alcool Etilico PA	RT001937	J.T.Baker

Tabela 3 – Materiais e equipamentos utilizados nos testes

Descrição	Fabricante
Balança Analítica Adventurer Ohaus AR2140	OhausCorp. USA
Ultra-som	Unique
Milli Q Academic	Millipore
Balão volumétrico de 100,0 ml	Classe A
Balão volumétrico de 50,0mL	Classe A
Pipeta volumétrica de 5,0mL	Classe A
Pipeta volumétrica de 2,0mL	Classe A

Tabela 4 - Padrões utilizados nos testes

Descrição	Procedência	Lote
Etinilestradiol	USP	Q0C162
Gestodeno	EP	1
Tibolona	BP	3053

1. Ensaio de Especificidade/Seletividade

Este ensaio avalia a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes sem que haja interferência. Para

este teste foram preparadas nove amostras doseadas pelo método a ser avaliado: Amostra 100% Etinilestradiol, Amostra 100% Gestodeno, Amostra 100% Etinilestradiol e Gestodeno, Diluente puro, Diluente com presença de swab (possível interferente se escolhido em item posterior como forma de amostragem), Amostra 100% combinada com presença de swab (possível interferente se escolhido em item posterior como forma de amostragem), Placebo com todos excipientes possíveis, Amostra 100% Tibolona, Amostra 100% Detergente (MILENOVIĆ; TODOROVIĆ, 2009). As amostras de Etinilestradiol e Gestodeno devem apresentar resultado de $100 \pm 1\%$ para o método e as demais amostras devem apresentar resultado de 0 a 1% para aceitação do método.

2. Ensaio de Linearidade (Curva de calibração)

Este ensaio avalia a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. Para esta avaliação foram preparadas três soluções de cinco concentrações conhecidas e crescentes, nomeadas de 80, 90, 100, 110 e 120% (1,60; 1,80; 2,00; 2,20 e 2,40 $\mu\text{g/mL}$ para etinilestradiol e 6,02; 6,77; 7,52; 8,27 e 9,02 $\mu\text{g/mL}$ para gestodeno), além destas foram injetadas 3 soluções placebos que é referente ao 0% (MILENOVIĆ; TODOROVIĆ, 2009; DHOKA et al., 2010). Para que o método seja aceito o R^2 das duas retas (de etinilestradiol e de gestodeno) devem ser maior ou igual a 0,990.

3. Ensaio de Precisão inter e intra corrida / Exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Determina-se a repetibilidade do método, com o mesmo analista e mesma instrumentação (precisão

intracorrída) e também a precisão intercorrída através de análises em dias diferentes com analistas diferentes.

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Para avaliar ambas as características simultaneamente foram preparadas por dois analistas diferentes em dois dias diferentes 3 soluções de 3 concentrações diferentes e crescentes, sendo estas 80, 100 e 120% (concentrações conforme item 4.2.4.2) (MILENOVIĆ; TODORVIĆ, 2009; DHOKA et al., 2010). Para aprovação no ensaio de precisão os resultados dos analistas devem ser lineares e a avaliação dos desvios padrões intra e intercorrídas devem ser menores ou iguais a 1,00. Para aprovação no ensaio de exatidão todos os resultados de recuperação (Recuperado = Valor encontrado / Valor teórico X 100) devem ser iguais a $100,00 \pm 2,00\%$.

4. Ensaio de Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Foram variados o fluxo, proporção acetonitrila: água, temperatura e coluna na análise de duas amostras. Os resultados obtidos foram confrontados com os resultados observados nas condições propostas pelo método (MILENOVIĆ; TODORVIĆ, 2009). Para aprovação no ensaio de robustez os desvios padrões devem ser menor ou igual a 1,00 e doseamento de $100,00 \pm 1,00\%$.

5. Ensaio para Limite de Quantificação e Detecção

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) representam respectivamente a menor concentração do analito que pode ser detectada e a menor concentração do analito que pode ser medida.

A determinação matemática de LD e LQ foi realizada conforme indicado na Figura 5 onde s é o desvio padrão da resposta do branco de 10 amostras e S é a inclinação da curva de calibração (DHOKA et al., 2010).

Figura 5 – Fórmula para cálculo de Limite de Detecção e limite de Quantificação.

$$\begin{aligned}LD &= 3,3 \times (s/S) \\LQ &= 10 \times (s/S)\end{aligned}$$

Fonte: DHOKA et al., 2010

Também foi realizada a determinação experimental, onde 3 soluções de cada concentração decrescente foram preparadas e injetadas conforme metodologia a ser avaliada. O limite de quantificação foi a concentração onde a recuperação for $100,00 \pm 2,00\%$ e o desvio padrão menor ou igual a 1,00.

O limite de detecção foi a concentração onde o último sinal é detectado no tempo de retenção onde o pico é visualizado em concentrações maiores.

- v. Estabelecimento de parâmetros adequados para ensaio de recuperação de ativo

1. Determinação do procedimento de amostragem

Foi estabelecido o procedimento de amostragem mais adequado levando-se em consideração as vantagens e desvantagens de cada procedimento, como ilustrado no Quadro 1.

Quadro 1 - Vantagens e Desvantagens entre a amostragem por esfregaço e água de rinsagem

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
AMOSTRAGEM DIRETA DA SUPERFÍCIE (SWABING)	<p>Resíduos secos e insolúveis podem ser retirados.</p> <p>Permite o estabelecimento do nível de contaminação por área, estabelecendo onde o procedimento precisa ser melhorado e se realmente os pontos críticos correspondem às expectativas.</p> <p>Permite a recuperação do contaminante a partir de áreas onde a água de rinsagem teve contato deficiente.</p>	<p>A área a ser amostrada deve permitir livre acesso ao operador, o que é impraticável em muitos equipamentos.</p> <p>O solvente e o material do Swab não deve ser fonte de contaminação adicional ou interferir na metodologia analítica.</p> <p>A porcentagem de recuperação do ativo por parte do Swab deve ser estabelecida utilizando um estudo de recuperação que mimetiza exatamente o procedimento utilizado na prática. (mesmo Swab, placa com o mesmo tipo de aço do equipamento, definição da área).</p> <p>Possível interferência do material de construção do Swab deve ser avaliada durante o estudo de validação da metodologia analítica.</p>
AMOSTRAGEM INDIRETA DA SUPERFÍCIE (AMOSTRAS DE RINSAGEM)	<p>Permite a amostragem de grandes áreas.</p> <p>Permite a amostragem de áreas de difícil acesso como bicos de envase, tubulações e pequenas peças.</p>	<p>Causa a diluição do contaminante, o que às vezes compromete ou impossibilita o desempenho da metodologia analítica.</p> <p>O contaminante pode não ser solúvel no solvente utilizado.</p> <p>O contaminante pode estar ocluído ou aderido em alguma superfície, de modo que a simples rinsagem não é capaz de retirá-lo.</p> <p>A metodologia analítica utilizada deve ser específica para o contaminante, métodos não específicos como a adoção do critério farmacopéico para a água utilizada na rinsagem não são aceitáveis.</p> <p>Em alguns casos, como por exemplo, com bicos de envase, as primeiras porções extraídas sempre serão as mais contaminadas. Portanto a uniformização com todo o conteúdo deve ser feita.</p>

Fonte: ANVISA, 2006

2. Recuperação de ativo

Foram determinados os níveis de recuperação do ativo em superfície de Aço-inox 316L (que é o material de fabricação da maior parte dos equipamentos) e em superfície emborrachada (que é o material de fabricação de conectores e vedantes), isto é, a porcentagem de resíduo que pode ser recuperado no meio em que está aderido, bem como a *consistência*, isto é, a dispersão entre os resultados encontrados.

Apesar de alguns autores considerarem como critério de utilização do método que a eficiência de remoção do analito pelo “swab” de diferentes superfícies deve ser apenas maior que 50% para garantir que o analito pode ser extraído do material (JAIN; HEISER; VENTER, 2011; MILENOVIĆ; TODORVIĆ, 2009), segundo a ANVISA (2006) a recuperação de ativo deve ser maior ou igual a 75% e o desvio padrão menor ou igual a 1,00.

- vi. Acompanhamento do processo de limpeza, inspeção visual, amostragem e análise das amostras após limpeza

Para o processo de limpeza alcançar o status de validado, os testes abaixo foram realizados em limpezas realizadas após a passagem do produto Pior Caso, utilizando-se o critério de no mínimo três limpezas após lotes produzidos aprovadas em todos os testes.

1. Determinação dos pontos de amostragem

Os pontos de amostragem devem ser identificados de forma clara e inequívoca incluindo a justificativa técnica de sua escolha. Com esta finalidade foi construído um álbum de cada equipamento onde consta a referencia do

procedimento de limpeza e do registro do equipamento, a foto do equipamento a distancia e a foto de cada um dos pontos de amostragem numerados de ordem crescente. A escolha destes pontos foi determinada pela escolha de pontos representativos da superfície, pontos onde exista diferença de material de construção (borracha, por exemplo), ranhuras, fissuras, quinas e qualquer outro ponto onde a limpeza seja considerada difícil pelo operador (todos os pontos críticos descritos no procedimento de limpeza devem ser amostrados).

2. Acompanhamento do processo

Nesta etapa o experimento foi realizado na rota de fabricação, quando foi avaliado se a limpeza era executada em conformidade com o procedimento aprovado. Quando foi encontrado algum desvio o operador foi re-treinado ou o procedimento atualizado. Não se constatando desvio no processo de limpeza, iniciou-se a inspeção visual.

3. Inspeção Visual

A inspeção visual do equipamento é o primeiro critério na validação de limpeza. O equipamento é considerado “Visualmente Limpo”, quando não for encontrado a olho nu qualquer vestígio de resíduo (ANVISA, 2006). Caso ocorra desvio neste critério o procedimento de limpeza deve ser atualizado citando este ponto como crítico na limpeza do equipamento, passando a dar atenção especial à sua limpeza. Quando a inspeção visual foi considerada satisfatória, iniciou-se a Amostragem e Análise de amostras.

4. Amostragem e Análise das Amostras

A amostragem foi realizada conforme descrito no item 4.2.5.2, nos pontos determinados no item 4.2.6.1. Os resultados obtidos após a injeção em HPLC foram corrigidos pelo nível de recuperação encontrado no mesmo item 4.2.5.2 e então confrontados com o limite determinado no item 4.2.3. Quando os resultados foram inferiores a aquele limite esta limpeza foi considerada aprovada. Quando reprovada foram realizadas alterações no procedimento de limpeza ou elaborada estratégia alternativa.

- vii. Análise de impacto da inclusão de novo produto na rota de produção ou inclusão/substituição de equipamento diferente na rota

Quando uma rota de equipamentos encontra-se com os procedimentos de limpeza validados, isto é, para os produtos inicialmente avaliados para eleição do pior caso, para o tamanho de lote mínimo estabelecido e para o peso médio máximo fixado, a limpeza atinge resultados que não colocam em risco o produto subsequente.

Logo, o acréscimo de um novo produto naquela rota deve ser minuciosamente avaliado para permanência ou não do status de validado. Neste trabalho esta análise foi feita avaliando a solubilidade e a toxicidade do ativo do novo produto, tamanho do lote e peso médio do comprimido.

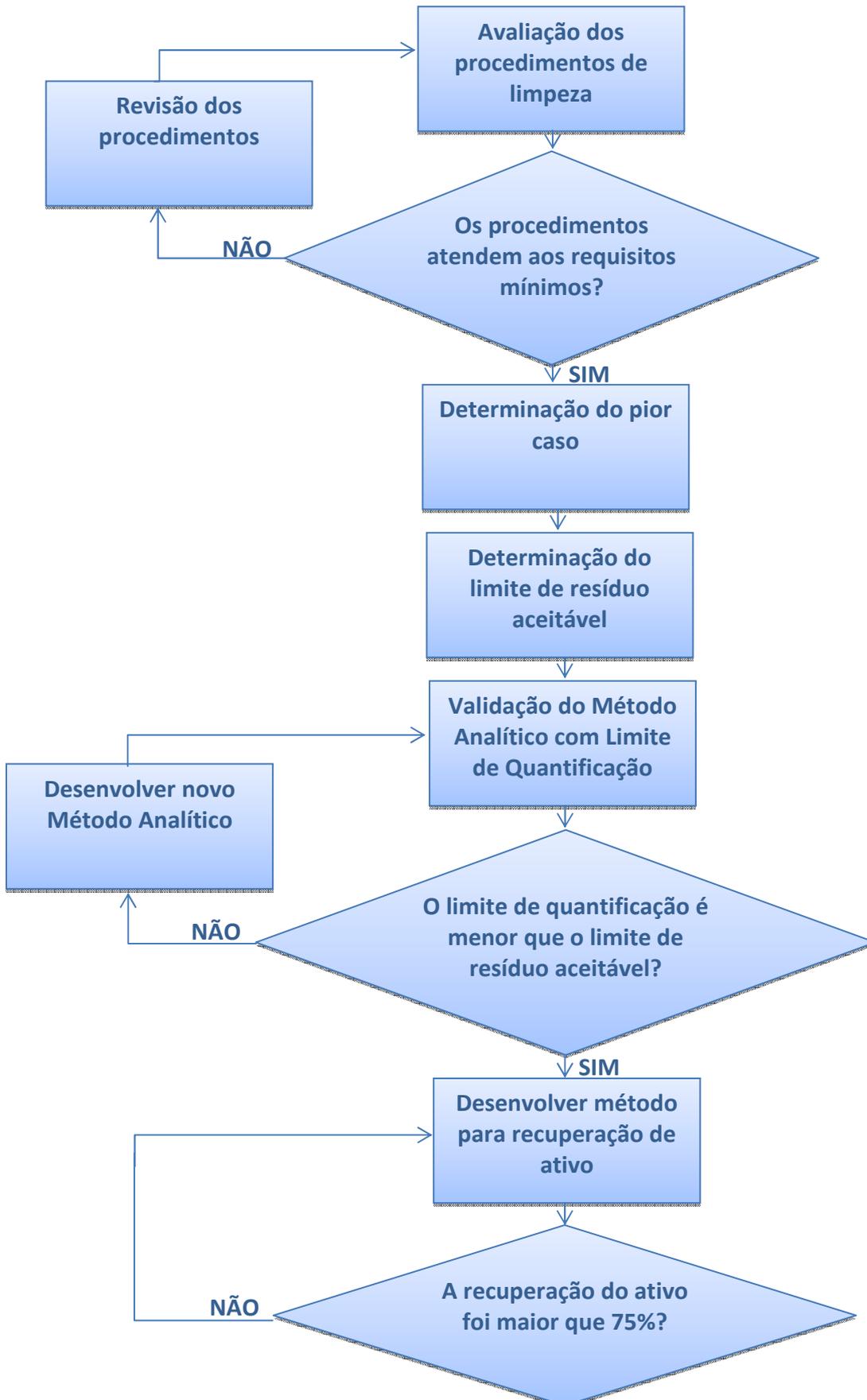
A inclusão ou substituição de um equipamento na rota também impacta diretamente na permanência ou não deste status. Neste caso a análise foi realizada avaliando-se a área do equipamento e seus pontos críticos de limpeza.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

a. SISTEMATIZAÇÃO DAS ETAPAS DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

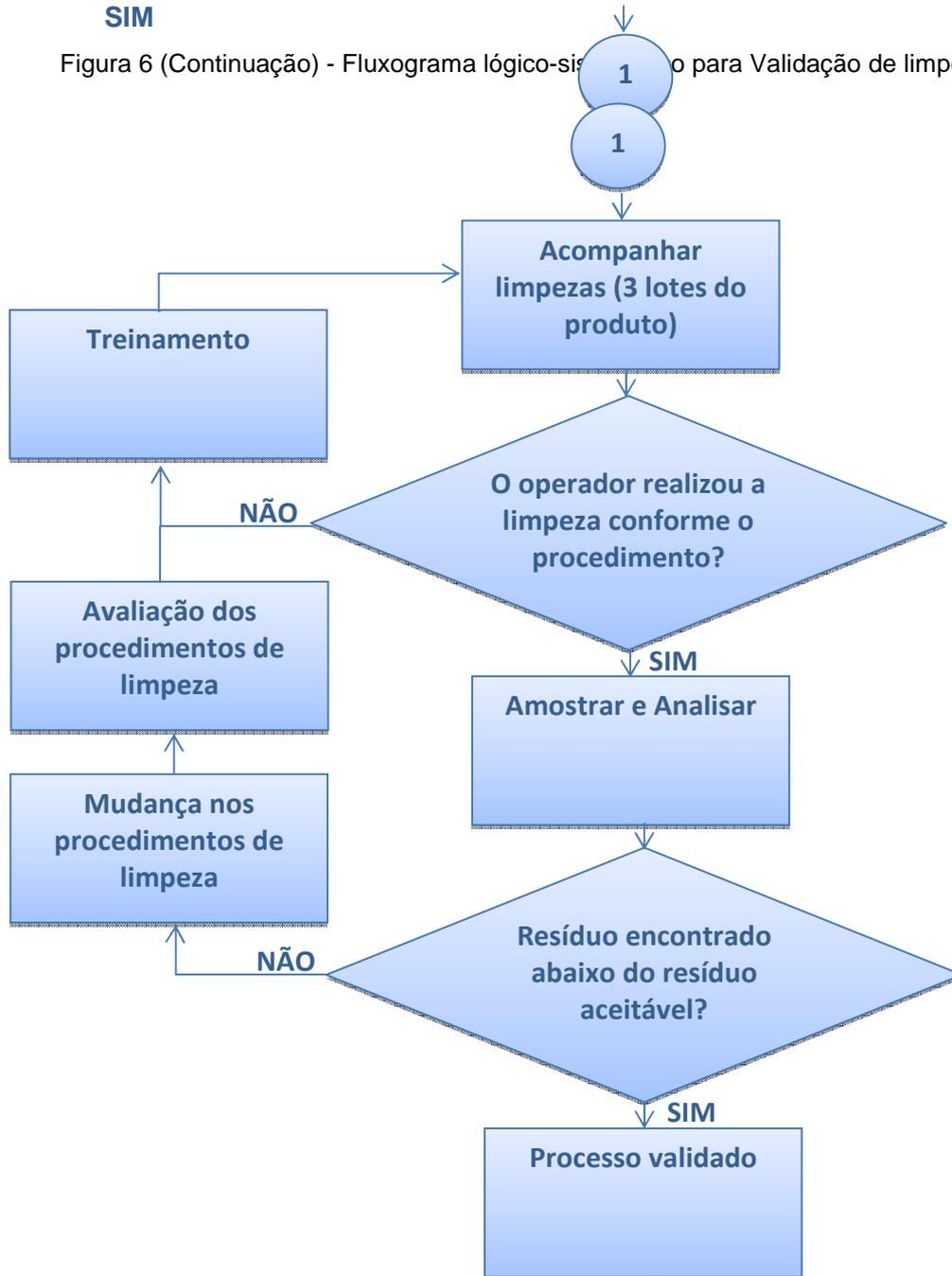
Chegou-se a seguinte proposição de fluxograma padrão apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma lógico-sistemático para validação de limpeza



SIM

Figura 6 (Continuação) - Fluxograma lógico-sistêmico para Validação de limpeza



b. DESENVOLVIMENTO DA VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

i. Lista de Checagem para Avaliação do Procedimento de Limpeza

Para avaliação dos procedimentos de limpeza foi elaborada a lista de checagem da Figura 7.

Figura 7 - Lista de checagem para avaliação do procedimento de limpeza

LISTA DE CHECAGEM – AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTO DE LIMPEZA	EQUIPAMENTO:
	DATA:

Pergunta	Sim	Não	Obs:
Existe procedimento de limpeza escrito e aprovado?			
Há registro de treinamento no procedimento de limpeza para todos possíveis operadores?			
O procedimento detalha a forma de limpeza de pontos de difícil limpeza (crítico)?			
O tempo de esfregação/enxágüe é definido?			
A quantidade de vezes que a esfregação/enxágüe é realizada é definida?			
É claro qual o solvente e o detergente (com sua concentração) que devem ser usados?			
É determinado o sentido da esfregação?			
Há metodologia detalhada e documentada para preparo do detergente e outras soluções utilizadas?			
O procedimento define quantos dias o equipamento pode ficar sujo?			
O procedimento define por quantos dias o equipamento pode ficar limpo sem ser usado?			
O procedimento deixa o equipamento seco ao seu término (sem resíduo de água)?			
Caso o equipamento possua filtros, este é dedicado?			

Caso a resposta a todos os itens sejam “Sim” o procedimento está adequado para dar prosseguimento ao processo, caso algum item tenha resposta “Não” este

deve ser reavaliado e ajustado para que em futura avaliação obtenha respostas positivas em todos os itens.

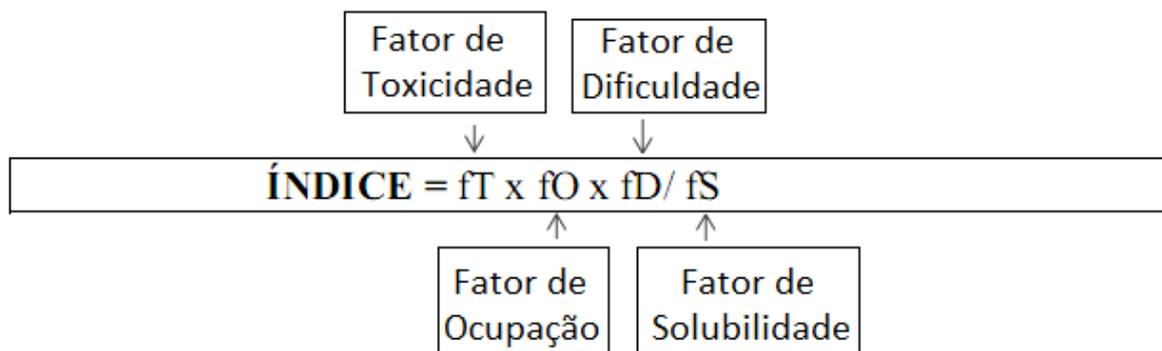
No caso dos procedimentos de limpeza dos sete equipamentos (figura 4) todos obtiveram respostas positivas no formulário e puderam seguir adiante na validação de limpeza.

ii. Análise Crítica das Estratégias para Determinação de Pior Caso

Grande parte dos artigos disponíveis na literatura utiliza metodologia proposta por Alencar, Clementino e Rolim Neto (2006) onde é calculado um índice baseado em fatores empíricos que remetem a toxicidade, dificuldade de limpeza, ocupação dos equipamentos e solubilidade. O ativo que alcançar o maior índice será considerado o pior caso.

A Figura 8 mostra como este índice é calculado; o quadro 2 mostra os valores empíricos que geram o fator de toxicidade; o quadro 3 mostra os valores empíricos que geram o fator de solubilidade em água; o quadro 4 mostra os valores empíricos que geram o fator de dificuldade e o quadro 5 mostra os valores empíricos que geram o fator de ocupação.

Figura 8 - Cálculo do Índice para escolha do pior caso



Fonte: ALENCAR; CLEMENTINO; ROLIM NETO, 2006

Quadro 2 – Fator toxicidade (fT) em função da DL₅₀

DL₅₀ (oral-ratos) – mg/kg	Classificação	Pontos - fT
DL ₅₀ < 200	Alta toxicidade	3
200 < DL ₅₀ < 2000	Moderada toxicidade	2
DL ₅₀ > 2000	Baixa toxicidade	1

Fonte: ALENCAR; CLEMENTINO; ROLIM NETO, 2006

Quadro 3 – Fator solubilidade em água (fS) em PPM

Termo Descritivo	Solubilidade (S) em água (em ppm)	Classificação	Pontos - fS
Muito solúvel	S > 1.000.000	Alta Solubilidade	3
Facilmente solúvel	100.000 < S < 1.000.000		
Solúvel	33.000 < S < 100.000		
Ligeiramente solúvel	10.000 < S < 33.000	Moderada solubilidade	2
Pouco solúvel	1.000 < S < 10.000		
Muito pouco solúvel	100 < S < 1.000	Baixa Solubilidade	1
Praticamente insolúvel ou insolúvel	S < 100		

Fonte: ALENCAR; CLEMENTINO; ROLIM NETO, 2006

Quadro 4 – Fator dificuldade (fD)

Dificuldade de limpar	Pontos – fD
Muito difícil de limpar	4
Difícil de limpar	3
Dificuldade média de limpar	2
Fácil de limpar	1

Fonte: ALENCAR; CLEMENTINO; ROLIM NETO, 2006

Quadro 5 – Fator Ocupação (fO)

Quantidade (lotes/ano)	Pontos - fO
Acima de 200 lotes	5
Entre 151 e 200 lotes	4
Entre 101 e 150 lotes	3
Entre 51 e 100 lotes	2
Até 50 lotes	1

Fonte: ALENCAR et al., 2006

No quadro 4 tem-se o nível de dificuldade de limpeza sendo uma avaliação totalmente particular do operador; com a alteração do operador pode haver uma variação da pontuação.

No quadro 5 cita-se a taxa de ocupação que leva em consideração quanto do produto que tem em sua formulação determinado ativo é fabricado, ou seja, quanto tempo determinado produto ocupa o equipamento ou a produção. Note-se que a demanda de produção de produtos pode variar com o decorrer dos anos fazendo este índice variar conforme comportamento do mercado consumidor.

Baseado nisto os pontos provenientes dos quadros 4 e 5 podem levar a uma escolha que não necessariamente remeta a um produto que seja o real pior caso, já que o ativo menos solúvel (quadro 3) e mais tóxico (quadro 2) seriam muito mais críticos. Estes dois itens são capazes de, sozinhos, representar a capacidade do solvente da limpeza (normalmente água):

- a) Dissolver o ativo gerando uma possível avaliação de dificuldade;
- b) Se um resíduo em outro produto da rota poderia levar a algum efeito indesejável.

Logo, o uso somente dos quadros 2 e 3 seria o mais recomendável pensando numa escolha acertada que remeta ao potencial risco de uma contaminação cruzada.

Além disso, o uso da DL_{50} (Dose Letal 50%) como indicador de toxicidade do resíduo de ativo que pode existir em uma contaminação cruzada não é – certamente - o mais adequado quando se trata da avaliação em uma planta de sólidos hormonais, como é o caso do estudo em questão.

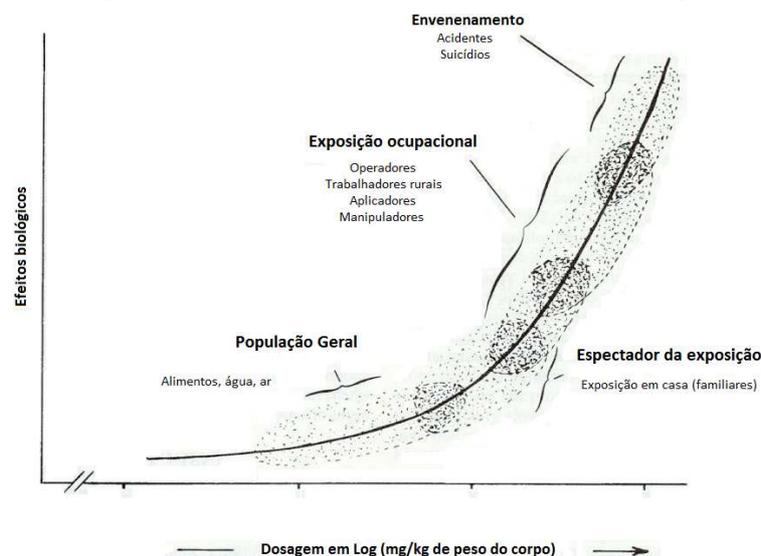
Geralmente, o primeiro teste de toxicidade realizado em uma nova entidade química é o teste de toxicidade aguda, conduzido via de regra a partir da administração em dose única da substância de interesse a fim de identificar possíveis órgãos-alvo e estabelecer o valor de DL_{50} (CASARETT, KLAASSEN; 2007).

A DL_{50} e outros efeitos tóxicos agudos são determinados após administração em dose única ou fracionada num período máximo de 24 horas. A administração pode se dar em uma ou mais espécies de roedores e a via de administração pode ser a oral ou qualquer outra que se mostre relevante para o tipo de exposição esperada. No caso de estudo de DL_{50} oral, a ração é suspensa na noite anterior à administração, garantindo assim jejum prévio de todos os animais em estudo e

minimizando variáveis associadas à absorção por via gástrica. O número de óbitos observados em um período de 14 dias após administração é tabulado, e a partir deste registro, calcula-se a DL₅₀. Em adição ao registro de mortalidade e ganho de peso corpóreo, exames diários devem ser realizados para avaliar alterações comportamentais e possíveis sinais de intoxicação, letargia e morbidade (CASARETT, KLAASSEN; 2007).

No entanto, é importante ter claro que a DL₅₀ não é uma constante biológica, e que as informações provenientes dos estudos de toxicidade de dose única, tais como as descritas acima, são somente relevantes para substâncias que apresentam potencial de risco agudo, como por exemplo, aquelas presentes em situação de exposição ocupacional (e.g. agrotóxicos, substâncias químicas etc), conforme Figura 9. Esse, certamente não é o caso de exposições como aquelas esperadas para a população em geral (e.g. via resíduos e contaminantes em água, alimentos e poluição ambiental) e nem através do uso de medicamentos. Por essa razão, os testes de DL₅₀ já foram banidos para esta classe de produtos desde a década de 1990 (ICH, 2000).

Figura 9 – Relação teórica de dose-efeito para toxicidade aguda comparando o potencial da exposição em termos de ocupação, nível de exposição e possíveis efeitos biológicos



Adaptado de CASARETT, KLAASSEN; 2007

Assim, para fins de determinação do Pior Caso o conceito mais conveniente seria aquele relacionado ao *NOAEL* (nível máximo de dose onde não se observa efeito adverso). Neste caso, deve-se observar o desfecho mais crítico, por exemplo,

a partir de estudo de toxicidade crônica, e o NOAEL estabelecido a partir desse tipo de estudo deveria ser usado para o cálculo do Pior Caso.

Apesar desse indicador de toxicidade remeter a uma realidade mais próxima à situação de risco associado a uma possível exposição via contaminação cruzada, valores de *NOAEL* dos ativos estudadas não foram encontrados na literatura científica. Esta informação foi solicitada então a ANVISA, contudo não se obteve resposta até o momento de fechamento da presente dissertação.

Foi realizada então uma busca acerca de informações publicadas pela ANVISA sobre NOAEL, NOEL (nível máximo de dose onde não se observa efeito) e DL_{50} e encontrou-se a equação matemática apresentada na Figura 10 e indicada pela ANVISA (2006).

Figura 10 - Fórmula para estimativa do NOEL

$$\text{NOEL: } \frac{LD_{50} \times 70}{2000}$$

Fonte: ANVISA, 2006

Conforme discutido anteriormente, a DL_{50} não é um bom parâmetro para avaliação de resíduos de ativos presentes em medicamentos, assim como não seria adequada - para esse tipo de situação - a utilização da fórmula apresentada pela ANVISA (Figura 10). Além disso, DL_{50} e NOEL não apresentam nenhuma relação linear, como pressuposto pela fórmula acima.

Assim, mediante ausência de informações adicionais, este trabalho utilizou a DL_{50} para avaliação de pior caso, mesmo considerando que o NOAEL teria sido o indicador mais adequado para a avaliação da toxicidade e entendendo que para avaliações futuras (de outros ativos) esta deva ser a opção de escolha.

Na tabela 5 pode se observar a solubilidade em água (solvente comumente utilizado na limpeza) e a DL_{50} de cada ativo.

Tabela 5 – Avaliação da solubilidade em água e toxicidade (DL₅₀) para os ativos da Rota de Fabricação

	Solubilidade em água	DL₅₀
Etinilestradiol	Insolúvel ¹	1200 mg/kg ²
Gestodeno	Insolúvel ¹	4000 mg/kg ²
Tibolona	Insolúvel ¹	1980 mg/kg ²

Fonte: ¹USP 34, 2010; ²Index Merck, 2001

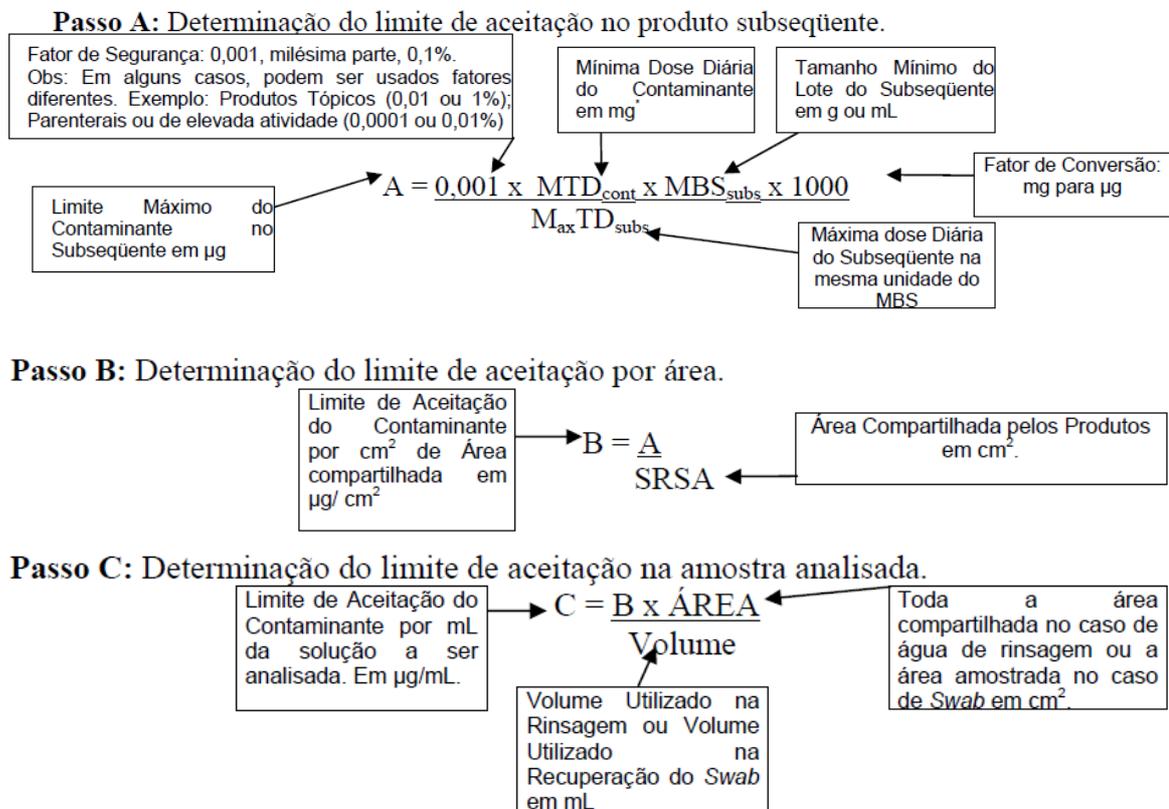
Baseado nisto o pior caso escolhido foi o Etinilestradiol. Como o produto que o contem é a associação entre este e o Gestodeno e o método analítico é capaz de detectar ambos, tanto a validação metodológica quanto a de limpeza será realizada para estes dois ativos.

iii. Elucidação do Cálculo Utilizado para a Determinação de Resíduo Aceitável e Cálculo

O cálculo utilizado para determinação do limite de resíduo aceitável foi realizado conforme guia relacionado à garantia da qualidade específico para validação de limpeza, onde se utilizou o mais conservador entre o limite “0,1% da dose limite” e “10 ppm”.

Na Figura 11 pode-se observar como é a recomendação da agência reguladora brasileira a cerca do critério 0,1% da dose limite.

Figura 11 - Critério de 0,1% da dose limite



Fonte: ANVISA, 2006

No passo A da Figura 11 tem-se os seguintes termos fazendo parte do cálculo:

- Mínima dose diária do contaminante – Busca-se a informação da quantidade mínima de ativo utilizada em um tratamento com o ativo considerado pior caso;
- Tamanho mínimo do lote do subsequente – Busca-se de todos os produtos que passam naquela rota de equipamentos aquele que tiver menor tamanho de lote, afinal, uma quantidade de resíduo X em um lote pequeno tem maior chance de ser tóxico¹ do que quando diluído em lote maior;
- Máxima dose diária do subsequente – Busca-se de todos os produtos que passam naquela rota de equipamentos aquele que tiver maior produto entre peso médio e posologia, afinal, ao ingerir um comprimido com alto peso médio e muitas vezes ao dia tem-se chance de ingerir maior quantidade de contaminante.

No passo B da Figura 11 tem-se o seguinte termo fazendo parte do cálculo:

¹Exceto na avaliação de equipamentos onde sejam produzidos antineoplásicos, já que nestes casos a relação dose X efeito não é aplicável

- Área compartilhada pelos produtos – Deve ser o somatório da área de todos os equipamentos que compõem a rota produtiva, afinal, o produto passa em todos estes equipamentos e a quantidade de contaminante que encontramos no produto final é o somatório do resíduo encontrado em cada equipamento (estas áreas foram calculadas com o programa Geometry 1.0).

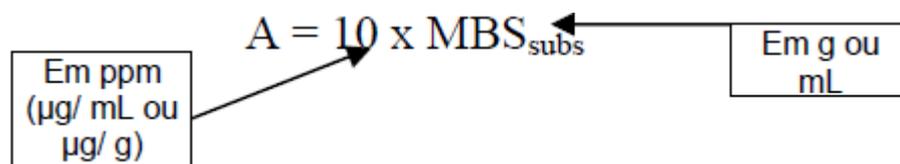
No passo C da Figura 11 tem-se os seguintes termos fazendo parte do cálculo:

- Área amostrada – Utilizou-se a área de 100 cm² para aumentar a superfície amostrada, no entanto este valor varia muito entre autores (COUTINHO et al., 2009; MILENOVIĆ; TODOROVIĆ, 2009; DHOKA et al, 2010; LEWEN, NUGENT; 2010)

- O volume utilizado deve ser o menor possível, a fim deste atingir um valor para alcançar um C compatível com a metodologia analítica utilizada.

Na Figura 12 pode-se observar como é a recomendação da Agência reguladora brasileira a cerca do critério 10 ppm.

Figura 12 - Critério de 10 ppm



Fonte: ANVISA, 2006

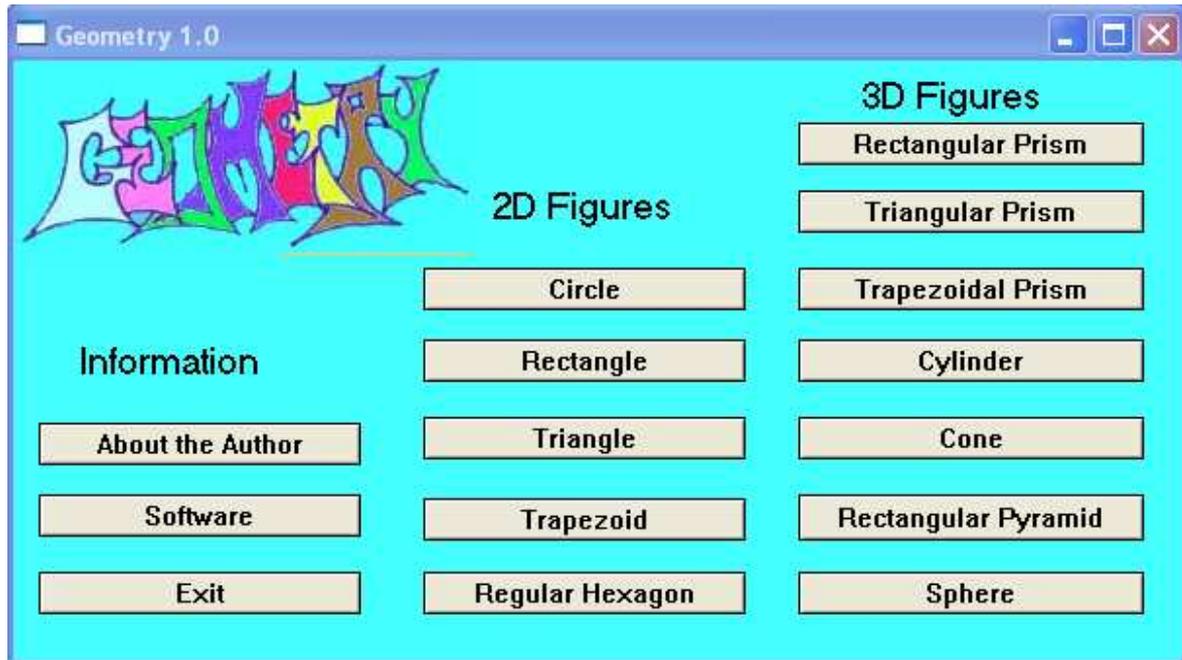
Os passos B e C são iguais ao do Critério 0,1% da dose limite (Figura 11).

O critério 10 ppm só deve ser usado quando o critério 0,1% da dose limite for muito alto (o que ocorre quando a mínima dose terapêutica é alta). No entanto este critério não é cientificamente justificável, já que não há nenhum elemento em seu cálculo que considere efeito terapêutico ou até mesmo toxicidade.

O programa Geometry 1.0 (Figura 13) citado anteriormente é um programa que baseado nas formas geométricas e medidas simples como raio, diâmetro, altura e comprimento é capaz de fornecer a área de superfície e o volume desta forma na grandeza desejada. Com isto as diferentes partes dos equipamentos são correlacionadas por similaridade de forma as formas geométricas e por sequencia as

medidas necessárias são aferidas e inseridas no software a fim de obter uma área superficial estimada. Cabe sempre ressaltar que toda estimativa deve ser arredondada para cima, já que quanto maior a área menor o resíduo aceitável por cm^2 , sendo desta forma a mais conservadora possível evitando um eventual risco ao paciente.

Figura 13 -Tela inicial do software Geometry 1.0



Fonte: Geometry 1.0

Como exemplo podem-se tomar o Cálculo da área de uma peça do Moinho Comasa (Figura 14), a descarga (Figura 15), que faz parte da Rota produtiva em questão. A descarga entra em contato com o produto pela face interna e esta possui a forma de um cilindro logo na Figura 13 será clicada na tecla “Cylinder” e abrirá a tela mostrada na Figura 16.

Figura 14 -Moinho Comasa da Rota Produtiva



Figura 15 - Descarga – Parte do Moinho Comasa



Figura 16 -Tela para cálculo de volume e área superficial do cilindro

Cylinder File Edit

Volume = $\pi \cdot r^2 \cdot h$

SA. = $2 \cdot \pi \cdot r \cdot (r + h)$

Height:

Radius:

Volume: 34500.9705154 cubic units

Surface Area: 5874.7782611 square units

Calculate

Neste caso conforme a Figura 16 é necessária a altura do cilindro e o raio, para isto a altura foi verificada com auxílio de uma trena sendo aferida em 38 cm e o diâmetro sendo 34 cm, com isto tem-se um raio de 17 cm (raio é o diâmetro dividido por dois), inserindo no software os dados obtêm-se a área superficial de 5874 cm².

Para cada peça que entra em contato com o produto de cada equipamento este cálculo é feito e o somatório de todas estas áreas é usado no cálculo (passo B da Figura 11) de resíduo aceitável como visto anteriormente.

Baseado nisto todos os valores necessários para o cálculo de resíduo aceitável foram levantados para o produto escolhido como pior caso (aquele que contém etinilestradiol e gestodeno) e estão disponíveis na tabela 6.

Tabela6 – Dados para cálculo do resíduo aceitável

Produto	Ativos	Mínima dose de ativo diária do contaminante (mg)	Tamanho mínimo de lote(g)	Máxima dose do subse- quente (g)	Soma da área da rota (cm ²)	Área amostrada (cm ²)	Volume (mL)
A	Etinilestradiol	0,015	60000	0,072	34.471,48	100	10
	Gestodeno	0,060					

Como resultado do uso destes dados para cálculo de resíduo aceitável chegou-se a tabela 7.

Tabela 7 – Resultados dos dois critérios para os dois ativos

Substâncias ativas	0,1% da dose limite (µg/mL)	10 ppm (µg/mL)
Etinilestradiol	≤3,66	≤174,05
Gestodeno	≤14,50	≤174,05

Logo, no decorrer do trabalho foi usado como critério que o limite de quantificação do método analítico tem que ser menor ou igual a 3,66 µg/mL para o etinilestradiol e menor ou igual a 14,50 µg/mL para o gestodeno. Além disto, quando as superfícies dos equipamentos forem amostradas após execução do procedimento de limpeza o resíduo encontrado deverá ser menor que estes limites para que a limpeza seja considerada aprovada e para alcançar o “status” Validação de Limpeza aprovada deve-se alcançar 3 limpezas consecutivas aprovadas após a produção dos lotes.

iv. Validação da metodologia analítica para detecção de resíduo ativo

1. Ensaio de Especificidade/Seletividade

Os resultados obtidos no teste de especificidade/seletividade encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados para o teste de especificidade/seletividade

Amostras/ Ativos	Etinilestradiol	Gestodeno
Amostra 100% Etinilestradiol	99,86%	0,00%
Amostra 100% Gestodeno	0,00%	100,10%
Amostra 100% Etinilestradiol e Gestodeno	99,87%	100,12%
Diluyente puro	0,01%	0,00%
Diluyente + swab	0,01%	0,00%
Amostra 100% Etinilestradiol e Gestodeno + swab	99,90%	100,08%
Placebo de excipientes	0,00%	0,00%
Amostra 100% Tibolona	0,00%	0,00%
Amostra 100% Detergente	0,01%	0,00%

Como pode ser observado o método é seletivo e específico para etinilestradiol e gestodeno, não sendo interferido por outros componentes que podem ser encontrados na superfície de equipamentos após a limpeza.

2. Ensaio de Linearidade (Curva de calibração)

O resultado para o ensaio de linearidade do Etinilestradiol pode ser observado na Figura 17 e do Gestodeno na Figura 18.

Figura 17 – Ensaio de linearidade para Etinilestradiol

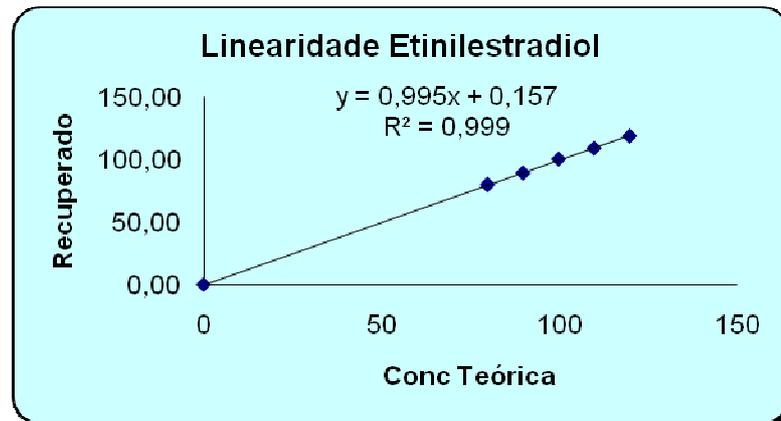
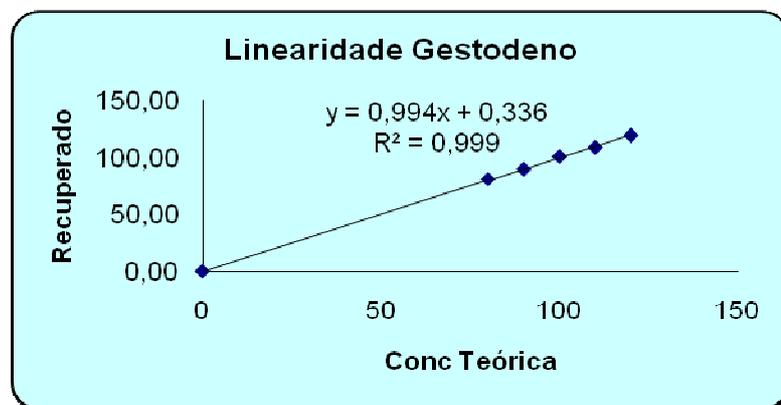


Figura 18 – Ensaio de linearidade para Gestodeno



Como pode ser observado ambos ativos apresentaram comportamento linear quando analisados pelo método em questão com R^2 superior a 0,99, logo o método alcança linearidade adequada.

3. Ensaio de Precisão inter e intra corrida / Exatidão

Os resultados de linearidade para avaliação da precisão do Analista 1 no dia 1 para etinilestradiol estão na Figura 19, Analista 1 no dia 1 para Gestodeno estão na Figura 20, Analista 2 no dia 2 para etinilestradiol estão na Figura 21 e Analista 2 no dia 2 para gestodeno estão na Figura 22. A avaliação da precisão intracorrida do Analista 1, intracorrida do Analista 2 e intercorrida estão disponíveis na tabela 9.

Figura 19 – Linearidade dos resultados do Analista 1 no dia 1 para Etinilestradiol

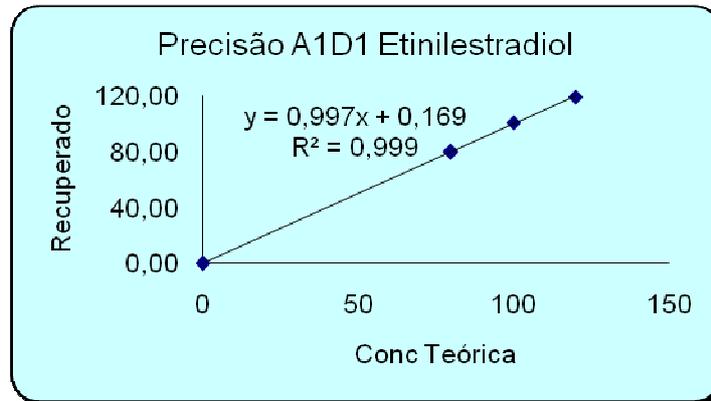


Figura 20 – Linearidade dos resultados do Analista 1 no dia 1 para Gestodeno

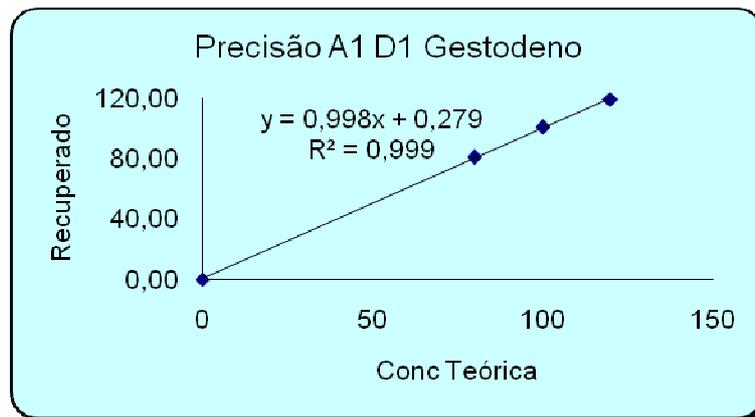


Figura 21 – Linearidade dos resultados do Analista 2 no dia 2 para Etinilestradiol

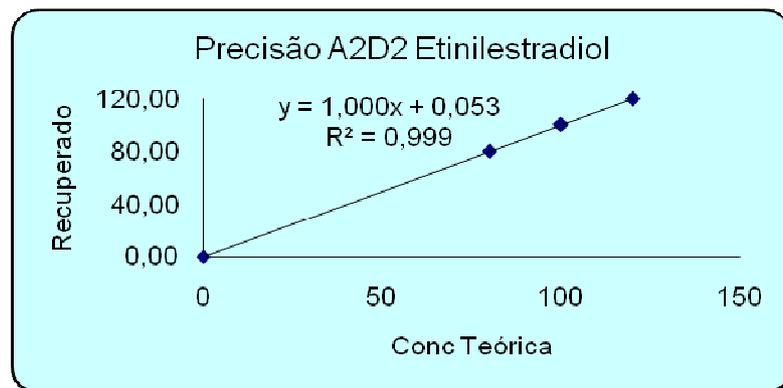


Figura 22 – Linearidade dos resultados do Analista 2 no dia 2 para Gestodeno

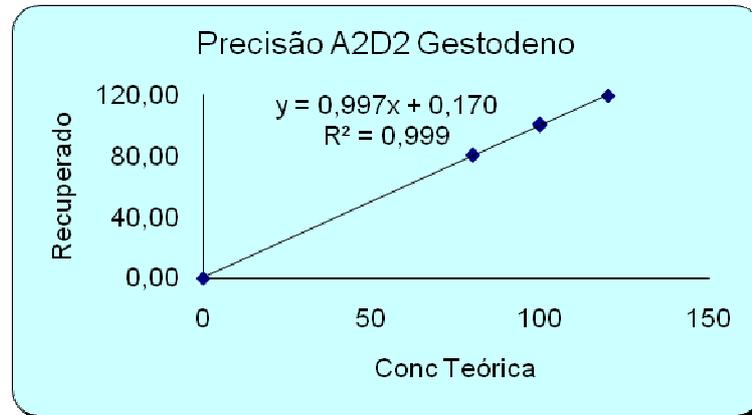


Tabela 9 – Avaliação da precisão intracorrída do Analista 1, intracorrída do Analista 2 e intercorrída

Precisão	Média Etinilestradiol	Média Gestodeno	Desvio Padrão Etinilestradiol	Desvio Padrão Gestodeno
Intracorrída Analista 1	99,99%	100,33%	0,75	0,74
Intracorrída Analista 2	100,13%	100,06%	0,47	0,60
Intercorrída	100,06%	100,20%	0,61	0,66

Baseado nas Figuras 19, 20, 21 e 22 pode-se observar que a variação analista e dia não interferiram na avaliação da linearidade, já que todos apresentaram resultados lineares com R^2 maior ou igual a 0,99. Já na tabela 9 observa-se que tanto os desvios padrões para ambos ativos tanto inter quanto intra corridas são menores que 1% podendo assim afirmar que não há mudança significativa de resultados alterando dia e analista.

Os resultados de exatidão para Analista 1 no dia 1 para etinilestradiol e gestodeno e Analista 2 no dia 2 para etinilestradiol e gestodeno estão disponíveis na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da exatidão

Concentração Teórica (%)	Concentração Encontrada Etinil (%)	Concentração Encontrada Gestodeno (%)	Recuperado Etinilestradiol (%)	Recuperado Gestodeno (%)
80	80,23	79,81	100,29	99,77
	80,49	80,74	100,61	100,92
	79,72	80,35	99,65	100,44
	80,77	80,77	100,96	100,96
	79,71	80,63	99,64	100,79
	79,64	80,67	99,56	100,84
100	99,70	100,55	99,70	100,55
	100,96	99,75	100,96	99,75
	100,28	100,76	100,28	100,76
	100,84	100,98	100,84	100,98
	100,50	100,55	100,50	100,55
	100,70	100,75	100,70	100,75
120	120,38	119,42	100,32	99,52
	119,57	119,30	99,64	99,42
	119,73	119,36	99,77	99,47
	119,38	119,37	99,48	99,47
	118,88	119,06	99,07	99,21
	118,98	119,28	99,15	99,40

Utilizando o teste de Kolmogorov Smirnov (MOORE, 2005) chega-se a conclusão que não existe evidência estatística que comprove que a distribuição não é normal a um nível de significância de 0,05. Portanto aplicou-se o teste t (LAPPONI, 2005) para duas amostras a fim de avaliar se há diferença estatística entre as médias obtidas para analista 1 no dia 1 e analista 2 no dia 2 a um nível de confiança de 95%, chegando-se a conclusão que não se pode afirmar que há diferença estatística entre estas. Aplicando-se, além disto, o teste F (MOORE, 2005) para duas amostras a fim de avaliar se há diferença estatística entre os desvios padrões obtidos pelo analista 1 no dia 1 e analista 2 no dia 2 a um nível de confiança de 95% chegou-se a conclusão que não se pode afirmar que há diferença estatística entre estes.

Como não foi possível provar que a distribuição é normalizada, podem-se utilizar testes não paramétricos. Foi utilizado o Teste de Mann-Whitney (MOORE, 2005) para comparar a média do Analista 1 no dia 1 e do analista 2 no dia 2,

chegando-se a conclusão que não existe diferença estatística que comprove a diferença entre as médias a um nível de significância de 95%.

4. Ensaio de Robustez

O resultado para o ensaio de robustez pode ser observado na tabela 11.

Tabela11 - Resultado ensaio de Robustez

Condições	Amostra 1		Amostra 2		Desvio Padrão	
	Etinil	Gest	Etinil	Gest	Etinil	Gest
Normal	99,72	100,44	99,33	100,44	0,28	0,00
Fluxo 2,0 mL/min	99,08	100,33	99,07	100,93	0,01	0,43
Fluxo 0,5 mL/min	99,71	100,66	99,09	100,82	0,44	0,12
ACN: Água (80:20)	99,47	100,87	99,42	100,59	0,03	0,20
ACN:Água (60:40)	99,31	100,79	99,25	100,38	0,04	0,28
ACN: Água (70:30)	99,33	100,85	99,30	100,72	0,02	0,09
ACN: Água (50:50)	99,46	100,47	99,35	100,80	0,07	0,23
Coluna Lichrospher150/4,6mm	99,53	100,90	99,42	100,70	0,07	0,14
Temp. 45°C	99,56	100,49	99,92	100,62	0,25	0,09

Como pode ser observado o desvio padrão entre os resultados é pequeno e a variação do doseamento é $100 \pm 1\%$, desta forma o método pode ser considerado robusto.

Aplicando-se o teste ANOVA (LAPPONI, 2005) para comparação de médias não se pode afirmar que há diferença estatística entre as condições variadas a nível de confiança de 95%.

5. Ensaio para Limite de Quantificação e Detecção

Como resultado do ensaio para limite de Quantificação e Detecção, tanto pelo método matemático quanto pelo método experimental temos o disposto na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados do limite de Quantificação e Detecção em $\mu\text{g/mL}$ pelo método matemático e experimental

Limites		Etinilestradiol	Gestodeno
Quantificação	Matemático	0,036	0,009
	Experimental	0,020	0,008
Detecção	Matemático	0,012	0,003
	Experimental	0,004	0,002

Como pode ser observado o método experimental apresentou resultados menores para ambos ativos em relação ao método matemático.

Para o valor de limite de quantificação decidiu-se considerar o resultado obtido pelo método experimental, logo se tem LQ de 0,020 $\mu\text{g/mL}$ e 0,008 $\mu\text{g/mL}$ para etinilestradiol e gestodeno, respectivamente.

Sendo ambos LQs menores que os limites de resíduo aceitável determinado no item 5.2.3, o método pode ser utilizado para determinação de resíduos na validação de limpeza.

v. Estabelecimento de parâmetros adequados para ensaio de recuperação de ativo

1. Determinação do procedimento de amostragem

O procedimento de amostragem escolhido foi o de “swab” por apresentar a vantagem de ir a pontos de difícil limpeza direcionalmente, sem diluir a quantidade de ativo presente exatamente naquele ponto, fato que ocorreria com a amostragem por água de rinsagem. Além disso, os ativos não são solúveis em água, logo a escolha de outro solvente poderia dificultar o procedimento de amostragem (o ativo é solúvel em álcool, no entanto seu uso como solvente de carreamento de ativo é dificultada por sua rápida evaporação, já que o volume que entra em contato com a superfície é essencial para determinação do ativo naquela superfície).

Além disto, a técnica de “swab” é a mais comumente usada neste tipo de estudo conforme a literatura científica (ALENCAR et al, 2004; ALENCAR et al, 2006a; COUTINHO et al., 2009).

2. Recuperação de ativo

Para avaliar se um procedimento é eficiente para recuperar o ativo faz-se o teste denominado Recuperação de ativo. Este teste consiste em propor uma metodologia para a amostragem da superfície do equipamento e testa-la no laboratório analítico para saber se desta forma o ativo consegue ser recuperado.

Com esta finalidade determinou-se a superfície de 10 cm X 10 cm (total de 100 cm²), sendo uma de aço inox 316L para ser similar a superfícies com este material de construção presente nos equipamentos e outra de material emborrachado para ser similar a superfícies com este material de construção nos equipamentos.

Preparou-se uma solução contendo 36,2 µg/mL de Etinilestradiol e 145,0µg/mL de Gestodeno. Colocou-se 1,0 mL desta solução em cima de cada placa, aguardou todo líquido evaporar. A amostragem desta superfície foi realizada utilizando swab Texwipe TX715(Figura 23). Este foi mergulhado em álcool 96% e após um lado de sua ponta foi deslizado firmemente pela superfície conforme passo A da Figura 24 e ao término disto o outro lado de sua ponta não utilizado até então foi deslizado firmemente pela superfície conforme passo B da Figura 24.

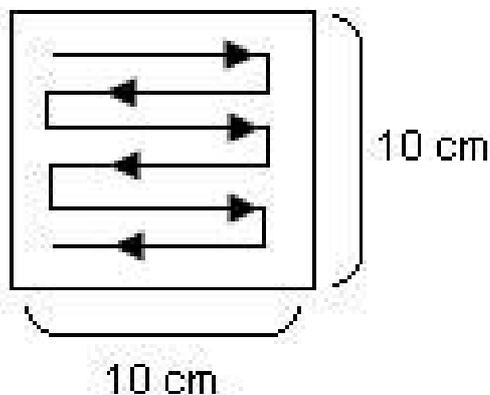
Figura 23 – Foto do swab utilizado nas amostragens



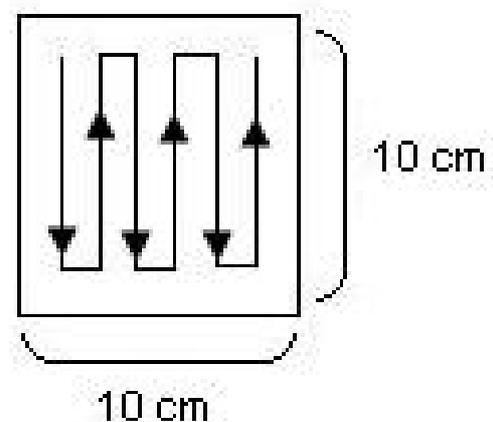
Fonte: <http://www.texwipe.com/products/swabs/cleaning-validation.aspx> Acessado em 06/02/2012 as 22:18

Figura 24 – Modo de amostrar a superfície

Passo A



Passo B



Após este processo o swab foi submerso em 10 mL da fase móvel descrita no item 4.2.4 e levado a sonicação por 10 minutos. A solução proveniente deste processo foi colocada em vial e levada ao HPLC para análise conforme metodologia validada.

Todo este processo foi realizado com 10 superfícies de aço inox 316L e 10 superfícies emborrachadas a fim de avaliar se este método de amostragem é eficaz para recuperar o ativo.

Como resultado da amostragem em superfície em aço inox tem-se a tabela 13 com a porcentagem recuperada em cada “swab” e na tabela 14 o valor que será usado para correção dos resultados encontrados.

Para trabalhar sempre com o pior caso não se utiliza a média dos resultados, e sim o menor fator de recuperação, por que com isto se garante um resultado de resíduo o maior possível de ser encontrado.

Alguns trabalhos (ALENCAR et al, 2004) usam fatores de recuperação atribuídos conforme o fornecedor para os cálculos, porém isto pode sub ou superestimar os resultados e desta forma não há uma avaliação da adequação da metodologia de amostragem proposta a prática realizada na amostragem.

Tabela 13 – Fator de recuperação de ativos em superfície de aço inox

Amostra	% Recuperação Etinilestradiol	% Recuperação Gestodeno
1	90,49	85,05
2	90,45	83,52
3	92,31	84,22
4	92,89	85,13
5	92,12	85,54
6	91,31	84,4
7	90,66	85,22
8	90,61	84,78
9	90,96	85,37
10	91,84	84,12
Desvio Padrão	0,87	0,65

Tabela 14 – Fator de correção de trabalho em superfícies de aço inox

	Etinilestradiol	Gestodeno
Fator de correção	90,45%	83,52%

Como resultado da amostragem em superfície emborrachada tem-se a tabela 15a porcentagem recuperada em cada “swab” e na tabela 16 o valor que será usado para correção dos resultados encontrados.

Tabela 15 – Fator de recuperação de ativos em superfície emborrachada

Amostra	% Recuperação Etinilestradiol	% Recuperação Gestodeno
1	87,49	82,05
2	88,45	81,52
3	88,31	82,22
4	89,89	82,13
5	89,12	81,54
6	87,31	83,4
7	87,66	81,22
8	88,61	83,78
9	89,96	82,37
10	87,84	81,12
Desvio Padrão	0,94	0,88

Tabela 16 – Fator de correção de trabalho em superfícies emborrachada

	Etinilestradiol	Gestodeno
Fator de correção	87,31%	81,12%

Como pode ser observado tanto em superfície de aço inox quanto emborrachada o os resultados de recuperação são maiores ou iguais a 75% garantindo que mais que $\frac{3}{4}$ de todo resíduo de ativo da superfície é recuperado pela metodologia e no final todo resultado será corrigido por este fator, a fim de garantir um resultado o mais próximo da realidade e garantindo uma estimativa sempre para cima. Os desvios padrões encontrados também foram menor que 1,00 garantindo que também não há grande dispersão entre os resultados.

Apesar de Milenovic e Todorovic (2009) afirmarem que o ideal é amostrar a superfície com dois “swabs”, neste trabalho constatou-se que apenas um foi suficiente para alcançar recuperação satisfatória.

Conforme Fekete, Fekete e Ganzler (2009) superfícies emborrachadas apresentam maior dificuldade de remoção de resíduos, o que pode ser confirmado pelos resultados encontrados neste trabalho. Foi realizado o teste Q para valores aberrantes nos resultados das tabelas acima não havendo algum valor discrepante,

o Teste de Kolmogorov Smirnov (MOORE, 2005) foi aplicado com nível de confiança de 95% e baseado neste não se pode afirmar que a distribuição não é normal. E finalmente com o objetivo de comparar as médias dos resultados de etinilestradiol e gestodeno em inox e emborrachado chegou-se a conclusão que estes são diferentes com 95% de confiança, confirmando que superfícies emborrachadas possuem menor recuperação de ativo que superfícies de inox para ambos ativos.

- vi. Acompanhamento do processo de limpeza, inspeção visual, amostragem e análise das amostras após limpeza

1. Determinação dos pontos de amostragem

Os pontos de amostragem foram determinados conforme item 4.2.6.1 e foram apresentados na forma de álbum de equipamentos. Cada equipamento foi fotografado e identificado; cada ponto de amostragem estabelecido também foi fotografado e identificado a fim de evitar erros durante a amostragem. Construiu-se também uma tabela onde se determina o critério de seleção dos pontos para cada equipamento.

Geralmente os critérios para seleção de pontos são:

- Ponto representativo onde se trata de uma superfície lisa;
- Ponto com dificuldade de limpeza, isto é um ponto de difícil acesso na operação de limpeza ou que possui superfície que dificulte a remoção de resíduos;
- Ponto com acúmulo de resíduo - locais onde se acumulam espontaneamente resíduos.

Para o equipamento Misturador tem-se a Figura 25 como álbum de equipamento e a tabela 17 como critério de seleção de pontos.

Figura 25 – Álbum do Misturador

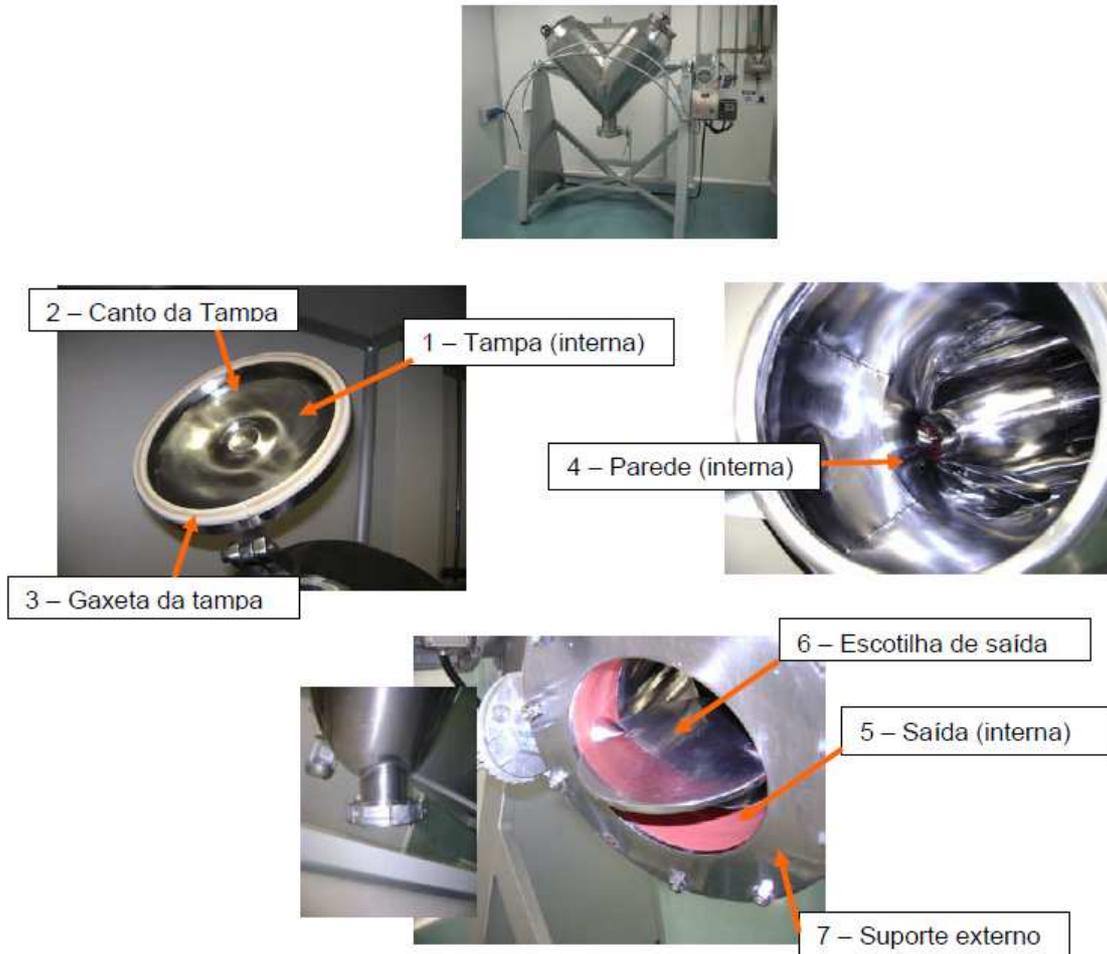


Tabela 17 – Critério de seleção de pontos para Misturador

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1- Tampa (interna)	Ponto representativo
2- Canto da tampa	Acúmulo de resíduo/Dificuldade de Limpeza
3- Gaxeta da tampa	Acúmulo de resíduo/Dificuldade de Limpeza
4- Parede (interna)	Ponto representativo
5- Saída (interna)	Dificuldade de Limpeza
6- Escotilha de saída	Dificuldade de Limpeza
7- Suporte externo	Ponto representativo

Para o equipamento Granulador TK-Fielder tem-se a Figura 26 como álbum de equipamento e a tabela18 como critério de seleção de pontos.

Figura 26 – Álbum do Granulador TK-Fielder

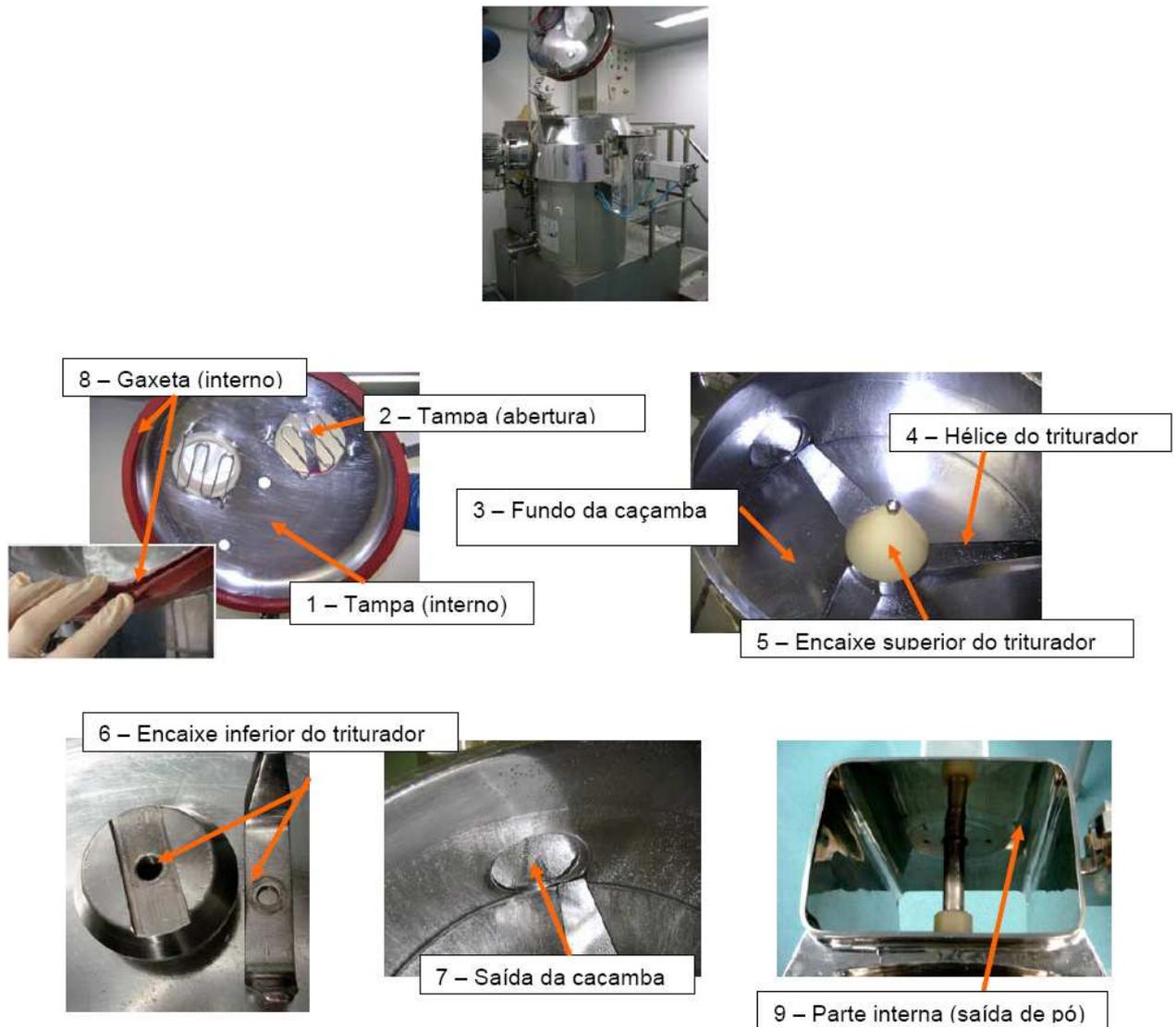


Tabela 18 – Critério de seleção de pontos para Granulador TK-Fielder

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1- Tampa (interno)	Ponto representativo
2- Tampa (abertura)	Dificuldade de limpeza
3- Fundo da caçamba	Ponto representativo
4- Hélice do triturador	Ponto representativo
5 – Encaixe superior do triturador	Dificuldade de limpeza
6 - Encaixe inferior do triturador	Dificuldade de limpeza
7 – Saída da caçamba	Dificuldade de limpeza
8 – Gaxeta (interno)	Dificuldade de limpeza
9 – Parte interna (saída)	Dificuldade de limpeza

Para o equipamento Estufa tem-se a Figura 27 como álbum de equipamento e a tabela 19 como critério de seleção de pontos.

Figura 27 –Álbum da Estufa

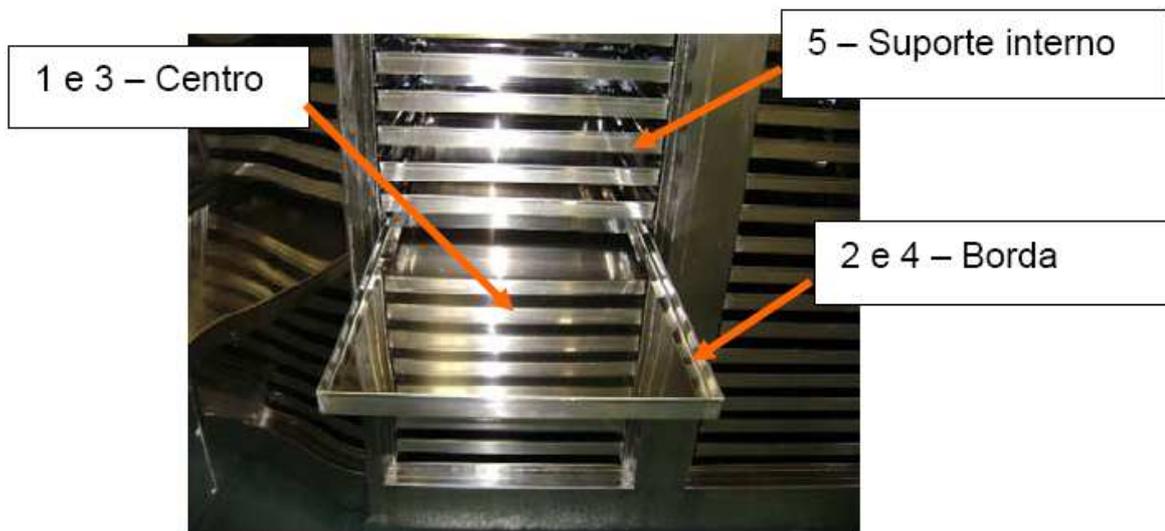


Tabela 19 – Critério de seleção de pontos para Estufa

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1- Bandeja direita (centro)	Ponto representativo
2- Bandeja direita (borda)	Ponto de acúmulo de resíduo
3- Bandeja esquerda (centro)	Ponto representativo
4- Bandeja esquerda (borda)	Ponto de acúmulo de resíduo
5 – Suporte interno	Ponto de acúmulo de resíduo

Para o equipamento Moinho Comasa tem-se a Figura 28 como álbum de equipamento e a tabela 20 como critério de seleção de pontos.

Figura 28 –Álbum do Moinho Comasa

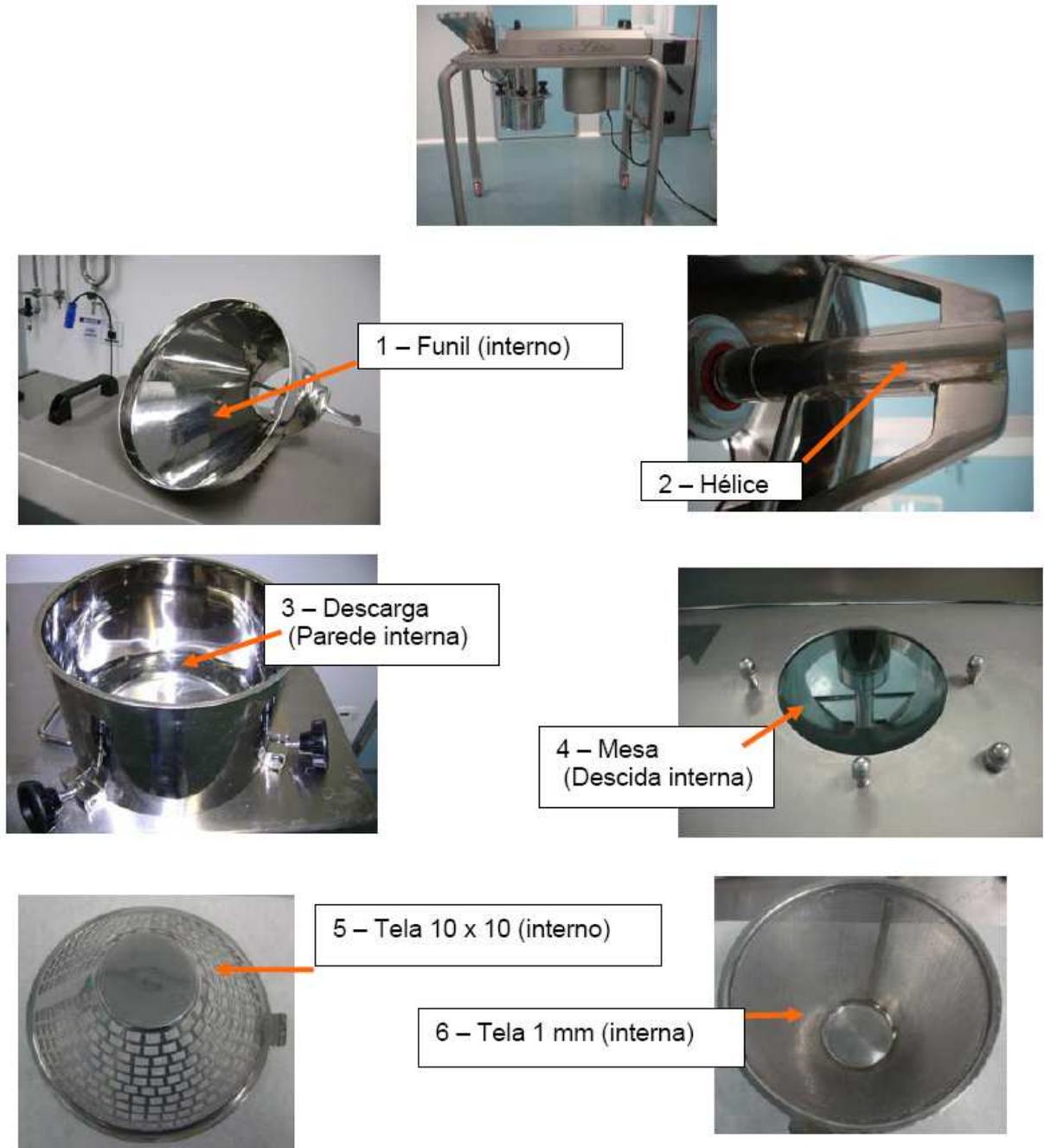


Figura 28(continuação) – Álbum do Moinho Comasa

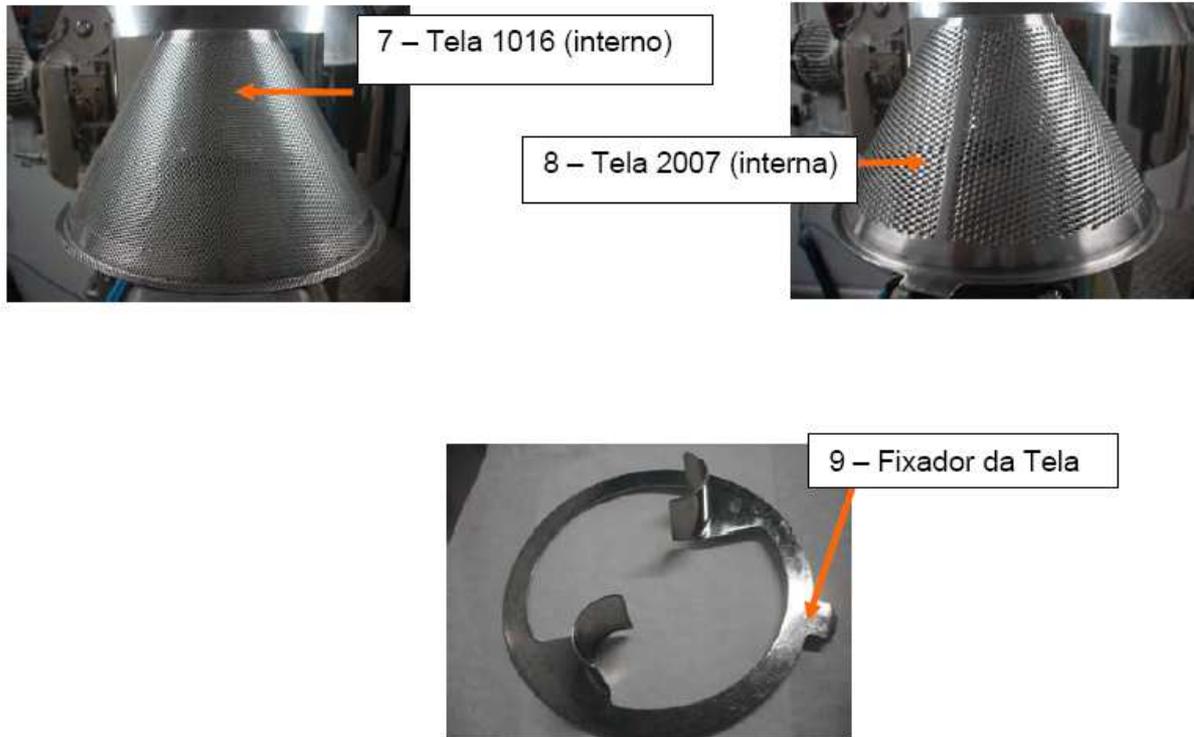


Tabela 20 – Critério de seleção de pontos para Moinho Comasa

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1- Funil (interno)	Ponto representativo
2- Hélice	Ponto representativo
3- Descarga (interna)	Ponto representativo
4- Mesa (descida interna)	Ponto representativo
5- Tela 10 x 10 (interna)	Dificuldade de limpeza
6- Tela 1 mm (interna)	Dificuldade de limpeza
7- Tela 1016 (interna)	Dificuldade de limpeza
8- Tela 2007 (interna)	Dificuldade de limpeza
9- Fixador da Tela	Ponto representativo

Para o equipamento Compressora Fette e seu desempoeirador tem-se a Figura 29 como álbum de equipamento e a tabela 21 como critério de seleção de pontos.

Figura 29 –Álbum da Compressora Fette e seu desempoeirador



Figura 29 (continuação)– Álbum da Compressora Fette e seu desempoeirador

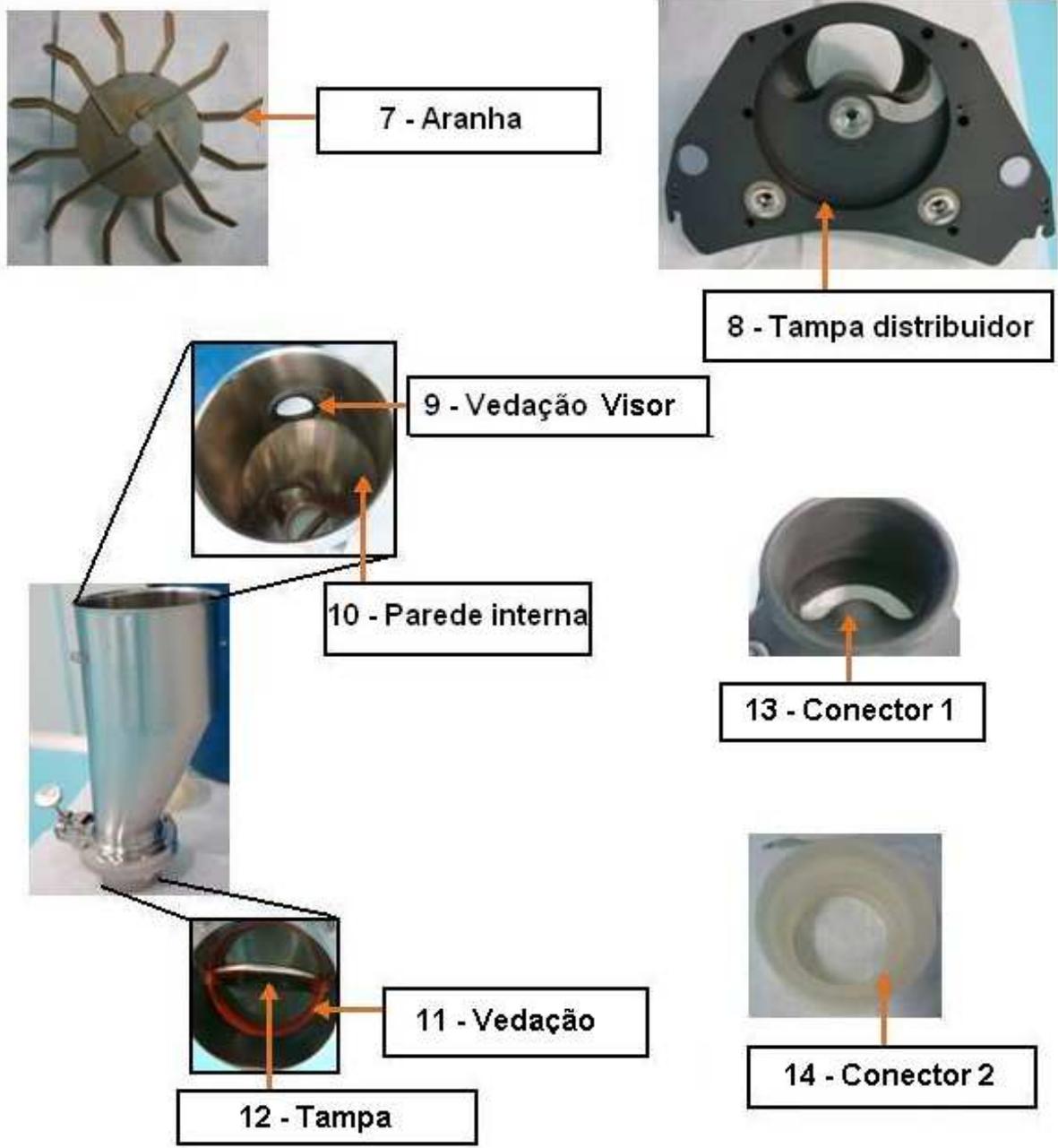


Figura 29 (continuação)– Álbum da Compressora Fette e seu desempoeirador

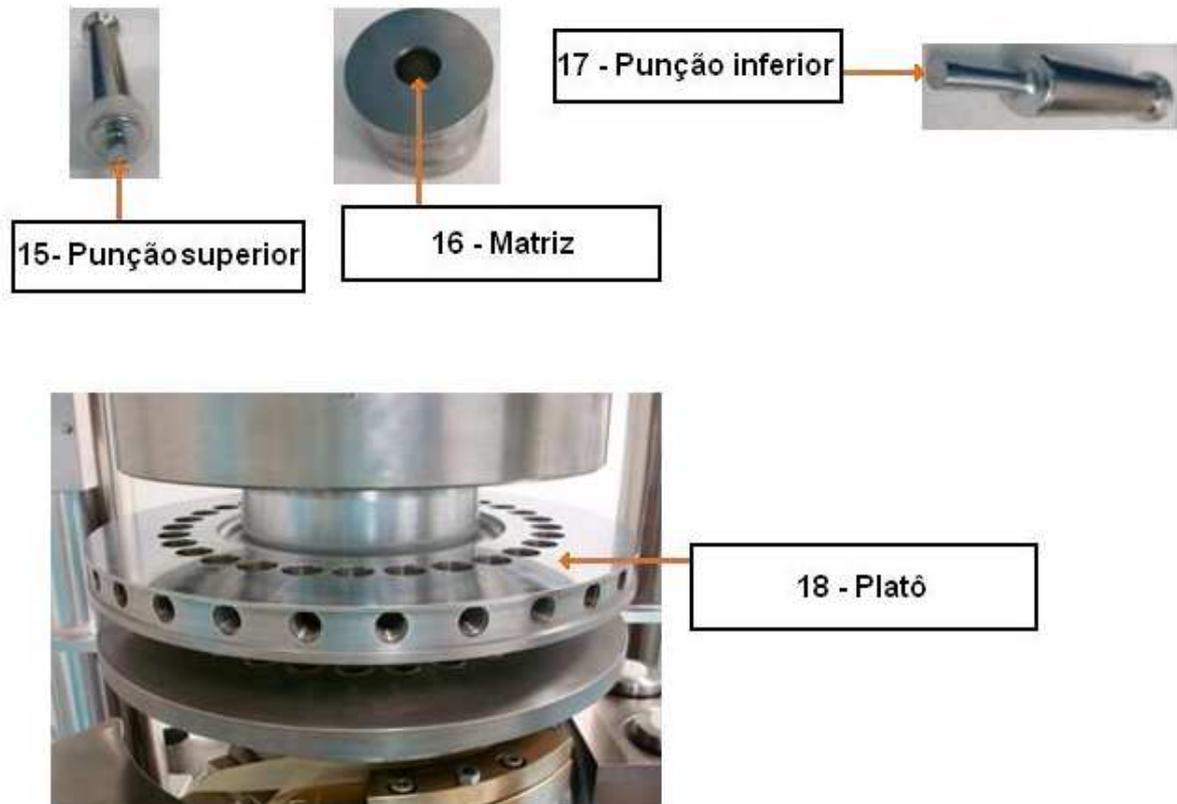


Tabela 21– Critério de seleção de pontos para Compressora Fette e seu desempoeirador

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1 - Final da Rampa	Ponto representativo
2 - Rampa	Ponto representativo
3 – Calha Desempoeirador	Ponto representativo
4 - Distribuidor	Dificuldade de limpeza
5 – Distribuidor II	Dificuldade de limpeza
6 – Sem fim	Dificuldade de limpeza
7 - Aranha	Dificuldade de limpeza
8 – Tampa distribuidor	Dificuldade de limpeza
9 – Vedação visor	Dificuldade de limpeza
10 – Parede Interna	Ponto representativo
11 - Vedação	Dificuldade de limpeza
12 - Tampa	Ponto representativo
13 – Conector 1	Dificuldade de limpeza
14 – Conector 2	Dificuldade de limpeza
15 – Punção superior	Dificuldade de limpeza
16 - Matriz	Dificuldade de limpeza
17 – Punção inferior	Dificuldade de limpeza
18 – Platô	Dificuldade de limpeza

Para o equipamento Blisterizadora tem-se a Figura 30 como álbum de equipamento e a tabela 22 como critério de seleção de pontos.

Figura 30 – Álbum da Blisterizadora

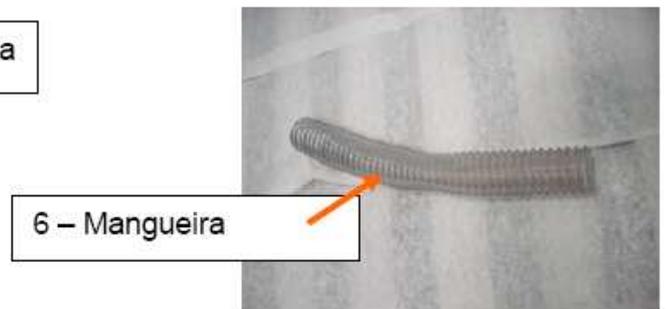
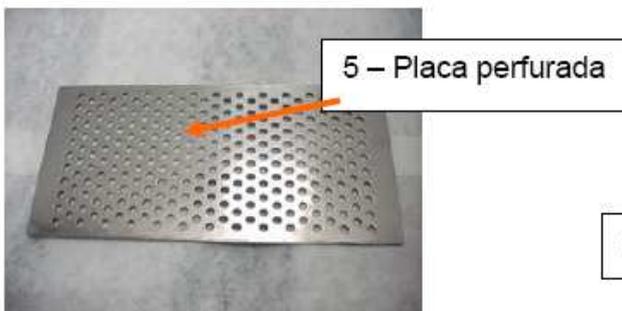
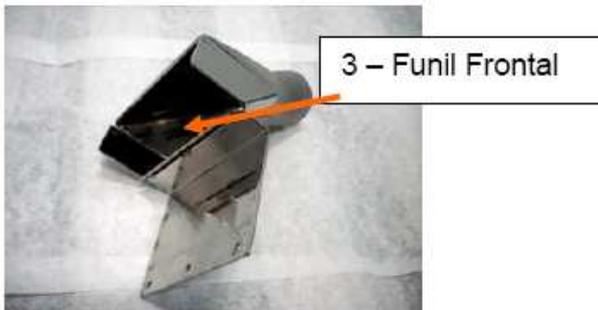


Figura 30 (continuação) – Álbum da Blisterizadora



Tabela 22 – Critério de seleção de pontos para Blisterizadora

Pontos de amostragem	Critério de seleção dos pontos
1- Calha Vibratória	Ponto representativo / Dificuldade de Limpeza
2- Funil	Ponto representativo
3- Funil Frontal	Ponto representativo / Dificuldade de Limpeza
4- Suporte do Funil	Ponto representativo
5- Placa perfurada	Ponto representativo / Dificuldade de Limpeza
6- Mangueira	Dificuldade de Limpeza
7- Coletor de resíduos	Ponto representativo
8- Alimentador	Dificuldade de Limpeza

2. Acompanhamento do processo

O procedimento de limpeza executado por cada operador para cada equipamento foi acompanhado e avaliado se seguia o Procedimento Operacional Padrão. Para todos os equipamentos a execução foi conforme para todos os operadores, passando ao próximo item.

3. Inspeção Visual

A inspeção visual foi realizada a fim de observar se havia algum resíduo visível a olho nu na superfície do equipamento, o que já geraria uma reprovação e

levaria a uma alteração do Procedimento operacional padrão de limpeza daquele equipamento com inclusão deste ponto como ponto crítico para limpeza. Para todos os equipamentos o critério inspeção visual foi conforme, passando para o próximo item.

4. Amostragem e Análise das Amostras

A amostragem foi realizada nos pontos determinados no item 5.2.6.1 conforme metodologia testada no item 5.2.5.2 e analisada conforme método analítico descrito no item 4.2.4 validado conforme item 5.2.4.

Como resultado tem-se as seguintes tabelas:

Tabela 23– Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Misturador

Pontos de amostragem	Gestodeno (µg/mL)			Ethinilestradiol (µg/mL)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Tampa (interna)	0,039	0,030	0,122	<0,020	<0,020	<0,020
2 – Canto da tampa	0,032	0,028	<0,008	0,080	<0,020	<0,020
3 – Gaxeta da tampa	0,120	0,028	0,128	0,080	<0,020	<0,020
4 – Parede (interna)	<0,008	<0,008	0,084	<0,020	<0,020	<0,020
5 – Saída (interna)	0,018	<0,008	0,173	<0,020	0,109	<0,020
6 – Escotilha de saída	0,019	0,009	0,097	<0,020	0,003	<0,020
7 – Suporte externo	0,023	0,009	0,150	<0,020	<0,020	<0,020

Tabela 24 – Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Granulador TK Fielder

Pontos de amostragem	Gestodeno (µg/mL)			Ethinilestradiol (µg/mL)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Tampa (interno)	0,020	0,034	0,126	<0,020	0,041	<0,020
2 – Tampa (abertura)	0,237	0,212	0,126	0,194	0,023	<0,020
3 – Fundo da caçamba	<0,008	<0,008	0,067	<0,020	0,234	<0,020
4 – Hélice do triturador	<0,008	0,013	0,082	0,200	0,037	<0,020
5 - Encaixe superior do triturador	<0,008	0,037	0,093	0,243	<0,020	<0,020
6 – Encaixe inferior do triturador	0,125	0,314	0,084	<0,020	<0,020	<0,020
7 – Saída da caçamba	0,020	0,080	0,084	<0,020	<0,020	<0,020
8 – Gaxeta (interno)	1,792	7,590	-	0,276	1,488	-
9 – Parte interna (saída de pó)	0,025	0,320	0,159	<0,020	0,038	<0,020

Tabela 25 – Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Estufa

Pontos de amostragem	Gestodeno (µg/mL)			Etinilestradiol (µg/mL)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Bandeja Direita (Centro)	0,078	<0,008	0,022	<0,020	<0,020	<0,020
2 – Bandeja Direita (Borda)	0,075	<0,008	0,081	<0,020	<0,020	<0,020
3 – Bandeja Esquerda (Centro)	0,069	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	<0,020
4 – Bandeja Esquerda (Borda)	0,068	0,034	<0,008	<0,020	<0,020	<0,020
5 – Suporte interno	0,060	0,018	0,024	<0,020	<0,020	<0,020

Tabela 26 – Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Moinho Comasa

Pontos de amostragem	Gestodeno (µg/mL)			Etinilestradiol (µg/mL)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Funil (interno)	<0,008	0,018	<0,008	0,025	<0,020	0,0533
2 – Hélice	0,020	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0417
3 – Descarga(Parede interna)	0,035	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0425
4 – Mesa (Descida interna)	<0,008	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0296
5 – Tela 10 x 10 (interna)	<0,008	0,009	<0,008	<0,020	<0,020	0,0446
6 – Tela 1 mm (interna)	<0,008	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0433
7 – Tela 1016 (interna)	<0,008	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0373
8 – Tela 2007 (interna)	<0,008	0,015	<0,008	0,026	<0,020	0,0311
9 – Fixador da Tela	0,020	<0,008	<0,008	<0,020	<0,020	0,0543

Tabela 27 – Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Compressora Fette e seu desempoeirador

Pontos de amostragem	Gestodeno (µg/mL)			Etinilestradiol (µg/mL)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 - Final da Rampa	<0,008	0,0506	<0,008	<0,020	<0,020	<0,020
2 - Rampa	<0,008	0,0721	0,2815	<0,020	<0,020	<0,020
3 – Calha Desempoeirador	<0,008	0,0809	0,3474	<0,020	<0,020	<0,020
4 - Distribuidor	<0,008	0,2041	0,531	<0,020	<0,020	<0,020
5 – Distribuidor II	<0,008	0,0866	0,5844	<0,020	<0,020	<0,020
6 – Sem fim	<0,008	0,0767	0,3503	<0,020	<0,020	<0,020
7 - Aranha	<0,008	0,0806	0,6459	<0,020	<0,020	<0,020
8 – Tampa distribuidor	<0,008	0,1556	0,3471	<0,020	<0,020	<0,020
9 – Vedação visor	<0,008	0,2263	<0,008	<0,020	<0,020	<0,020
10 – Parede Interna	<0,008	0,1039	0,382	<0,020	<0,020	<0,020
11 - Vedação	<0,008	0,6097	0,7852	<0,020	<0,020	<0,020
12 - Tampa	<0,008	0,0534	0,1601	<0,020	<0,020	<0,020
13 – Conector 1	<0,008	0,0993	0,4487	<0,020	<0,020	<0,020
14 – Conector 2	<0,008	0,2036	0,5142	<0,020	<0,020	<0,020
15 – Punção superior	<0,008	0,1061	<0,008	<0,020	<0,020	<0,020
16 - Matriz	<0,008	0,0719	0,2963	<0,020	<0,020	<0,020
17 – Punção inferior	<0,008	0,0737	0,0782	<0,020	<0,020	<0,020
18 – Platô	<0,008	0,1112	0,2503	<0,020	<0,020	<0,020

Tabela 28 – Resultados corrigidos das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso na Blisterizadora

Pontos de amostragem	Gestodeno ($\mu\text{g/mL}$)			Ethinilestradiol ($\mu\text{g/mL}$)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Calha Vibratória	<0,008	<0,008	0,308	0,042	<0,020	<0,020
2 – Funil	0,066	<0,008	0,163	0,053	<0,020	<0,020
3 – Funil Frontal	0,075	<0,008	0,173	<0,020	<0,020	<0,020
4 – Suporte do Funil	0,057	<0,008	0,132	<0,020	<0,020	<0,020
5 – Placa perfurada	0,071	<0,008	0,303	0,064	<0,020	<0,020
6 – Mangueira	0,318	<0,008	0,423	<0,020	<0,020	<0,020
7 – Coletor de resíduos	0,054	<0,008	0,103	<0,020	<0,020	<0,020
8 – Alimentador	0,070	0,067	0,234	<0,020	0,071	<0,020

Como pode ser observado na tabela 24, correspondente aos resultados do Granulador TK Fielder, ao aplicar-se o teste Q para identificar valores aberrantes observa-se resíduo discrepante dos demais pontos no ponto 9 (Gaxeta).

Conforme Fekete, Fekete e Ganzler (2009) superfícies emborrachadas apresentam maior dificuldade de remoção de resíduos, indicando quando possível dedicação destas partes dos equipamentos. Para solução desta discrepância optou-se por incluir no Procedimento Operacional Padrão o uso de Gaxeta dedicada a cada produto desta rota, sendo estas distintas pela cor. Com isto estas foram segregadas em caixas de acondicionamento diferentes, sendo a vermelha para o produto pior caso, a amarela para um segundo produto da rota e a azul para um terceiro produto da rota, tudo isto identificado nas caixas de acondicionamento e no Procedimento Operacional Padrão de uso e limpeza do Granulador TK Fielder. Todos os operadores foram treinados na nova versão do Procedimento Operacional Padrão em questão e obtiveram resultados conformes na execução do procedimento. Os demais equipamentos não apresentaram valores aberrantes na aplicação do teste Q.

Com isto o ponto gaxeta deixa de ser compartilhado entre os produtos, logo deixa de ser um ponto de possível contaminação cruzada entre estes, logo não precisa mais ser amostrado na validação físico-química do ativo, com isto a tabela de pontos amostrados e seus resultados para 3 limpezas após fabricação dos lotes do produto pior caso estão disponíveis na tabela 29.

Tabela 29– Resultados das amostragens de todos os pontos de limpezas posteriores a produção de 3 lotes do produto pior caso no Granulador TK Fielder após exclusão do ponto da Gaxeta

Pontos de amostragem	Gestodeno ($\mu\text{g/mL}$)			Etinilestradiol ($\mu\text{g/mL}$)		
	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3	Limpeza 1	Limpeza 2	Limpeza 3
1 – Tampa (interno)	0,020	0,034	0,126	<0,020	0,041	<0,020
2 – Tampa (abertura)	0,237	0,212	0,126	0,194	0,023	<0,020
3 – Fundo da caçamba	<0,008	<0,008	0,067	<0,020	0,234	<0,020
4 – Hélice do triturador	<0,008	0,013	0,082	0,200	0,037	<0,020
5 - Encaixe superior do triturador	<0,008	0,037	0,093	0,243	<0,020	<0,020
6 – Encaixe inferior do triturador	0,125	0,314	0,084	<0,020	<0,020	<0,020
7 – Saída da caçamba	0,020	0,080	0,084	<0,020	<0,020	<0,020
9 – Parte interna (saída de pó)	0,025	0,320	0,159	<0,020	0,038	<0,020

Para avaliar se todos os resultados encontrados nas amostragens apresentavam distribuição normal foi aplicado o Teste de Kolmogorov Smirnov (MOORE, 2005) com nível de confiança de 95% e não se pode afirmar que a distribuição não é normal.

Após isto foi realizado o teste para determinar o intervalo de confiança (LAPPONI, 2005) com $\alpha=0,05$, e todos os intervalos de confiança para gestodeno encontraram-se abaixo de $14,5\mu\text{g/mL}$ e para etinilestradiol abaixo de $3,66\mu\text{g/mL}$.

Além deste foi realizado o teste t (LAPPONI, 2005) para uma amostra e se tem evidencia estatística que o valor da média dos resultados em todos os equipamentos para gestodeno é menor que $14,5\mu\text{g/mL}$ e para etinilestradiol é menor que $3,66\mu\text{g/mL}$ com 95% de confiança.

Baseado nos valores encontrados acima e nos testes estatísticos aplicados pode-se concluir que os resultados encontrados estão abaixo dos limites especificados para as 3 limpezas em relação aos dois ativos. Desta forma os procedimentos de limpeza dos equipamentos descritos encontram-se validados.

- vii. Análise de impacto da inclusão de novo produto na rota de produção ou inclusão/substituição de equipamento diferente na rota

Na inclusão de novo produto na rota produtiva a avaliação deve ser feita para ponderar em primeiro lugar se este será o pior caso em relação aos demais. Caso isto seja realidade a validação deve ser novamente realizada. Para isto o ativo presente no novo produto deve apresentar solubilidade menor que o atual produto pior caso; nesta situação o ativo deve ser igualmente insolúvel e em relação à toxicidade deve ser mais tóxico que o atual produto pior caso.

Em segundo lugar deve ser avaliado se um novo produto ou substituição/inclusão de novo equipamento reduzirá o limite de resíduo aceitável. Caso isto ocorra a) a validação de metodologia analítica deve ser avaliada a fim de ter um limite de quantificação menor do que o novo resíduo aceitável, b) novo teste de recuperação de ativo deve ser realizado para avaliar se alcança recuperação aceitável de resíduo dispersa em uma superfície e gerar novo fator de correção e c) todos os resultados encontrados na validação inicial devem ser novamente corrigidos pelo novo fator a fim de se avaliar se o “status” validado é mantido com essa alteração ou se nova validação deve ser realizada.

Se o novo produto possuir tamanho de lote menor do que o usado no cálculo, este fato levaria a uma redução no limite de resíduo aceitável, implicando em todas as avaliações dispostas acima. Muitas vezes vale a pena trabalhar sempre com o lote do tamanho do usado no cálculo ou realizar o cálculo com o menor tamanho de lote possível baseado na capacidade dos equipamentos, a fim de abranger qualquer tamanho de lote desejado.

No caso do novo produto possuir peso médio maior do que o utilizado no cálculo também haveria uma redução no limite de resíduo aceitável, implicando em todas as avaliações dispostas acima. Pode-se optar por realizar o cálculo com o maior peso médio possível ou limitar o valor do peso médio do novo produto ao peso médio usado no cálculo para que não haja alteração no limite de resíduo aceitável.

Na adição de um novo equipamento na rota produtiva, a área total da rota será aumentada. Como Resultado tem-se uma redução do limite de resíduo

aceitável, como já foi discutido anteriormente. Não há como impedir que esta alteração não interfira no limite, o que não ocorre com o tamanho de lote e peso médio que pode ser remediado e planejado. A reavaliação dos resultados para todos os equipamento pode, então, ser realizada, sendo os resultados indicativos de manutenção da validação ou de uma nova validação. No entanto, há sempre a certeza de que pelo menos uma validação deve ser realizada para este novo equipamento, onde serão determinados seus pontos críticos e amostrados e confrontados com o limite, a fim de validar o procedimento de limpeza do novo equipamento da rota.

Para substituição de equipamento na rota produtiva deve-se avaliar se a área deste em contato com o produto é maior do que a do equipamento que este substituirá. Se a área for maior, impactará no limite de resíduo aceitável, reduzindo-o. Todo raciocínio utilizado anteriormente, portanto, deve ser realizado. Caso sua área seja menor não haverá impacto sobre o limite, já que com uma área menor alcança-se um limite maior. Na validação inicial, contudo, já foi provado que para um limite de resíduo menor o procedimento de limpeza é eficiente. No entanto há sempre a certeza de que pelo menos uma validação deve ser realizada para este equipamento que substituirá um outro, já que seus pontos críticos serão diferentes, e devem ser amostrados e confrontados com os limites a fim de validar o procedimento de limpeza do equipamento que será substituído na rota.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou uma sistematização para execução da validação de limpeza de rota produtiva de sólidos hormonais, atendendo a todos os requisitos legais da ANVISA. Os procedimentos de limpeza avaliados garantem segurança ao paciente que receberá produto proveniente dessa rota fabril. Desta forma se obtém um resultado efetivo em uso prático, podendo a sistematização ser usada em outras rotas de fabricação, desde que os passos propostos sejam seguidos ou que tenham alguma justificativa lógica para melhoria.

A lista de checagem de itens que devem ser atendidos em um procedimento de limpeza se apresenta de forma simples, buscando atender neste momento somente a requisitos dispostos no guia para validação de limpeza da ANVISA (2006). No entanto, há necessidade de inclusão de novos itens a fim de melhor atender a demandas intrínsecas e padrões de qualidade internos de cada instituição.

Foram analisadas estratégias descritas na literatura para determinação do pior caso. Neste trabalho utilizou-se a solubilidade e toxicidade dos ativos para padronização do critério de avaliação, diferentemente do descrito na literatura que pondera além destes outros dois fatores empíricos.

A toxicidade do ativo seria mais bem ponderada pelo valor de NOAEL e não pelo índice de DL_{50} , amplamente usado por outros autores. Contudo, devido à impossibilidade de obtenção dos valores de NOAEL, a toxicidade foi avaliada pelo valor de DL_{50} .

O cálculo utilizado para determinação de resíduo aceitável do ativo contaminante pode parecer um pouco obscuro inicialmente, mas possui toda lógica quando aplicado a análise de contaminação cruzada, tornando o processo simples. Para facilitar o entendimento do cálculo cada componente da fórmula foi elucidado isoladamente.

A metodologia analítica para detecção de resíduo de ativo foi validada e sistematicamente desafiada a fim de garantir que o limite de quantificação seja menor que o limite de resíduo aceitável na superfície de um equipamento após uma limpeza. A metodologia pode ser usada com confiança para esta validação de limpeza.

Os parâmetros para o ensaio de recuperação de ativo foram determinados e se demonstraram eficientes. Este é um ponto primordial para correta execução da validação de limpeza, já que o método para recuperar o ativo testado no laboratório deve ser repetido invariavelmente na superfície do equipamento para garantir uma homogeneidade na forma de amostragem.

O acompanhamento do procedimento de limpeza, a inspeção visual, amostragem e análise das amostras após a limpeza foram realizados três vezes e obtiveram desempenho conforme. Durante a execução destas etapas foi realizado um ajuste que não interferiria na conformidade da validação de limpeza, mas por outro lado, diminuiu um risco potencial de contaminação cruzada.

Realizou-se a análise de impacto da inclusão de novo produto ou inclusão/substituição de equipamento na rota de produção. Cabe ressaltar que esta análise é de suma importância para uma validação de Limpeza, afinal pequenas mudanças de produto e/ou equipamento podem tornar uma validação realizada anteriormente sem efeito. Para introdução de um novo produto deve haver total coesão entre o Desenvolvimento de novos produtos, a Produção e o Sistema da qualidade a fim de decidir como esta inclusão será feita. Tal cuidado minimizaria um possível retrabalho de validação.

A validação de limpeza abrange um universo muito maior que somente os resíduos de ativos. Esta deve ser aplicada também a resíduos de detergentes e desinfetantes e a microrganismos em geral. No entanto, foi priorizado o resíduo de ativos, já que estes levariam mais riscos a população por se tratarem de sólidos orais hormonais. No caso de produtos injetáveis, certamente a validação de limpeza microbiológica seria tão importante quanto, ou até mesmo mais importante. Logo, estes outros aspectos da validação de limpeza poderão ser desenvolvidos em trabalhos futuros.

Os resultados obtidos neste trabalho podem servir de referencial teórico para boas práticas em validação nas indústrias brasileiras, garantindo desta forma produtos farmacêuticos seguros para a população.

REFERÊNCIAS

AGALLOCO, J. Points to consider in the validation of equipment cleaning procedures. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 163-168, 1992.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 134 de 13 de julho de 2001. Determinar a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 set. 2001. Seção 1.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2 jun. 2003. Seção 1.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 210 de 14 de agosto de 2003. Determinar a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 ago. 2003. Seção 1.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de assuntos relacionados a Garantia da Qualidade de 31 de outubro de 2006. Guias relacionados a Garantia de Qualidade com o objetivo de orientar o Setor Regulado sobre o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação, bem como todos os inspetores do Setor Oficial quanto à verificação do cumprimento das mesmas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/> Acesso em: 27 de maio de 2011

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Estabelecer os requisitos mínimos a serem seguidos na fabricação de medicamentos para padronizar a verificação do cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPF) de uso humano durante as inspeções sanitárias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 abr. 2010. Seção 1.

ALENCAR, J. R. B.; RAMOS, S. V. V.; MACHADO, L. B.; OLIVEIRA, A. T. C.; MONTEIRO, D. B.; MEDEIROS, F. P. M.; NETO, P. J. R. Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 1, p. 1-8, jan./mar., 2004

ALENCAR, J. R. B.; LIMA, L. G.; RAMOS, S. V. V.; OLIVEIRA, A. T. C.; MOURA, F. N.; TERRANI, J. O. Validação de limpeza de equipamentos de formas farmacêuticas sólidas: estudo de caso de mebendazol comprimidos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.87, n.2, p. 35-41, 2006a.

ALENCAR, J. R. B.; JIMENEZ, R. C. C.; SANTOS, R.; RAMOS, S. V. V.; OLIVEIRA, M. A. O.; OLIVEIRA, A. T. C.; LIMA, L. G.; ROLIM NETO, P. J. Validação de Limpeza de Equipamentos Multipropósitos para Formas Farmacêuticas Líquidas: Caso da Zidovudina Xarope. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, n. 1, p. 35-42, 2006b.

ALENCAR, J. R.B.; CLEMENTINO, M. R. A.; ROLIM NETO, P. J. Validação de Limpeza de Equipamentos numa Indústria de Medicamentos: Estratégia para Escolha do Pior Caso. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 1, p. 13-18, 2006

ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F.; ROLIM-NETO, P, J.; SOARES, M. F. L. R.; SOBRINHO SOARES, J. L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no uv-vis. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.

ARAÚJO, E. B.; LAVINAS, T; COLTURATO, MT; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, jan./mar., 2008.

AKLA, M. A.; AHMEDB, M. A.; RAMADANA, A. Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 247-252, 2011.

BOTET, J. **Boas práticas em instalações e projetos farmacêuticos**. 1ª ed. São Paulo: RCN editora, 2006.

BRANDÃO, A. C. C. Boas práticas de Fabricação. 2009. Disponível em: <http://www.boaspraticasfarmaceuticas.com.br/> Acesso em: 27 de maio de 2011

BRASIL. Constituição Federal, de 05 de outubro de 1988. Constitui a República Federativa do Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 out. 1988. Seção 1.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 27 jan. 1999. Seção 1.

CASARETT, L. J.; KLAASSEN, C. D. **Toxicology: the basic science of poisons**. 7ª ed. São Paulo: Editora Mc Graw Hill Medical. 2007.

CARDOSO, O. M. C.; SILVA, T. J. P.; SANTOS, W. L. M.; PESQUERO, J. L. Ocorrência de resíduos de dietilestilbestrol e zeranól em fígado de bovinos abatidos no Brasil. **Ciência Tecnologia Alimentar**, v.19, n.3, p. 305-310, 1999.

COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. Photocatalytic Degradation of 17 β -Oestradiol, Oestriol and 17 α -Ethinylloestradiol in Water Monitored Using Fluorescence Spectroscopy. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 55, p. 23-30, 2005.

COUTINHO, R. C.; BARBOSA, E. T.; SENA, M. M.; PÉREZ, C. N. Determinação simultânea de resíduos de sulfametoxazol e trimetoprima em superfícies de equipamentos de produção. **Química.Nova**, v.32, n.8, p. 2214-2217, 2009.

DHOKA, M. V.; VAIDYA, P. D.; PANDE, A. V.; ARORA, A. S. Development and Validation of Analytical Method for Estimation of Cefixime in Swab Samples. **International Journal of Chem Tech Research**, v. .2, n. 4, p. 1918-1923, 2010.

EDUARDO, M. B. P.; MIRANDA, I. C. S. M. **Saúde & Cidadania – Vigilância Sanitária**. 1ª ed. São Paulo: Instituto para o Desenvolvimento da Saúde – IDS/ Núcleo de Assistência Médico-Hospitalar - NAMH/FSP /Banco Itaú, 1998.

FAO/WHO - Expert Committee on Food Aditives. **Evaluation of certain veterinary drug residues in food**. Geneva: World Health Organization, 1988. 41p. Technical Report Series, 763

FENG, X., DING, S., TU, J., WU, F., DENG, N. Degradation of Estrone in Aqueous Solution by Photo-Fenton System. **Science of the Total Environment**, v. 345, p. 229–237, 2005.

FEKETE, S.; FEKETE, J.; GANZLER, K. Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation area. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p. 833-838, 2009.

FIOCCHI, C. C.; MIGUEL, P. A. C. Um estudo de caso de implementação das boas práticas de fabricação em uma empresa de médio porte do setor farmacêutico – dificuldades e recomendações. **GEPROS**, v.1, n. 2, p. 163-182, abr. 2006.

FLOREZ, J. **Farmacología humana**. 3 ed. Barcelona: Masson, 1997

GALLAGHER, J. C.; BAYLINK, D. J.; FREEMAN, R.; McCLUNG, M. Prevention of bone loss with tibolone in postmenopausal women: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-finding studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4717-4726, 2001.

GOMES, M. L. P. C.; SOUZA, S. V. C. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilínicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 972-977, 2010.

GOMES, R. L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Steroid Estrogen Determination in Sediment and Sewage Sludge: a Critique of Sample Preparation and Chromatographic/Mass Spectrometry Considerations, Incorporating a Case Study in Method Development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, 2004.

HANIFI-MOGHADDAM, P.; GIELEN, S. C. J. P.; KLOOSTERBOER, H. J.; DE GOOYER, M. E.; SIJBERS, A. M.; VAN GOOL, A. J.; SMID, M.; MOORHOUSE, M.; VAN WIJK, F. H.; BURGER, C. W.; BLOK, L. J. Molecular portrait of the progestagenic and estrogenic actions of tibolone: behavior of cellular networks in

response to tibolone. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 973-983, 2005.

HAMMAR, M. L.; VAN DE WEIJER, P.; FRANKE, H. R.; PORNEL, B.; VON MAUW, E. M. J.; NIJLAND, E. A. Tibolone and low-dose continuous combined hormone treatment: vaginal bleeding pattern, efficacy and tolerability. **Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 114, n. 12, p. 1522-1529, 2007

JAIN, S.; HEISERAB, A.; VENTER, A. R. Spray desorption collection: an alternative to swabbing for pharmaceutical cleaning validation. **Analyst**, v.136, p.1298–1301, 2011.

JUKES, T.H. **Estrogens in beefsteaks**. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.229, p. 1920-1921, 1974.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION – ICH. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals – S7A. Geneva: 2000. Disponível em: < <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA504.pdf> >. Acesso em: 25 nov. 2007.

LA ROCA, M. F.; SOBRINHO SOARES, J. L.; NUNES, L. C. C.; NETO ROLIM, P. J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n.4, p. 177-180, 2007.

LAI, K. M.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. The Effects of Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Relation to their Environmental Occurrence. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 113-132, 2002.

LAPPONI, J. C. **Estatística usando Excel**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEWEN, N.; NUGENT, D. The use of inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the determination of lithium in cleaning validation swabs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, p. 652-655, 2010.

MAZONAKIS, N. E.; KARATHANASSI, P. H.; PANAGIOTOPOULOS, D. P.; HAMOSFAKIDI, P. G.; MELISSOS, D. A. Cleaning validation in the toiletries industry. **Analytica Chimica Acta**, v. 467, p. 261-266, 2002.

MERCK index. 13 ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., 2001.

MILENOVIĆ, D. M.; TODOROVIĆ, Z. B. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Analysis of Nimesulide Residues on Manufacturing Equipment Surfaces. **Acta Chromatographica**, v.21, n.4, p.603-618, 2009.

MOORE, D. S. **A estatística básica e sua prática**. 3. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos. **Química**, v. 88, p. 65-71, 2003.

PERES, C.P. Validação dos processos de limpeza na indústria farmacêutica. **Fármacos&Medicamentos**, v. 3, n. 13, p. 20-23, 2001

PROSEK, M.; KRIZMAN, M.; KOVAC, M. Evaluation of a rinsing-based cleaning process for pipes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.38, p. 508,2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

ROE, F.J.C. Anabolic agents: evaluation of hormono-mimetic agents for mutagenic and carcinogenicpotential. In: DSA (Bureau European d'Information pour le Developpement de la SameAnimale).**Safety and Quality in Food**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 125-141.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Estrogenic Activity of Surfactants and Some of their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen.**Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.

WARING, R. H., HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: A human risk?, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, p. 2–9, 2005.

WEBER, W. W.; DUFFY, M. P.; THOM, J. V.; GROSSMAN, M.; SAX, J.; CHAN, J. J. Drug contamination with diethylstilbestrol: Outbreak of precocious puberty due to contaminated acid hydrazide (INH). **New England Journal of Medicine**, n. 268, p. 411,1963.

WESTMAN, L.; KARISSON, G. Methods for detecting residues of cleaning agents during cleaning validation. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v 54, n.5, p. 365-372, 2000.

WISS, J.; SCHMUCK, J. Cleaning validation using thermogravimetry. **Journal of Thermal Analytical Calorimetry**, v. 104, p. 315-321, 2011.

SAJID, S. S.; ARAYNEA, S.; SULTANAB, N. Validation of cleaning of pharmaceutical manufacturing equipment,illustrated by determination of cephradine residues. **Analytical Methods**, v.2; p. 397-401, 2010.

SOUSA, M. A.; GONÇALVES, C.; CUNHA, E.; HAJŠLOVÁ, J.; ALPENDURADA, M. F. Cleanup strategies and advantages in the determinationof several therapeutic classes of pharmaceuticalsin wastewater samples by SPE–LC–MS/MS.**Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 807-822, 2011.

TANAKA, H.; YAKOU, Y.; TAKAHASHI, A.; HIGASHITANI, T.; KOMORI, K. Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment.**Water Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 125–132, 2001.

THE UNITED States Pharmacopeia 34. National Formulary 29: 2011. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2010. 3 v.