



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Barbara Christina Barbosa Bago

**Validação do processo de limpeza de tanque multiuso
utilizado para formulação de vacinas**

Rio de Janeiro
2010

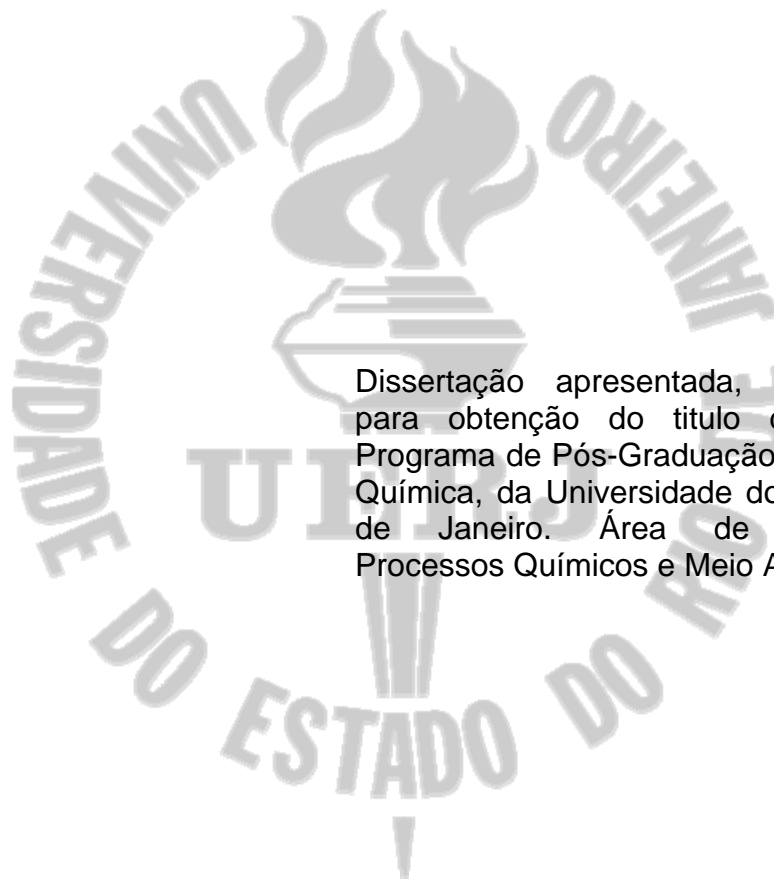
Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Barbara Christina Barbosa Bago

Validação do processo de limpeza de tanque multiuso utilizado para formulação de vacinas



Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos e Meio Ambiente.

Orientadores: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Prof. Dr. Aderval Severino Luna

Rio de Janeiro
2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

B148	<p>Bago, Barbara Christina Barbosa. Validação do processo de limpeza de tanque multiuso utilizado para formulação de vacinas. / Barbara Christina Barbosa Bago. - 2010. 117 f</p> <p>Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa. Orientador: Aderval Severino Luna. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.</p> <p>1. Vacinas - Teses. 2. Validação de limpeza – Teses. 3. Meningite - Teses. 4. Haemophilus influenza – Teses. I. Costa, Antonio Carlos Augusto da. II. Luna, Aderval Severino. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.</p> <p>CDU614.37</p>
------	--

Autorizo, apenas para fins acadêmicos ou científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Barbara Christina Barbosa Bago

**Validação do processo de limpeza de tanque multiuso utilizado para
formulação de vacinas**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Processos Químicos e Meio Ambiente.

Aprovado em _____

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

Prof. Dr. Aderval Severino Luna (Orientador)
Instituto de Química da UERJ

D.Sc. Rodrigo Coelho Ventura Pinto
Bio-Manguinhos / Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a Cristiane Assumpção Henriques
Instituto de Química da UERJ

Prof^a. Dr^a. Márcia Monteiro Machado Gonçalves
Instituto de Química da UERJ

Rio de Janeiro
2010

...O melhor disso tudo foi descobrir que pude ir mais longe, depois de pensar que não podia mais....e, que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

... e jamais devemos deixar que nossas dúvidas traidoras nos façam perder o bem que poderíamos conquistar e fazer se não fosse o medo de tentar.....

(adaptado da obra “beijos não são contratos” de William Shakeaspeare)

AGRADECIMENTOS

- À Deus por sempre estar ao meu lado, me fornecendo uma enorme força e energia para lutar ultrapassando as dificuldades pessoais e profissionais.
- Aos meus pais Lúcia e Anselmo, pelo incentivo constante nos estudos, pela ajuda na superação dos momentos difíceis e por compreender minha grande ausência durante a dedicação ao mestrado.
- Ao meu irmão Rodrigo por toda a ajuda nos estudos que serviram de base para que alcançasse este objetivo maior.
- Ao meu marido Leonardo pelos momentos de alegria nas horas de tensão, por sempre me mostrar que a vida tem um enorme valor e que cada momento deve ser vivido intensamente. E que venham os filhos!
- Aos meus orientadores Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa e Prof. Dr. Aderval Luna pela paciência e compreensão de que não é simples conciliar o mestrado com as atividades profissionais. Todas as críticas, ajudas e sugestões foram muito importantes para a conclusão desta dissertação.
- À amiga, afilhada e “braço direito” Leidiane Dolavale por toda contribuição e apoio nas atividades profissionais e no desenvolvimento deste trabalho. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido. A próxima será você e tenho certeza que você conseguirá conquistar seu objetivo. Estarei sempre contigo.
- Ao meu chefe e amigo Fabio Henrique Gonzalez por todos os ensinamentos sobre validação, qualidade, etc. Com certeza você foi a principal pessoa que contribuiu para o meu desenvolvimento profissional e uma das principais para o meu crescimento pessoal. Como sempre digo: “Fica calmo que está tudo sob controle”. Obrigada por tudo!
- À minha querida chefe Rita de Cássia Benedetti por todo incentivo e ajuda para cursar o mestrado junto com as minhas atividades profissionais.
- À toda equipe de Validação de Processos por sempre compreender as minhas ausências durante o curso de mestrado. Vocês mostraram competência e

responsabilidade na realização das atividades de validação. Com certeza a ajuda de vocês foi muito importante para finalização desta dissertação.

➤ Aos meus amigos especiais Renata, Daniel, Silvia e Mônica pela amizade e pela presença de irmãos em muitos momentos todos esses anos. Obrigada por dividir as alegrias e as tristezas!

➤ A equipe de formulação da DIFOR pela limpeza realizada nos tanques e por sempre se mostrarem competentes para realização das suas atividades profissionais.

➤ Aos membros da banca por aceitarem o convite.

RESUMO

A validação de limpeza de equipamentos é requisito regulatório para assegurar que os procedimentos de limpeza removem os resíduos de produto e agente de limpeza existentes até um nível de aceitação pré-determinado, garantindo que não haja contaminação cruzada. A metodologia analítica escolhida para monitorar a ocorrência de contaminação cruzada foi a determinação de carbono orgânico total (TOC) por ser uma técnica não específica permitindo assim quantificar os resíduos antes e após o procedimento de limpeza.

Para execução desta validação foi selecionado o pior caso em relação ao contaminante. A vacina Hib foi escolhida como pior caso, pois possui maior aderência ao aço inox 316L, apresentando uma menor percentagem de recuperação, quando comparada à vacina Meningite A e C, sendo respectivamente de 93,0% e 98,4% para o tempo de extração de 30 segundos e 67,8% e 72,6% para o tempo de extração de 10 segundos.

O resíduo aceitável de produto em água de rinsagem foi de 0,0007 µg/mL de polissacarídeo (0,49 µg/mL de TOC) e em swab foi de 0,006 µg/mL de polissacarídeo (3,49 µg/mL de TOC). As amostras retiradas para determinação de resíduo de produto foram analisadas e corrigidas pelo fator de recuperação deste resíduo para amostras de água de rinsagem que é de 98,5% e para amostras em swab que é de 98,4%. Já o resíduo aceitável para agente de limpeza (NaOH) foi de 3,5 µg/mL que fornece um pH de 9,94, porém não existem evidências que a concentração calculada de resíduo de NaOH não interferirá quimicamente ao entrar em contato com a vacina. Assim o critério adotado foi o mesmo da água para injetáveis, segundo USP que é pH entre 5 e 7. As amostras retiradas para determinação de resíduo de agente de limpeza não foram corrigidas pelo fator de recuperação uma vez que o critério utilizado é muito mais crítico que o calculado.

Todas as análises realizadas apresentaram resultados dentro dos parâmetros aceitáveis permitindo a conclusão de que o procedimento de limpeza para tanque de aço inox 316L é eficiente removendo os resíduos até níveis aceitáveis, evitando assim uma contaminação cruzada.

PALAVRAS-CHAVE: validação de limpeza; multiuso; vacina; Hib; Meningite A e C

ABSTRACT

The cleaning validation of equipments is a regulatory requirement to ensure that the procedure to remove residues of the product and the cleaning agent to a level of acceptance, ensuring no cross contamination. The analytical methodology chose to monitor the occurrence of cross-contamination was the determination of total organic carbon (TOC) as it is a non-specific technique allowing to quantify the residues before and after the cleaning procedure.

For the execution of the validation it was selected the worst case regarding contaminant. The Hib vaccine was chosen as the worst case because it has greater adherence to stainless steel 316L, with a lower percentage of recovery when compared to vaccine meningitis A and C, being respectively 93.0% and 98.4% for the extraction time of 30 seconds and 67.8% and 72.6% for the extraction time of 10 seconds.

The considered acceptable product residue in the rinsing water was 0.0007 mg/mL of polysaccharide (0.48 mg/mL of TOC) and in swab it was 0.006 mg/mL of polysaccharide (3.49 mg/mL of TOC). Samples took for determination of residual product has been analyzed and corrected by the recovery factor for this waste water samples by rinsing which is 98.5% and for samples in swab that is 98.4%. The acceptable residue for the cleaning agent (NaOH) was 3.512 mg/mL which provides a pH of 9.94, but there is no evidence that the concentration of residual NaOH does not chemically interfere in contact with the vaccine. Thus, the criterion used was the same as for water for injection, according to USP, that is between pH 5 and 7. Samples took for the determination of residual cleaning agent were not corrected by the recovery factor because the criterion used is much more critical than that calculated.

All the analysis results were within the acceptable parameters allowing to conclude that the cleaning procedure for 316L stainless steel tank was effective, removing the waste to acceptable levels, thus, preventing from cross-contamination.

KEYWORDS: cleaning validation; multipurpose; vaccine, Hib, meningitis A and C

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CFR – “Code of Federal Regulation”

DI – Documento Interno

EU – “Endotoxin units” (unidades de endotoxina)

EUA – Estados Unidos da América

FDA – “Food and Drug Administration”

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b

IC – “Inorganic carbon” (carbono inorgânico)

ICH – “International Conference for Harmonization”

ISO – “International Standardization Organization”

LAL – Lisado de Amebócitos do *Limulus polyphemus*

NBR – Norma Brasileira

OMS – Organização Mundial de Saúde

PNI – Programa Nacional de Imunizações

PRRP – Poliribosil-ribitol fosfato

PW – “Purified Water” (água purificada)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – Rotações por Minuto

TC – “Total carbon” (carbono total)

TOC – “Total organic carbon” (carbono orgânico total)

USP – “United States Pharmacopeia”

WFI – “Water for Injection” (água para injeção)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Validação de processo. (Fonte: Santos, 2010)	28
Figura 2 - Visão frontal do tanque utilizado na validação	41
Figura 3 - Analisador de TOC	42
Figura 4 - Frascos e <i>swabs</i> específicos para validação de limpeza	44
Figura 5 - Esquema de diluição para amostras de recuperação	47
Figura 6 - Esquema de diluição do padrão	48
Figura 7 - Resultado positivo para determinação de endotoxina.	49
Figura 8 - Determinação de TOC - técnica não-específica (Fonte: JENKINS, 1996)	51
Figura 9 - "Coupon" de aço inox 316L	52
Figura 10 - Modelo para limpeza do "coupon"	53
Figura 11 - Modelo para teste de solubilidade e recuperação por água de rinsagem	54
Figura 12 - Posicionamento do "coupon"	54
Figura 13 – Quadrantes em aço inox utilizados para teste de recuperação por <i>swab</i>	59
Figura 14 - Amostragem com <i>swab</i>	60
Figura 15 - Pontos de amostragem do tanque utilizando <i>swab</i>	65
Figura 16 - Gráfico de concentração de polissacarídeo versus medida de TOC	86
Figura 17 - Resíduo de produto por <i>swab</i> - após o procedimento de limpeza	94
Figura 18 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após o procedimento de limpeza	94
Figura 19 - Resíduo de agente de limpeza - após o procedimento de limpeza	95
Figura 20 - Resíduo de produto por <i>swab</i> - após "holding time" do tanque limpo	98
Figura 21 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após "holding time" do tanque limpo	98
Figura 22 - Resíduo de agente de limpeza - após "holding time" do tanque limpo	99
Figura 23 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após esterilização	101
Figura 24 - Resíduo de agente de limpeza - após esterilização	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições para qualidade.	23
Tabela 2 - Critérios de aceitação	71
Tabela 3 - Extração por 30 segundos da Vacina Hib	72
Tabela 4 - Extração por 10 segundos da Vacina Hib	73
Tabela 5 - Extração por 30 segundos da Vacina Meningite A e C	74
Tabela 6 - Extração por 10 segundos da Vacina Meningite A e C	75
Tabela 7 - Resumo dos resultados das recuperações	76
Tabela 8 - Resumo dos critérios calculados	82
Tabela 9 - Resultados para Vacina Hib lote 096VZF002Z	83
Tabela 10 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF007Z	83
Tabela 11 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF008Z	84
Tabela 12 - Resumo dos resultados	85
Tabela 13 - Conversão do critério calculado	87
Tabela 14 - Resultados de recuperação de produto por <i>swab</i>	88
Tabela 15 - Resultados de recuperação de produto por água de rinsagem	88
Tabela 16 - Resultados de recuperação de agente de limpeza por água de rinsagem	89
Tabela 17 - Resultado da análise antes do procedimento de limpeza	91
Tabela 18 - Resultados das análises após o procedimento de limpeza	92
Tabela 19 - Correção dos resultados obtidos após o procedimento de limpeza	93
Tabela 20 - Resultados das análises após o “holding time” do tanque limpo	96
Tabela 21 - Correção dos resultados obtidos após o “holding time” do tanque limpo	97
Tabela 22 - Resultados das análises após a esterilização do tanque limpo	100
Tabela 23 - Correção dos resultados obtidos após a esterilização do tanque limpo	100

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	14
1 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	17
1.1 As vacinas produzidas em Bio-Manguinhos.....	17
1.1.1 <u>Vacina de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b (Hib)</u>	19
1.1.2 <u>Vacina Meningite A e C</u>	21
1.2 Qualidade e Validação.....	22
1.2.1 <u>Garantia da qualidade na indústria farmacêutica</u>	23
1.2.2 <u>Validação</u>	27
1.2.3 <u>Validação do processo de limpeza</u>	29
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 Equipamentos Principais.....	41
2.1.1 <u>Tanque de formulação</u>	41
2.1.2 <u>Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)</u>	42
2.2 Métodos	44
2.2.1 <u>Determinação de Carbono Orgânico Total (TOC)</u>	44
2.2.2 <u>Determinação de condutividade</u>	45
2.2.3 <u>Determinação de pH</u>	45
2.2.4 <u>Determinação de endotoxina</u>	45
2.2.4.1 Preparo do lisado de amebócitos (LAL).....	46
2.2.4.2 Amostras da validação	46
2.2.4.3 Controle positivo	47
2.2.4.4 Controle negativo.....	49
2.2.4.5 Avaliação dos resultados.....	49
2.3 Procedimento para validação	50
2.3.1 <u>Limpeza do tanque</u>	50
2.3.2 <u>Metodologia analítica escolhida para determinação de resíduo de produto</u>	50

2.3.3 <u>Seleção do produto contaminante “pior caso”</u>	51
2.3.3.1 <u>Limpeza do material para o teste de avaliação do produto “pior caso”</u>	52
2.3.3.2 <u>Avaliação da solubilidade dos produtos</u>	53
2.3.3.3 <u>Controle positivo</u>	55
2.3.3.4 <u>Controle negativo</u>	55
2.3.3.5 <u>Avaliação dos resultados</u>	55
2.3.4 <u>Validação do processo de limpeza de tanque multiuso</u>	56
2.3.4.1 <u>Cálculo da área compartilhada pelos produtos</u>	56
2.3.4.2 <u>Critério de aceitação para o resíduo de produto e de agente de limpeza</u>	56
2.3.4.3 <u>Correlação da concentração de polissacarídeo e medida de TOC</u>	57
2.3.4.4 <u>Ensaio de recuperação</u>	58
2.3.4.5 <u>Definição do “holding time”</u>	64
2.3.4.6 <u>Definição dos pontos de amostragem</u>	65
2.3.4.7 <u>Impregnação do tanque com endotoxina</u>	65
2.3.4.8 <u>Amostragens para avaliação do procedimento de limpeza</u>	67
2.3.4.9 <u>Critérios de aceitação</u>	70
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Seleção do produto contaminante “pior caso”:	72
3.1.1 <u>Avaliação da solubilidade da Vacina Hib</u>	72
3.1.2 <u>Avaliação da solubilidade da Vacina Meningite A e C</u>	74
3.2 Validação do processo de limpeza de tanque multiuso	76
3.2.1 <u>Cálculo da área compartilhada pelos produtos</u>	76
3.2.2 <u>Critério de aceitação para o resíduo de produto e de agente de limpeza</u> .	77
3.2.3 <u>Correlação da concentração de polissacarídeo e medida de TOC</u>	82
3.2.4 <u>Ensaio de recuperação</u>	87
3.2.4.1 <u>Recuperação de produto (vacina Hib) através de amostragem por swab e água de rinsagem</u>	87
3.2.4.2 <u>Recuperação de agente de limpeza (NaOH) através de amostragem por água de rinsagem</u>	89
3.2.5 <u>Avaliação da limpeza para validação</u>	90

4 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	103
4.1 Conclusões	103
4.2 Sugestões.....	104
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO A - TÉCNICA PARA EXTRAÇÃO POR SWAB.....	110
ANEXO B - RESUMO DAS AMOSTRAGENS REALIZADAS DURANTE UMA CORRIDA DE VALIDAÇÃO	113
ANEXO C – CÁLCULO DA ÁREA COMPARTILHADA PELOS PRODUTOS	114
ANEXO D – TRABALHO PUBLICADO NO XVIII COBEQ.....	117
(CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA).....	117

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A competitividade tecnológica é fundamental para a sobrevivência de qualquer empresa. É importante demonstrar que seus produtos estão dentro dos padrões de qualidade nacionais e internacionais, podendo assim estabelecer alianças tecnológicas para o desenvolvimento e incorporação de novos produtos importantes para as ações de saúde pública.

Nos últimos anos houve um grande avanço na implantação de programas de qualidade no parque industrial brasileiro. Produzir com mais qualidade e menor custo são palavras de ordem para sobreviver e enfrentar a concorrência.

É importante que os produtos sejam produzidos corretamente desde a primeira vez, reduzindo a variabilidade das características da qualidade com interesse para o processo produtivo, de modo a aumentar a confiabilidade do produto final. Essas ações são fundamentais para alcançar a estabilidade e melhorar a capacidade em qualquer processo de produção.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), qualidade e produtividade são fatores essenciais para a competitividade, que devem ser preocupação constante dos setores produtivos. A qualidade observou diferentes abordagens ao longo do tempo, sendo até hoje fator chave de sucesso. O objetivo de um sistema da qualidade é dar suporte para que os produtos estejam adequados ao seu uso indicado.

A validação é uma das ferramentas para busca da qualidade total, pois sua aplicação garante a confiabilidade das utilidades, instalações, dos equipamentos e, principalmente, dos processos de produção, seja do setor farmacêutico ou em qualquer outra área.

Define-se como validação o ato de demonstrar e documentar que um processo funciona de forma efetiva. A validação de um processo consiste em garantir e fornecer evidências documentais de que o processo é capaz de produzir de forma consistente um produto final de acordo com a qualidade exigida (Organização Mundial de Saúde - OMS, 2006).

A validação garante a robustez dos processos produtivos e desta forma diminui os riscos de desvio de qualidade e os riscos da não conformidade aos requisitos estabelecidos.

A validação de limpeza de equipamentos é requisito imprescindível para garantir que os produtos tenham a eficácia e segurança esperada. Trata-se de um processo utilizado para verificar que os procedimentos de limpeza de equipamentos, efetivamente removam os resíduos existentes até um critério de aceitação definido, garantindo que, após a limpeza dos equipamentos, o próximo produto fabricado não contenha nenhuma substância do produto e/ou agente de limpeza anterior, isto é, que não haja contaminação cruzada.

As agências regulatórias, como OMS e ANVISA, exigem que as indústrias realizem os diferentes tipos de validações, porém suas normas e requisitos não estão claros em como proceder para realizar uma validação específica. Existem poucos guias explicativos para este assunto devido a grande variedade de processos produtivos, fazendo com que cada um seja validado através de diferentes procedimentos e análise de dados. Além disso, há a falta de uma padronização de linguagem do setor de validação, o que cria uma barreira para o entendimento total dos termos (ATHAIDE, 2000).

O objetivo principal deste trabalho foi estudar todos os procedimentos e técnicas requeridas visando aplicar uma metodologia para validação de tanque multiuso utilizado na formulação de vacinas de forma a garantir que os mesmos possam ser utilizados com segurança sem que ocorra contaminação cruzada. Neste caso específico podem ser formuladas as vacinas Hib e Meningite A e C em um mesmo tanque.

Sendo assim, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- ❖ Selecionar, através da avaliação de solubilidade, a vacina considerada pior caso para ser utilizada como referência na validação, pois se o procedimento de limpeza realizado for eficiente para remoção da vacina de menor solubilidade também será capaz de remover a outra vacina.

- ❖ Definir: pontos e métodos de amostragem; área compartilhada pelos produtos e critérios de aceitação a serem utilizados na validação deste processo de limpeza.

- ❖ Realizar, através de ensaios em laboratório, os estudos de recuperação do produto selecionado como pior caso por *swab* e deste mesmo produto e agente de limpeza por água de rinsagem.

- ❖ Validar efetivamente o processo de limpeza do tanque multiuso utilizado para formulação de vacinas.

1 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 As vacinas produzidas em Bio-Manguinhos

As vacinas foram criadas no século passado, a partir do estudo de Pasteur, que criou as primeiras vacinas atenuadas virais e as bacterianas. A primeira vacina foi descoberta em 1796 por Edward Jenner, que desenvolveu a vacina contra a varíola (DENYER; HODGES; GORMAN, 2004).

Segundo Roitt, Brostoff e Male (1994), o princípio da vacinação está baseado em dois elementos-chave da resposta imune adaptativa, mais especificamente memória e especificidade. As células de memória permitem ao sistema imune elaborar uma resposta de maior intensidade a partir de um segundo encontro com o antígeno. Esta resposta secundária é mais rápida e eficiente do que a resposta primária. O objetivo no desenvolvimento da vacina é alterar o patógeno ou suas toxinas de tal forma que eles se tornem inócuos sem perder a antigenicidade. Isto é possível porque os anticorpos e células T citotóxicas reconhecem determinadas partes dos antígenos, os epítomos, e não o organismo ou a toxina como um todo.

As vacinas podem ser produzidas a partir de diferentes componentes. Esta diferenciação permite sua classificação. Denyer, Hodges e Gorman (2004) classificam as vacinas da seguinte forma:

- ❖ Micro-organismos inativados

Compostas de micro-organismos inativados, o que significa que estes não mais se encontram vivos, logo incapazes de multiplicarem-se. A resposta imune à vacina inativada é principalmente humoral, com pouca ou nenhuma imunidade celular. Exemplos: Hepatite A, Hepatite B, Raiva e Pneumococo.

- ❖ Micro-organismos vivos atenuados

Compostas de micro-organismos vivos, atenuados em relação a sua patogenicidade, porém mantendo sua antigenicidade. Essa resposta imune ao micro-organismo atenuado é idêntica à produzida pela infecção natural, pois o sistema imune é incapaz de diferenciar entre uma infecção pelo micro-organismo vacinal e o micro-organismo selvagem. A multiplicação do micro-organismo vacinal provoca infecção sem produzir a doença. Exemplos: Sarampo, Caxumba, Rubéola, Febre Amarela.

❖ Proteínas ou açúcares extraídos de bactérias ou vírus

Toxóides usados para imunização ativa são toxinas bacterianas modificadas de modo a se tornarem não-tóxicas (LUZ; SOUZA; CICONELLI, 2007). Exemplo: As vacinas dos sorogrupos A, C, Y e W135 da bactéria *Neisseria meningitidis*, um dos agentes microbianos causadores de meningite, são constituídas pelo polissacarídeo capsular que depois de purificado é capaz de induzir a produção de anticorpos sem causar a doença.

❖ DNA

Um desenvolvimento recente, associada a pesquisa em terapia gênica, tem sido o uso de DNA codificando fatores de virulência específicos de patógenos definidos para provocar uma resposta imune.

Resultado de muitos anos de investimento em pesquisa e desenvolvimento científico e tecnológico, as vacinas são seguras e consideradas essenciais para a saúde pública.

As vacinas são usadas para induzir a imunidade ativa. A imunização é definida como a aquisição de proteção imunológica contra uma doença infecciosa. Esta prática tem como objetivo aumentar a resistência de um indivíduo contra infecções.

De acordo com Denyer, Hodges e Gorman (2004) a imunização ativa ocorre quando o próprio sistema imune, ao entrar em contato com uma substância estranha ao organismo, responde produzindo anticorpos e células imunes. Esse tipo de imunidade geralmente dura por vários anos, às vezes, por toda uma vida. Os dois meios de se adquirir imunidade ativa são contraindo uma doença infecciosa e a vacinação.

Existe também a imunização passiva que é obtida pela transferência de anticorpos produzidos por um animal ou outro homem. Esse tipo de imunidade produz uma rápida e eficiente proteção, que, contudo, é temporária, durando em média poucas semanas ou meses. A imunidade passiva natural é o tipo mais comum de imunidade passiva, sendo caracterizada pela passagem de anticorpos da mãe para o feto através da placenta. Essa transferência de anticorpos ocorre nos últimos 2 meses de gestação, de modo a conferir uma boa imunidade à criança durante seu primeiro ano de vida. A imunidade passiva artificial pode ser adquirida sob três formas principais: a imunoglobulina humana combinada, a imunoglobulina humana hiperimune e o soro heterólogo. A transfusão de sangue é uma outra forma de se

adquirir imunidade passiva, já que, virtualmente, todos os tipos de produtos sanguíneos (sangue total, plasma, concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, etc) contêm anticorpos (DENYER; HODGES; GORMAN, 2004).

Em 1991 o governo brasileiro traçou a meta de auto-suficiência em imunobiológicos, pois aliaram os avanços tecnológicos da biologia com a constatação de que a vacina é o instrumento de saúde pública que gera o maior benefício ao menor custo. Esta meta foi a de maior impacto para o quadro epidemiológico nacional (PALMIGIANI, 2005).

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ é o responsável pela produção de vacinas e reativos (kits de diagnóstico de doenças infecto-parasitárias). Bio-Manguinhos é uma unidade técnico-científica da FIOCRUZ que atende a demanda do país, através do Programa Nacional de Imunizações (PNI). Esta unidade também atende à demanda externa através da exportação das vacinas de Febre Amarela e Meningite A e C. O Complexo Tecnológico de Vacinas desta unidade é o maior produtor de imunizantes da América Latina e um dos maiores do mundo.

Maior produtor brasileiro de vacinas, Bio-Manguinhos produz as seguintes vacinas:

- ❖ DTP (Difteria, Tétano, Coqueluche)
- ❖ Hib (*Haemophilus influenzae* do tipo b conjugada)
- ❖ Febre Amarela
- ❖ Polissacarídica meningocócica sorogrupos A e C (Meningite A e C)
- ❖ Poliomielite
- ❖ Tríplice Viral (Sarampo, Rubéola e Caxumba)

Esta dissertação engloba a validação do processo de limpeza do tanque utilizado para a etapa de formulação das vacinas Hib e Meningite A e C. Assim, apenas estas duas vacinas serão comentadas.

1.1.1 Vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib)

Haemophilus influenzae tipo b (Hib) é uma bactéria que atinge principalmente crianças até cinco anos, causando muitas doenças desde infecções comuns (geralmente no nariz e na garganta) até infecções mais sérias como meningite e pneumonia. Outras doenças infecciosas causadas por este patógeno

incluem inflamação na epiglote, osteomielite, infecção generalizada na corrente sanguínea, inflamação do pericárdio, inflamação das articulações e sinusite (OMS, 2000).

A *H. influenzae* coloniza o aparelho respiratório. De acordo com a OMS (2000) a transmissão de *H. influenzae* ocorre principalmente por gotas expelidas de secreções da mucosa nasal de pessoas infectadas, mesmo que estas sejam portadores assintomáticos, sendo neste caso importantes disseminadores da bactéria.

A vacina conjugada Hib protege das infecções graves causadas pelo *H. influenzae* tipo b sendo assim utilizada para imunização ativa. Essa vacina é indicada para bebês a partir de dois meses, e sua administração deve seguir o esquema adotado pelo PNI, que recomenda três doses: com dois, quatro e seis meses de vida (SI-PNI MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Esta vacina é preparada com o polissacarídeo capsular - poliribosil-ribitol fosfato (PRRP) - purificado do *H. influenzae* tipo b, covalentemente ligado à anatoxina tetânica, uma proteína. Sua apresentação é na forma farmacêutica de vacina liofilizada para reconstituição. Cada dose da vacina reconstituída (0,5 mL) contém no mínimo 10 µg de polissacarídeo capsular purificado (PRRP) de *H. influenzae* tipo b (Hib) conjugada com aproximadamente 30 µg de toxóide tetânico (na forma de proteína monomérica tetânica). O polissacarídeo conjugado é o responsável pela imunidade contra Hib (BIO-MANGUINHOS - a, 2010).

A vacina Hib se apresenta na forma conjugada a proteínas que funcionam como carreadores para favorecer a imunogenicidade. A bactéria *H. influenzae* tipo b é revestida com uma cápsula polissacarídica que a torna resistente ao ataque dos leucócitos. A vacina estimula a produção de anticorpos anticapsulares, promovendo uma imunidade ativa contra esta bactéria. O polissacarídeo purificado do *H. influenzae* tipo b estimula predominantemente os linfócitos B a produzirem anticorpos anti-PRRP. Porém, como outros antígenos polissacarídicos, o estímulo por ele produzido induz uma resposta antigênica caracterizada pela fraca imunogenicidade em grupos etários mais susceptíveis, isto é, crianças nos primeiros dois anos de vida, e pela ausência de "efeito reforço", após injeções repetidas (KONEMAN *et al.*, 1997).

A ligação covalente do polissacarídeo capsular purificado com a proteína tetânica proporciona uma estimulação adicional, a estimulação dos linfócitos T,

particularmente importante em crianças pequenas, para garantir uma produção de anticorpos adequada e persistente. A estimulação das células T induz também uma memória imunológica, que garante a resposta de produção de anticorpos frente a futuras doses da vacina conjugada, bem como frente à exposição natural ao *H. influenzae* tipo b, resultando em níveis de anticorpos elevados. Assim, a vacina *H. influenzae* tipo b conjugada é significativamente mais imunogênica que a vacina não conjugada (OMS, 2000).

1.1.2 Vacina Meningite A e C

A meningite é a inflamação das meninges, membranas que envolvem o cérebro. A doença pode ser causada por vários tipos de micro-organismos, entre eles a *Neisseria meningitidis*. Os principais sintomas são: febre alta, dor de cabeça intensa, rigidez de nuca e, algumas vezes, manchas na pele (tipo picada de mosquito). Particularmente em crianças também pode ocorrer náuseas e vômitos. Trata-se de uma doença grave, que envolve o sistema nervoso central e pode levar à morte. Apesar de grave, a meningite bacteriana tem cura desde que diagnosticada rapidamente e tratada com antibiótico apropriado (KONEMAN *et al.*, 1997).

Neisseria meningitidis pode ser transmitida por via oral-oral através de gotículas da tosse, espirro e beijo. A meningite nem sempre é transmitida por indivíduos doentes. Algumas pessoas, geralmente adultas, que abrigam este micro-organismo na garganta podem transmiti-lo, sendo assim portadores assintomáticos. A meningite atinge pessoas de todas as idades, sendo as crianças de 3 meses a 1 ano normalmente as mais afetadas (KONEMAN *et al.*, 1997).

A vacina polissacarídica meningocócica protege contra doença meningocócica, principalmente meningites e meningococemias. Conforme as recomendações do PNI, esta vacina deve ser administrada em dose única (a mesma para adultos e crianças) para imunização ativa de adultos e crianças a partir de 2 anos. Poucos dias depois da aplicação, ocorre a efetiva imunização, que por estimativa se mantém em níveis adequados por, no máximo, três anos. A vacina é recomendada para controle de surtos de doenças meningocócicas através de vacinações em larga escala da população sob risco. Por este motivo, não é encontrada na rotina dos postos de vacinação (BIO-MANGUINHOS - b, 2010).

Esta vacina é produzida a partir de polissacarídeos capsulares de *Neisseria meningitidis*. Esta bactéria, com base em seu polissacarídeo, pode ser classificada

em 13 sorogrupos, sendo os mais importantes: A, B, C, Y e W-135 por causar infecções mais sérias. A prevalência de um ou outro sorotipo está associada à região geográfica. Atualmente existem vacinas monovalentes contra os meningococos A e C, vacinas bivalentes (associando-se A e C) e uma vacina tetravalente, contendo antígenos contra os meningococos A, C, Y e W-135 (KONEMAN *et al.*, 1997).

A vacina polissacarídica meningocócica produzida em Bio-Manguinhos consiste de polissacarídeos capsulares dos sorogrupos A e C de *Neisseria meningitidis*. Sua apresentação é na forma farmacêutica de vacina liofilizada para reconstituição. Cada dose da vacina reconstituída (0,5 mL) contém no mínimo 50 µg de polissacarídeo purificado de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo A e 50 µg de polissacarídeo purificado de *Neisseria meningitidis* do sorogrupo C. Esta vacina não confere proteção contra outras meningites, como as provocadas por *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B e outros sorogrupos não contidos na vacina (BIO-MANGUINHOS - b, 2010).

Após a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), em 1999, o controle interno da produção de imunobiológicos passou por uma série de reformulações, que visaram atender as expectativas da Unidade Bio-Manguinhos, conforme as recomendações do Ministério da Saúde, da ANVISA e também das normalizações de caráter internacional.

1.2 Qualidade e Validação

Nos dias atuais é possível identificar um aumento da competição no ambiente organizacional diretamente relacionado com a intensificação da globalização e internacionalização das economias nacionais. As organizações estão prestando cada vez mais atenção à necessidade de aperfeiçoar suas operações, sistemas de gestão e avaliação de seus resultados visando a estabilidade em um ambiente caracterizado pela busca de maior produtividade e acirramento da concorrência. Desta forma são necessárias mudanças dinâmicas que as auxiliem a conquistar vantagem no mercado sobre os demais competidores.

No contexto da indústria farmacêutica, o aprimoramento de normas visando à adoção das BPF como base do sistema produtivo foi sem dúvida, a responsável pelas melhorias na garantia da qualidade dos produtos farmacêuticos quanto à

conformidade com exigências legais, nacionais e internacionais. Por outro lado, acabaram por demandar o aumento da complexidade, criando compartimentação e barreiras ao fluxo dos processos e conseqüentemente, na efetividade da manufatura farmacêutica (PINTO, 2009).

1.2.1 Garantia da qualidade na indústria farmacêutica

Há várias definições para Qualidade, porém na Tabela 1 estão as definições, segundo Campos (1992), de principais autores por serem os precursores dos novos conceitos em qualidade.

Tabela 1 - Definições para qualidade.

Autor	Definição
Philip Crosby	Conformidade com as exigências
W. Edwards Deming	A qualidade deve ter como objetivo as necessidades do usuário, presentes e futuras.
Armand Feigenbaum	O total de características de um produto e de um serviço referentes a marketing, engenharia, manufatura e manutenção, pelas quais o produto ou serviço, quando em uso, atenderá as exigências do cliente.
Joseph Juran	Adequação à finalidade ou uso

Todos eles acentuam a importância da qualidade como uma arma competitiva essencial, o papel que a gerência deve ter na implementação da melhoria da qualidade e na importância das técnicas e métodos estatísticos na “transformação da qualidade” de uma organização.

De acordo com a NBR ISO 9000 (2005), qualidade é definida como "grau no qual um conjunto de características inerentes satisfaz a requisitos".

É possível definir Sistema da Garantia da Qualidade como um conjunto de elementos que estão inter-relacionados ou em interação para estabelecer políticas e objetivos para dirigir e controlar uma organização no que diz respeito à qualidade. Em outras palavras, um sistema da garantia da qualidade se constitui por um conjunto de processos estruturados e interdependentes que têm como característica principal viabilizar o gerenciamento das organizações no tocante à qualidade por meio do balanceamento entre o atendimento aos requisitos necessários à

conformidade de produtos ou serviços e o atendimento às expectativas dos clientes. Sendo assim, cada organização deve estruturar seu conjunto de processos gerenciais para a obtenção de seu sistema de garantia da qualidade (PINTO, 2009).

Segundo a norma 21 CFR, seção 820.1 do FDA (*Food and Drug Administration*), os requisitos de boas práticas de fabricação controlam os métodos usados, as plantas e controles usados para o projeto, manufatura, embalagem, etiquetagem, rotulação, armazenamento, instalação e serviço de todos dispositivos finais elaborados para uso humano. Estes requisitos são propostos para garantir que os produtos finais serão seguros e efetivos.

No setor de produção de vacinas é evidente a necessidade de atendimento aos requisitos de qualidade uma vez que se referem aos produtos para saúde da população. No Brasil, este setor é marcado por desafios peculiares. Ele requer uma base científica e tecnológica intensa. Trata-se de produções que implicam em alto custo e têm ciclos longos de processos. A organização da produção é contínua e está sempre submetida a exigências regulatórias.

A adoção de práticas adequadas de gestão da qualidade, a normalização, a metrologia e avaliação da conformidade, representam um diferencial na economia globalizada e, portanto fundamental importância para a exportação brasileira. Como exigência da norma de BPF da ANVISA, RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) número 17 de 2010, cada etapa crítica do processo de fabricação deve ser validada. Como ferramenta da qualidade, prevista nesta legislação vigente, a validação deve atestar que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente e consistentemente leva aos resultados esperados.

Para melhor entendimento das atuais exigências das regulatórias segue um breve histórico sobre a evolução das BPF de medicamentos.

O FDA publicou em 1987 o Guia dos Princípios Gerais do Processo de Validação, que considerava alguns pontos específicos fornecendo apenas princípios e práticas que não eram requerimentos legais, mas que, entretanto refletiam o pensamento e expectativas da agência reguladora americana (IMMEL, 2001).

No fim da década de 80 as agências regulatórias e as associações da indústria farmacêutica da União Européia, do Japão e dos EUA iniciaram um movimento para harmonização das legislações sanitárias voltadas ao setor farmacêutico. Este movimento culminou com a criação da Conferência Internacional sobre Harmonização de Exigências Técnicas para Registro de Medicamentos de

Uso Humano, conhecida como ICH. A finalidade da ICH é definir procedimentos harmonizados e aceitos pelos países constituintes, com vistas a diminuir os prazos de disponibilização de novos medicamentos, reduzir custos de duplicação desnecessária de pesquisas e reforçar os parâmetros de atendimento a qualidade, eficácia e segurança de forma harmônica entre seus membros e colaboradores. Além dos principais produtores e agências reguladoras dos EUA, Japão e União Européia também fazem parte da ICH como observadores a OMS, o Programa de Produtos Terapêuticos do Canadá e a Associação Européia de Livre Comércio (EFTA). Os observadores atuam como elementos de ligação com os países e as regiões não membros da ICH com o objetivo de garantir e fomentar a participação destes países (ICH, 2010).

No campo das BPF, o ICH publicou os documentos Q8, Q9 e Q10 considerados os documentos que mais diretamente influenciarão o processo de harmonização da indústria farmacêutica. O Q8 estabelece os conceitos de Qualidade por projeto (*Quality by Design*) referente às atividades de desenvolvimento tecnológico, o Q9 estabelece a Gestão da Qualidade com base no gerenciamento de risco e o Q10 estabelece o Sistema da Qualidade Farmacêutica.

Segundo Immel (2001) em uma visão de linha do tempo tem-se:

- Em 1996 ocorreu a revisão dos requisitos da BPF americana na qual foram adicionados detalhes relativos à validação, uniformidade das misturas, prevenção de contaminação cruzada e sobre o tratamento de resultados fora do especificado.

- Em 1997 foram estabelecidas as regras para registros eletrônicos (21 CFR parte 11) exigindo controles que garantissem a seguridade e integridade de todos os dados eletrônicos, passo inicial para os futuros requerimentos de validação de sistemas computadorizados.

- Em 1998 o FDA disponibilizou inúmeros documentos em processo de aprovação para orientação à indústria farmacêutica. Dentre eles estavam as orientações para fabricação, processamento e guarda de ingredientes farmacêuticos ativos e para o processo de investigação de resultado de testes fora do especificado.

- Em 1999 o FDA disponibilizou novo procedimento para inspecionar as indústrias baseado em quatro subsistemas principais: controle do gerenciamento, controle do projeto, controle de produto e processo e ações corretivas e preventivas.

Conforme a tipologia provida pela ICH o processo de regulação do setor farmacêutico no mundo se caracteriza por seguir um padrão semelhante entre os

países industrializados. Este processo se apresenta por fases de regulamentação divididas em início, aceleração, racionalização e harmonização (ICH, 2010).

Atualmente EUA, Japão e a União Européia já alcançaram o último estágio da fase de harmonização e estão evoluindo no sentido de incentivar a indústria a adotar tecnologias de produção mais modernas e inovadoras para que não precisem desperdiçar uma grande quantidade de tempo em processos comprobatórios da qualidade, segurança e eficácia de seus processos e produtos atualmente exigidos pelas agências reguladoras (PINTO, 2009).

No Brasil, o desenvolvimento das legislações relacionadas com as BPF foram fortemente direcionadas pelas legislações americanas, européias e recomendações da OMS. Nos Estados Unidos da América, o código 21 da regulamentação federal contém, nas partes 210 e 211, os requisitos mínimos de garantia da qualidade para os produtos farmacêuticos. Na Europa, foi publicado pela Comissão Européia o documento *Good Manufacturing Practices (GMP) for Medical Products in the European Communities*, que deve ser seguido por todos os países da União Européia (UE) (ROSENBERG, 2002).

A ANVISA foi criada em 1999 através da Lei 9.782 e em 16 de julho de 2001 ocorreu a publicação das BPF nacionais no Diário Oficial da União como RDC recebendo a numeração 134 da ANVISA aprovada em 13 de julho do mesmo ano. Seguindo a evolução dos guias da OMS a legislação brasileira buscou manter-se adequada aos padrões mundiais, promovendo a revisão da RDC 134. Assim em 14 de agosto de 2003 foi publicada a RDC 210 substituindo a RDC 134 (FIALHO, 2005).

Ainda no cenário nacional, a ANVISA já revisou e publicou a RDC 17 em 19 de abril de 2010 para substituição da RDC 210/2003. Nesta nova RDC a ANVISA se tornou totalmente seguidora do que é preconizado nos guias mais recentes da OMS e nos demais documentos de referência disponibilizados pelo ICH, adequando assim a legislação brasileira aos padrões internacionais aplicados ao setor farmacêutico. Novos requisitos como análise de risco, validação de sistemas computadorizados, um sistema de gestão da qualidade específico para o setor farmacêutico, entre outros, estão contemplados nesta nova RDC.

1.2.2 Validação

Segundo FDA (1987), validação é o procedimento que estabelece a evidência documentada que dê um alto grau de confiança de que um processo específico produzirá com consistência um produto de acordo com suas especificações pré-definidas e atributos da qualidade.

A validação é a parte da BPF sendo um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo em particular. Uma operação validada assegura a produção de lotes uniformes que atendem às especificações requeridas, conseqüentemente gerando ao fabricante a confiança do fornecimento de um produto de qualidade.

Todos os passos do processo de produção de produtos farmacêuticos devem acontecer de acordo com o planejado. Os estudos de validação devem verificar se o sistema testado atua de maneira normal e sob condições extremas permanece sob controle. Os processos e procedimentos devem ser estabelecidos com base nos resultados da validação realizada.

A ANVISA com o regulamento RDC 17 que dita as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos define que a organização deve estabelecer procedimentos documentados para validação que deve ser realizada:

- para instalações, equipamentos, utilidades (ex: água, ar, ar comprimido, vapor), sistemas, processos e procedimentos;
- em intervalos periódicos; e
- quando mudanças maiores forem introduzidas.

Uma vez o sistema ou processo validado, é esperado que este permaneça sob controle desde que não sejam feitas modificações críticas, porém a validação não deve ser considerada como exercício único devendo haver também revalidações periódicas ou monitoramento para acompanhamento e garantia da qualidade (ANVISA, 2010).

A validação é realizada baseada em protocolos e relatórios de validação. O protocolo de validação é o documento que descreve as atividades a serem realizadas na validação de um projeto específico, incluindo o cronograma, responsabilidades e os critérios de aceitação para a aprovação de um processo produtivo, procedimento de limpeza, método analítico, sistema computadorizado ou parte destes para uso na rotina. Já o relatório de validação é o documento no qual

os registros, resultados e avaliação de um programa de validação são consolidados e sumarizados. Pode também conter propostas de melhorias (ANVISA, 2010).

Um conceito importantíssimo e que todos devem ter consciência da sua importância é que: *“Se não está documentado, não foi realizado”*.

A validação rende benefícios, tais como:

- ❖ Melhor compreensão do processo;
- ❖ Tempo de operação mais curto;
- ❖ Aumento da eficácia operacional;
- ❖ Processos mais robustos;
- ❖ Redução dos tempos de parada (tempo morto);
- ❖ Manutenção dos padrões de qualidade;
- ❖ Economia;
- ❖ Aumento da flexibilidade de processo.

Ao contrário de muitos outros requisitos das BPF, a validação em si própria não melhora os processos. Ela apenas pode confirmar ou não, dependendo do caso, de que o processo foi adequadamente desenvolvido e, que se encontra sob controle.

A ANVISA segundo a RDC 17 define a validação de processo da mesma forma que FDA (1987) define o conceito de validação já citado no primeiro parágrafo deste item. O conceito para validação de processo segundo ANVISA é similar ao descrito no ICH Q7 (2000). A Figura 1 representa este conceito, onde a validação de processo é a evidência documentada de que o processo, operado dentro de parâmetros estabelecidos, pode executar de forma eficaz e reproduzível a produção de intermediários ou ingredientes farmacêuticos ativos atendendo suas especificações pré-determinadas e atributos da qualidade.



Figura 1 - Validação de processo. (Fonte: Santos, 2010)

Tanto a RDC 17 como o ICH Q7 cita a exigência da realização das validações dos processos de limpeza. Porém a ANVISA exige esta validação de uma forma geral e na referência do ICH Q7 encontra-se a necessidade de validação de limpeza direcionada para situações ou etapas do processo onde a contaminação ou o carregamento de materiais representa o maior risco para a qualidade do ativo farmacêutico. Por exemplo, pode ser desnecessário validar procedimentos de limpeza de equipamentos nas etapas iniciais de produção onde os resíduos serão removidos por etapas de purificação subseqüentes.

1.2.3 Validação do processo de limpeza

Um dos objetivos das BPF inclui a prevenção de possível contaminação cruzada em produtos farmacêuticos. Estes podem estar contaminados por várias substâncias como: resíduos de ingredientes farmacêuticos ativos, excipientes, agente de limpeza, poeira, partículas em suspensão, resíduo de decomposição do produto ocasionado por ácido ou base forte durante o processo de limpeza, etc.

Procedimentos de limpeza adequados desempenham um importante papel na prevenção da contaminação e contaminação-cruzada, protegendo a integridade do produto e permitindo o reuso dos equipamentos.

O objetivo da validação de limpeza é provar que o equipamento está limpo, com resíduos de produto e agente de limpeza em níveis aceitáveis para prevenir possível contaminação e contaminação cruzada (OMS, 2006).

A validação de limpeza, por ser um requerimento das autoridades regulatórias, estabelece os parâmetros, critérios e metodologias a fim de demonstrar que o procedimento de limpeza produz resultados que estão de acordo com as especificações exigidas.

Equipamentos e utensílios devem ser limpos em intervalos de tempo apropriados para prevenir contaminação que possa alterar a segurança, identidade, potência, qualidade ou pureza do produto além de outros requerimentos estabelecidos (21 CFR 211.67A, FDA, 2004).

Antes do início da validação de limpeza algumas considerações devem ser verificadas:

- ❖ Existência de procedimentos de limpeza padronizados;
- ❖ Se os procedimentos estão adequados para determinada limpeza específica;

- ❖ Se as seguintes informações estão padronizadas: agente de limpeza, concentração e volume do agente de limpeza, temperatura da solução de limpeza, tempo de contato, tipo de água de enxágüe e tempo de enxágüe.
- ❖ Treinamento dos operadores que realizarão a limpeza;

Além destas informações, segundo Guias relacionados à Garantia de Qualidade (ANVISA, 2006), deve-se definir por quanto tempo o equipamento pode permanecer sujo, antes que a limpeza seja executada, pois a efetividade de um procedimento de limpeza é inversamente proporcional ao tempo que o mesmo permanece sujo.

Segundo a OMS (2006) o período e condições de estocagem do equipamento antes de sua limpeza e o tempo entre limpeza e reuso do equipamento devem fazer parte da validação do procedimento de limpeza. Após a limpeza os equipamentos devem ser estocados em uma condição seca, não podendo haver água estagnada. Em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ estes tempos são definidos como *“holding times”*. Este termo refere-se aos seguintes tempos:

“Holding time” sujo – Tempo máximo que o tanque pode permanecer sujo até o procedimento de limpeza.

“Holding time” limpo – Tempo máximo que o tanque pode permanecer armazenado após limpeza até sua esterilização.

A validação do procedimento de limpeza estende-se somente às áreas que entram diretamente em contato com o produto ou ativo farmacêutico (superfície interna de reatores, tanques, envasadoras, equipamentos de embalagem primária e utensílios de pesagem) ou superfícies que eventualmente possam ter contato com o produto (selos, flanges, eixos de mistura, ventiladores de estufas e elementos de aquecimento). O procedimento de limpeza das áreas onde o produto ou ativo farmacêutico não entra em contato direto não faz parte do estudo de validação de limpeza (ANVISA, 2006).

A validação de limpeza não é necessariamente requerida para limpeza não crítica como pisos, paredes e parte externa de tanques. A validação de limpeza deve ser considerada importante em equipamentos multiuso. Normalmente esta validação deve ser aplicada para limpeza críticas como a limpeza entre produção de dois produtos e de superfícies que entram em contato com o produto e ingrediente farmacêutico ativo (OMS, 2006).

A limpeza necessária para equipamentos multiuso é muito mais complexa que para equipamentos dedicados. Isso se deve ao fato da validação de limpeza não focar somente a limpeza e remoção do produto, mas também definir o critério de aceitação baseado na possível contaminação do próximo produto fabricado no mesmo equipamento. Procedimentos de limpeza adequados sempre dependem do próximo produto que é fabricado no mesmo equipamento, assim se um novo produto deve ser introduzido em um equipamento com sua validação de limpeza já concluída, o impacto do novo produto sobre a validação deve ser avaliado, e particularmente o limite de aceitação do resíduo de produto (LEBLANC, 2000).

De acordo com o ICH Q7 se vários ingredientes farmacêuticos ativos ou intermediários são produzidos em um mesmo equipamento e este equipamento é limpo pelo mesmo procedimento, um destes pode ser selecionado para validação de limpeza. Esta seleção de “pior caso” deve ser baseada na solubilidade e dificuldade de limpeza.

Este mesmo pensamento também é mostrado pela OMS onde segundo esta organização os procedimentos de limpeza para produtos e processos que são similares não precisam ser validados individualmente. O estudo de validação do pior caso é considerável aceitável. O produto representante escolhido como pior caso deve ser aquele com maior dificuldade de limpeza.

A amostragem para esta validação deve incluir *swab* ou rinsagem, conforme o caso, para detectar resíduos insolúveis e solúveis. Os métodos de amostragem utilizados devem ser capazes de medir quantitativamente os níveis de resíduos remanescentes na superfície do equipamento após a limpeza.

Existem dois métodos de amostragem aceitáveis: amostragem direta da superfície (*swab*) e amostragem indireta da superfície (amostras de rinsagem). Segundo OMS, o ideal é a combinação destes dois métodos.

❖ *Amostragem direta da superfície (swab)*

O tipo de *swab* utilizado interfere potencialmente no teste, por isso devem ser utilizados *swabs* adequados em que o material de sua construção não interfira na análise, como exemplo não reaja com o solvente utilizado, não deve ainda ser fonte de contaminação adicional ou interferir na metodologia analítica.

De acordo com a OMS (2006) a área que será amostrada por *swab*, o fornecedor do *swab*, número de *swabs* utilizados, se o *swab* é utilizado seco ou

úmido, manipulação do *swab* e técnica de amostragem são alguns fatores devem ser considerados nesta amostragem.

Existem algumas vantagens no uso do *swab* como: retirada de resíduos secos e insolúveis; estabelecimento do nível de contaminação por área, estabelecendo onde o procedimento precisa ser melhorado e se realmente os pontos críticos correspondem às expectativas e possibilidade de recuperação do contaminante a partir de áreas onde a água de rinsagem teve contato deficiente.

A percentagem 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 material constituinte do equipamento e definição da área.

A área a ser amostrada deve permitir livre acesso ao operador, o que é impraticável em muitos equipamentos, sendo esta uma desvantagem ao uso da amostragem direta. Amostragem por *swab* não pode ser realizada quando as superfícies de contato com o produto não são facilmente acessíveis devido ao design de equipamento e/ou limitações do processo (por exemplo, superfícies internas da tubulação de transferência em fermentadores, reatores com portas pequenas ou manipulação de materiais tóxicos).

O local de amostragem deve ser escolhido levando em consideração a composição do material (por exemplo: vidro ou aço) e localização do ponto. Devem ser escolhidas localizações de pior caso (OMS, 2006).

❖ *Amostragem indireta da superfície (amostras de rinsagem)*

A grande vantagem da amostragem indireta é que as amostras de rinsagem permitem amostrar grandes áreas e áreas de difícil acesso como bicos de envase, tubulações e pequenas peças, porém a desvantagem é que o contaminante pode estar ocluído ou aderido em alguma superfície, de modo que a simples rinsagem não é capaz de retirá-lo.

Estudos de recuperação devem ser realizados para a amostragem adotada. Deve haver evidências de que as amostras são recuperadas com precisão. No caso de *swab* o estudo de recuperação deverá conter a razão técnica da escolha do solvente utilizado no *swab*, os testes que foram feitos para definição do fator de recuperação e o cálculo utilizado para a definição do fator de recuperação.

No cálculo final do fator de recuperação, sugere-se levar em consideração o menor resultado de recuperação encontrado e não a média dessas recuperações. Resultados com alta discrepância, para os fatores de recuperação, devem ser investigados com o objetivo de eliminar a causa da dispersão.

Segundo a OMS uma recuperação maior que 80% é considerada boa, entre 50% e 80% razoável e menor que 50% questionável. Já para ANVISA são desejáveis fatores de recuperação acima de 75,0%.

Para o caso de injetáveis é necessário realizar também o teste para avaliação de concentração de endotoxina nas amostras. As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) associados à membrana externa de bactérias Gram negativas, e se constituem na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica (PINTO *et al.*, 2003). O LAL (Limulus Amebocyte Lysate) é um produto derivado do lisado de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*, com emprego específico na determinação de endotoxinas bacterianas derivadas de bacilos Gram-negativos, entre outros pelo método da formação de gel. Este indica uma resposta para a presença de endotoxina na amostra contendo quantidade igual ou superior à sua sensibilidade (PINTO *et al.*, 2003). A reação do LAL requer um pH neutro e é dependente do tempo, da temperatura e concentração da endotoxina (*UNITED STATES PHARMACOPEIA* - USP, 2007).

Existe uma variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados para validação do processo de limpeza. A natureza química do resíduo a ser medido possui relevância para escolha do método analítico. Esta natureza química inclui entre outras, se o resíduo é orgânico ou inorgânico e se é solúvel em água ou outros solventes (LEBLANC, 2000).

Podem ser utilizados métodos específicos ou não específicos.

Os métodos específicos são aqueles em que tem como alvo moléculas específicas e são designados de forma que os possíveis interferentes são eliminados. Estes métodos incluem métodos cromatográficos (por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC, cromatografia gasosa - GC e cromatografia em camada delgada de alta pressão - HPTLC, eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE) e espectrometria de absorção atômica. Com esses métodos, é possível selecionar, por exemplo, condições para coluna de HPLC em que o resíduo seja cuidadosamente separado de outras espécies interferentes.

No entanto, a afirmação de que se deve abordar a especificidade do método analítico utilizado foi por vezes mal interpretada com o significado que apenas um método específico podia ser usado. Não está claro de onde esta crença veio, mas muito provavelmente veio de uma incorreta interpretação de outra posição da FDA sobre métodos analíticos. No início da validação de processo de limpeza algumas empresas apenas analisavam água de rinsagem e utilizavam especificações farmacopéicas, como USP. Caso a água de rinsagem atendesse a especificação farmacopeica, a validação de limpeza era considerada como um processo bem sucedido. O FDA fez objeções a isto por várias razões. Uma delas foi o fato de a especificação compendial não possuir relação com a ausência ou presença de resíduo de produto. Por exemplo, o resíduo de um ativo potente poderia estar presente na água de rinsagem em quantidade inaceitável e esta água ainda atender as especificações compendiais (LEBLANC, 2000).

A FDA indicou que queria algo que pudesse medir realmente as espécies-alvo. O método específico é uma maneira de fazer isso. No entanto, uma segunda maneira é utilizar um método não específico, enquanto os resultados de que a medida não específica pode ser diretamente relacionada com o resíduo do produto.

Métodos não específicos são geralmente métodos que medem uma propriedade bruta que resulta das contribuições de uma variedade de espécies químicas. Com exemplos tem-se o método de medição do carbono orgânico total (TOC), pH, condutividade e espectrofotometria no ultravioleta (UV).

Neste caso, cada método fornece uma medida de uma propriedade geral, mas não fornece nenhuma informação quanto à natureza química, por exemplo, da fonte carbono orgânico. Quando um método não específico é utilizado para medição de resíduo de produto, é necessário fazer algumas suposições sobre o que essa propriedade não-específica representa. Isso geralmente envolve a expressão da propriedade como se toda a propriedade medida fosse devido ao resíduo de produto.

O caso da análise de TOC pode ser utilizado como exemplo onde o valor de TOC é expresso como se todos os átomos de carbono presentes fossem provenientes da espécie orgânica de resíduo de produto. Sabe-se que o carbono orgânico medido não é apenas devido aos ativos orgânicos, podendo ter outras contribuições como a do agente de limpeza e excipientes. Isto seria considerado um pior caso e tem-se base científica que permite o uso de TOC para chegar a tal

conclusão, pois o objetivo é determinar que o valor medido seja inferior ao critério de aceitação calculado.

Uma desvantagem do uso do método não específico é se o valor encontrado for maior que critério de aceitação calculado não se pode afirmar que o resíduo de produto está acima do especificado uma vez que as contribuições de outras substâncias podem estar elevando este valor.

Devem ser utilizados métodos analíticos validados com sensibilidade para detectar resíduos do produto ou contaminantes (ICH Q7, 2000). A metodologia analítica utilizada deve prover uma medida que seja correlacionável a uma concentração do contaminante. Deve existir um trabalho de validação para a metodologia empregada na validação de limpeza.

O limite de detecção para cada método analítico deve ser suficientemente sensível para detectar o nível aceitável estabelecido de resíduo de produto ou contaminantes (OMS, 2006).

Os métodos analíticos utilizados devem ser desafiados em combinação com os métodos de amostragem utilizados, para demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados a partir da superfície do equipamento com certa consistência. Isso é necessário antes que qualquer conclusão seja feita a respeito dos resultados encontrados. Resultados negativos pode ser uma consequência de uma pobre metodologia de amostragem.

A composição do agente de limpeza deve ser conhecida e sua remoção durante a limpeza demonstrada. Também devem ser definidos resíduos aceitáveis de agente de limpeza após o procedimento de limpeza (OMS, 2006).

Uma importante consideração para validação do processo de limpeza é "*Quanto limpo é limpo o bastante?*". A escolha do critério deve ser cientificamente comprovada, não podendo ser arbitrária, evitando assim questionamentos regulatórios.

Várias metodologias têm sido propostas para a determinação dos limites de aceitação. De acordo com a ANVISA, os três critérios mais utilizados, com suas possíveis variações individuais, são:

- I. Presença de não mais que 0,1% da dose limite; 1/1000 ou a milésima parte da dose diária mínima do contaminante pode aparecer na dose diária máxima do produto subsequente. Para o caso de produtos injetáveis é aceitável apenas 0,01% da dose limite, ou seja, 1/10000, a décima milésima parte da

dose diária mínima do contaminante na dose diária máxima do produto subsequente. Assim o fator de segurança para este caso é igual a 0,0001.

- II. Não mais que 10 ppm do contaminante no produto subsequente.
- III. Nenhuma quantidade de resíduo deve ser visível após a execução do procedimento de limpeza.

A seguir estão as fórmulas utilizadas para cálculos destes critérios:

❖ **Critério 1 - 0,01% da dose limite (caso para produtos injetáveis)**

Passo A: Determinação do limite de aceitação máximo em µg do contaminante no produto subsequente.

$$A = \frac{0,0001 \times MTD_{CONT} \times MBS_{SUBS}}{M_{AX} TD_{SUBS}} \quad (1.1)$$

Onde:

0,0001 = Fator de segurança. Para o caso de produtos injetáveis é aceitável apenas 0,01% da dose limite, ou seja, 1/10000 ou a décima milésima parte da dose diária mínima do contaminante pode aparecer na dose diária máxima do produto subsequente. Assim, o fator de segurança para este caso é igual a 0,0001. Este fator pode variar em alguns casos, por exemplo, para produtos orais é 0,001 (0,1% da dose limite) e para produtos tópicos é 0,01 (1% da dose limite).

MTD_{CONT} = Mínima dose diária do contaminante em µg

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote do subsequente em g ou mL

$M_{AX} TD_{SUBS}$ = Máxima dose diária do subsequente na mesma unidade do tamanho mínimo do lote subsequente (MBS_{SUBS})

No caso de solução de limpeza, como a MTD_{cont} não é conhecida, utiliza-se o NOEL - nível de efeito não observado. O NOEL substitui os termos “0,0001 x MTD_{cont} ” no cálculo do Passo A e é calculado pela seguinte fórmula:

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times 70}{2000} \quad (1.2)$$

Onde:

LD_{50} = é a quantidade de uma substância química que quando é administrada em uma única dose por via oral, expressa em massa da substância por massa de animal, produz a morte de 50% dos animais expostos. É expressa em mg/Kg.

70 = Peso médio de uma pessoa adulta em Kg

2000 = Constante empírica

Passo B: Determinação do limite de aceitação do contaminante por área compartilhada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

$$B = \frac{A}{SRSA} \quad (1.3)$$

Onde:

A = Limite de aceitação máximo em μg do contaminante no produto subsequente, que é o valor calculado no passo A.

SRSA = Área compartilhada pelos produtos em cm^2 .

Passo C: Determinação do limite de aceitação do contaminante na amostra analisada ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}} \quad (1.4)$$

Onde:

B = Limite de aceitação do contaminante por área compartilhada, que é o valor calculado no passo B.

ÁREA = No caso de água de rinsagem é toda área compartilhada. Já no caso de *swab* é a área amostrada. Deve ser expressa em cm^2 .

Volume = No caso de água de rinsagem é o volume utilizado para rinsagem. Já no caso de *swab* é o volume utilizado na recuperação do *swab*. Deve ser expressa em mL.

❖ ***Critério 2 - O limite de aceitação de 10 ppm do produto contaminante no produto subsequente***

Nos cálculos, somente o passo A se altera, passando a ser:

$$A = 10 \times MBS_{SUBS} \quad (1.5)$$

Onde:

10 = Representa o limite de aceitação 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{g/g}$)

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote do subsequente em g ou mL

Os passos B e C são calculados da mesma maneira conforme citado no critério 1.

A adoção do limite de 10 ppm para tanques não dedicados é justificada apenas no caso em que o limite baseado em dose terapêutica (0,01% da dose limite) seja mais alto, pois mesmo que os limites altos sejam justificáveis, sua adoção foge a lógica da BPF. O limite de 10 ppm também pode ser adotado no caso de tanques dedicados onde não é possível calcular 0,01% da dose limite.

❖ ***Critério 3 – Inspeção Visual***

A inspeção visual pode permitir a detecção de contaminação grosseira concentrada em pequenas áreas que poderia passar despercebida por amostragem e / ou análise.

Tais critérios são aplicáveis aos resíduos de produtos e de agentes de limpeza. O critério mais severo é o que deve ser utilizado, sendo que o critério visualmente limpo deve ser incluído em todos os procedimentos de limpeza executados, exceto naqueles em que a limpeza não pode ser verificada visualmente.

O critério de aceitação estabelecido para os níveis de contaminantes na amostra deve ser prático, viável e de possível verificação. A justificativa para os limites estabelecidos deve ser lógica e baseada no conhecimento dos materiais envolvidos.

Os limites podem ser expressos como a concentração em um produto subsequente ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ou em limite por área de superfície ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

A validação do processo de limpeza evidencia que o procedimento de limpeza aprovado resultará em um equipamento adequadamente limpo para o uso. Desta forma, como em toda validação, são necessários os protocolos e relatórios de validação.

Segundo o ICH Q7, para esta validação o protocolo deve descrever o equipamento a ser limpo, procedimentos de validação, materiais, critérios de aceitação, parâmetros que devem ser controlados e monitorados e o método analítico escolhido. O protocolo deve também indicar os tipos de amostras a serem obtidas e como elas serão coletadas.

Além disso, segundo a ANVISA, o protocolo deverá: definir o objetivo e as responsabilidades do processo, indicar a localização dos pontos de amostragem, definir os “holding times”, relacionar os produtos que são utilizados no equipamento objeto do estudo, demonstrar os estudos de recuperação e incluir a data e a assinatura do(s) indivíduo(s) que aprovam a validação. Um processo de limpeza validado deverá ser executado somente por pessoas qualificadas. Todas as não-conformidades ocorridas durante o processo de limpeza devem ser registradas.

De acordo com Guia da Qualidade da ANVISA (2006) no mínimo três aplicações consecutivas do procedimento de limpeza devem ser executadas demonstrando sucesso para que o procedimento possa ser considerado validado.

Novos processos de limpeza devem ser validados antes de sua utilização. A revalidação deve ser realizada periodicamente quando não houver mudança significativa no processo, ou seja, quando o status de validação for mantido. No caso de revalidação, deve-se realizar apenas uma corrida dos ensaios descritos.

Revalidações periódicas podem ser substituídas, quando apropriado, pela avaliação periódica dos dados e informações (ANVISA, 2010).

Em caso de solicitação de mudança onde é detectada alguma alteração crítica no processo de limpeza, este deve ser novamente validado antes da

implementação da mudança e nesta validação devem ser realizadas pelo menos três corridas, com resultados satisfatórios.

Para processo de limpeza são consideradas alterações críticas:

- mudança da composição do agente de limpeza ou da sua concentração sem estudo de equivalência de ação;
- diminuição no tempo de contato com o agente de limpeza;
- diminuição no número ou tempo de rinsagem;
- inclusão de novo equipamento, material e/ou instalação ou alteração das suas características ou composição;
- inclusão de novo produto (contaminante) considerado mais crítico do que aquele já validado em relação à solubilidade e/ou concentração.

As atividades de análise crítica, avaliação e revalidação deverão ser documentadas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos Principais

2.1.1 Tanque de formulação

Foi utilizado um tanque da marca Quiminox, construído em aço inox do tipo 316L, com 150L de volume total e dimensões de 61 cm de altura e 57 cm de diâmetro (Figura 2). Este equipamento possui pescador, agitador, válvulas e manômetro calibrado.



Figura 2 - Visão frontal do tanque utilizado na validação

O agitador é tipo turbina, posicionado excentricamente, com sistema de acoplamento magnético apropriado para rotação e localizado na parte inferior do tanque. Este agitador garante a homogeneidade das matérias-primas à medida que são adicionadas durante a formulação.

A entrada de ar comprimido é independente, por uma válvula diafragma manual, com conexão sanitária e bico escalonado. Esta entrada está localizada na

tampa do tanque. Existe também um manômetro analógico com escala de 0 a 4,0 kgf/cm fixado por conexão sanitária para a medição da pressão interna do tanque.

A entrada e saída de produto são independentes das utilidades, construídas em aço inox tipo 316L e localizadas na tampa do tanque. A entrada de produto ocorre por um tubo com 10 cm de altura e 1 cm de diâmetro. A saída acontece por um longo tubo removível, denominado de “pescador”, que possui altura de 61 cm e diâmetro de 1 cm. Este “pescador” possui conexão sanitária, com anel de vedação em silicone e abraçadeira do mesmo material e acabamento do tanque.

Este mesmo equipamento é utilizado para formulação de duas diferentes vacinas: a vacina Hib e a vacina Meningite A e C.

2.1.2 Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC)

Um dos principais instrumentos utilizados para desenvolvimento deste trabalho foi o analisador de TOC da marca GE Sievers, modelo 900 Laboratory mostrado na Figura 3.



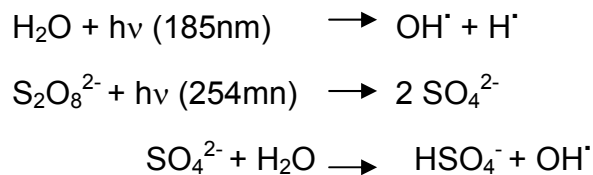
Figura 3 - Analisador de TOC

Este instrumento fornece a determinação indireta de TOC e se baseia na oxidação do carbono orgânico presente na amostra a CO_2 e posterior medida deste por condutividade. A reação de oxidação ocorre pelo uso de uma solução de persulfato de amônio 15% m/v em meio de ácido fosfórico 6 mol/L.

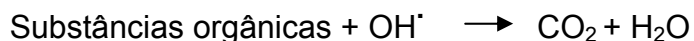
Após a entrada da amostra no sistema, o ácido é injetado até reduzir o pH para 2,0. A amostra acidificada é combinada com o oxidante para promover oxidação das substâncias orgânicas. A amostra é conduzida através do homogeneizador até chegar ao divisor de fluxo. A amostra então é dividida em duas partes iguais. Uma é processada para a determinação de carbono inorgânico total (IC) e a outra é processada para determinação de carbono total (TC).

A amostra IC é enviada diretamente para o sensor de CO₂ para determinação de carbono inorgânico total. Existem dois sensores de CO₂ que medem a concentração desta substância por condutividade. Um dos sensores mede a concentração de CO₂ na amostra sem oxidação (sensor IC) e o outro mede a combinação da concentração inicial de CO₂ com aquele produzido pela oxidação das substâncias orgânicas (sensor TC).

A amostra TC passa por um reator de oxidação onde é exposta à luz UV. A combinação da luz UV e o persulfato de amônio oxida os componentes orgânicos na amostra, convertendo o carbono a CO₂. O reator é um tubo de quartzo espiral que envolve a lâmpada UV. A lâmpada UV emite radiação de 185 nm e 254 nm resultando na formação de uma reação química que resulta em agentes na forma de radicais hidroxilas produzidos através das fotodecomposições da água e do persulfato como mostrado abaixo:



O radical hidroxila (OH[•]) completará a oxidação dos componentes orgânicos convertendo o átomo de carbono do componente orgânico em CO₂.



O CO₂ é então analisado pelo sensor TC por meio da determinação da condutividade.

A concentração de carbono orgânico total é então determinada pelo instrumento através da diferença da concentração de carbono total (TC) e carbono inorgânico (IC).

Os parâmetros do instrumento medidor de TOC são configurados para três determinações consecutivas e os volumes dos reagentes ácido e oxidante para o modo automático. Desta forma o instrumento utiliza estes reagentes à medida que necessita de acordo com o nível de carbono na amostra a ser analisada.

2.2 Métodos

2.2.1 Determinação de Carbono Orgânico Total (TOC)

Em todos os métodos descritos, as amostras coletadas eram analisadas somente após atingirem a temperatura ambiente de 25 °C. Após a coleta, o tempo decorrido era de 60 minutos até as determinações analíticas serem iniciadas.

Todas as amostras para as determinações de TOC foram coletadas diretamente em frascos novos, de vidro, com 40 mL de capacidade.

Os frascos e *swabs* utilizados foram da marca Texwipe (Figura 4), específicos para validação dos processos de limpeza, pois possuem certificado em relação à sua limpeza quanto à concentração de TOC. Neste certificado consta a quantificação de TOC para *swab* como < 50 µg/L e para os frascos como < 10 µg/L.



Figura 4 - Frascos e *swabs* específicos para validação de limpeza

Como o frasco é o apropriado para determinação de TOC este possui uma tampa com septo pelo qual é introduzida a agulha do aparelho de TOC. Após esta etapa é iniciada a análise mediante a seleção da tecla “start”.

2.2.2 Determinação de condutividade

A determinação da condutividade das amostras foi realizada utilizando-se um condutímetro da marca Metrohm, modelo 712 conductometer, devidamente calibrado.

As amostras para determinação da condutividade foram coletadas em frascos de polietileno com cerca de 500 mL de capacidade. No momento da determinação, um volume de 40 mL foi transferido para um béquer previamente limpo e rinsado com água purificada (*purified water* - PW), por 30 segundos. Esta quantidade de água adicionada é suficiente para que a maior parte do sensor fique imerso na água. Foi anotado o valor de condutividade da amostra após a estabilização. A unidade em condutividade utilizada foi $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2.2.3 Determinação de pH

A determinação do pH das amostras foi executada utilizando-se um medidor de pH da marca WTW, modelo Inolab level 2, devidamente calibrado.

As amostras para determinação de pH foram as mesmas coletadas para determinação de condutividade. No momento da medida, um volume de 40 mL era transferido para um outro béquer previamente limpo e rinsado com PW por 30 segundos. Esta quantidade de água adicionada é suficiente para que a maior parte do sensor fique imerso na água. Foi anotado o valor de pH da amostra após a estabilização.

2.2.4 Determinação de endotoxina

Esta determinação é realizada pelo método Gel-clot para avaliação da concentração de endotoxina nas amostras. Este método é simples e semi-quantitativo. Utilizou-se o kit gel-clot da Charles River Endosafe, que é um kit constituído de frascos apirogênicos utilizados para incubação da reação, reagente de revelação (LAL), endotoxina para controle positivo e água apirogênica para controle negativo e diluições.

O reagente de revelação consiste em um extrato enzimático proveniente das células sanguíneas (amebócitos) do *Limulus polyphemus* que, em contato com determinada quantidade de endotoxina, cria um gel solidificado após a incubação da reação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora.

A sensibilidade do reagente do lisado de amebócitos do *Limulus polyphemus* (LAL) utilizado foi de 0,125 EU/mL.

Para esta determinação todas as amostras foram coletadas em frascos de polipropileno apirogênicos (livres de endotoxina) com capacidade de 35 mL de forma a garantir a integridade da amostra em relação à sua concentração de endotoxina.

Este teste foi realizado sempre em duplicata e foram realizadas as determinações nas amostras de controle positivo, amostras de controle negativo e amostras da validação. As seguintes etapas foram realizadas na seguinte seqüência citada evitando assim a contaminação dos reagentes, controles e amostras de validação.

2.2.4.1 Preparo do lisado de amebócitos (LAL)

O lisado de amebócito (LAL) liofilizado foi reconstituído, à temperatura ambiente, com 5,2 mL de água apirogênica utilizando-se micropipeta calibrada e ponteiros estéreis. Com esta reconstituição sua sensibilidade atinge 0,125 EU/mL.

Este frasco foi agitado suavemente evitando a formação de espuma, até a sua homogeneização. O reagente LAL não pode ser agitado em vórtex ou no banho de ultra-som, pois sendo um reagente biológico forma espuma e é destruído pela agitação. Cada 100 μL do LAL foi transferido para tubos apirogênicos podendo permanecer estocados a -20°C por até 28 dias sem perder a sensibilidade, não podendo ser congelado por mais de uma vez. Desta forma retirava-se sempre a quantidade a ser utilizada, minutos antes de realizar a determinação.

2.2.4.2 Amostras da validação

As amostras da validação foram:

- 1 - amostras de recuperação;
- 2 - amostras após a limpeza;
- 3 - amostras após tempo máximo limpo;
- 4 - amostras após autoclavagem.

Para os casos das amostras 2, 3 e 4 foram adicionados aos tubos apirogênicos contendo 100 µL do LAL, 50 µL da amostra a ser analisada e 50 µL da água apirogênica. Esta diluição foi realizada para que a amostra fosse diluída duas vezes em relação ao limite de endotoxina na água para injetáveis – *water for injection*, WFI – que é menor que 0,250 EU/mL, e atingisse a sensibilidade de detecção do lisado (0,125 EU/mL).

Já para amostra de recuperação (caso 1) foi realizada uma diluição maior. Neste caso a concentração de endotoxina foi diluída 2000 vezes permitindo assim que a concentração de contaminação 250 EU/mL atingisse a sensibilidade de detecção de endotoxina do lisado (0,125 EU/mL). Assim esta diluição foi preparada da forma mostrada na Figura 5:

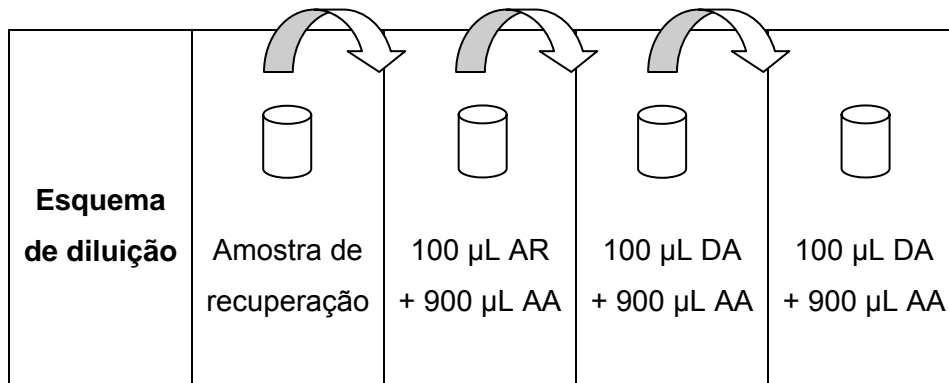


Figura 5 - Esquema de diluição para amostras de recuperação

Onde:

AR = Amostra de recuperação;

AA = Água Apirogênica e

DA = Diluição Anterior

Deste último tubo de diluição, 50 µL da amostra a ser analisada foi adicionada aos tubos apirogênicos contendo 100 µL do LAL, e 50 µL da água apirogênica. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

2.2.4.3 Controle positivo

O preparo do controle positivo foi realizado conforme o certificado de análise da Charles River Endosafe, onde consta o lote da endotoxina padrão e do reagente

lioofilizado, a concentração dos mesmos e a quantidade de água apirogênica que deverá ser utilizada para reconstituição dos mesmos.

Depois de adicionada a quantidade de água apirogênica, a endotoxina padrão deverá ser agitada em vórtex, em alta velocidade por 5 minutos.

Segundo a USP, para esta determinação é necessário realizar uma curva de concentração para validação do reagente LAL com os seguintes padrões: 0,25 EU/ mL, 0,125 EU/ mL, 0,0625 EU/ mL e 0,03125 EU/ mL.

A endotoxina padrão utilizada possuía a concentração de 20 EU/mL e conforme o certificado de análise foi reconstituída com 5,0 mL de água apirogênica.

As diluições foram feitas utilizando frascos apirogênicos. A cada diluição realizada, ou seja, entre uma diluição e outra, a solução era agitada em vórtex por 1 minuto. Foi utilizado o seguinte esquema de diluição mostrado na Figura 6.

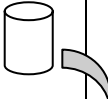
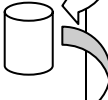
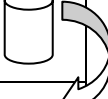


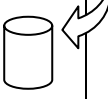

Concentração de endotoxina	Esquema de diluição	
20 EU/mL	Endotoxina padrão	
5 EU/mL	200 µL EPR + 600 µL AA	
2,5 EU/mL	500 µL DA + 500 µL AA	
0,25 EU/mL	100 µL DA + 900 µL AA	
0,125 EU/mL	500 µL DA + 500 µL AA	
0,0625 EU/mL	500 µL DA + 500 µL AA	
0,03125 EU/mL	500 µL DA + 500 µL AA	

Figura 6 - Esquema de diluição do padrão

Onde:

EPR = Endotoxina Padrão Reconstituída;

AA = Água Apirogênica e

DA = Diluição Anterior

Após as diluições, foram transferidos 100 μ L de cada uma das diluições (0,25 EU/ mL, 0,125 EU/ mL, 0,0625 EU/ mL e 0,03125 EU/ mL) para cada tubo apirogênico que continha 100 μ L de LAL. Este controle é realizado em duplicata para cada diluição.

2.2.4.4 Controle negativo

A água apirogênica foi utilizada como controle negativo. Para o preparo deste controle foram adicionados 100 μ L de água apirogênica nos tubos com 100 μ L do LAL. Este controle também foi realizado em duplicata.

2.2.4.5 Avaliação dos resultados

Os resultados foram avaliados após a incubação de todos os tubos de reação a 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C por 1 hora.

Os resultados eram considerados positivos, ou seja, concentração de endotoxina \geq 0,250 EU/mL, ao apresentar a formação de um gel firme no interior do tubo de reação após a inversão do mesmo em 180 $^{\circ}$ (Figura 7) e considerados negativos se o gel não continuasse firme no fundo do tubo. Neste último caso, a concentração de endotoxina era $<$ 0,250 EU/mL.



Figura 7 - Resultado positivo para determinação de endotoxina.

No controle negativo não haverá formação do gel para que o teste seja considerado válido.

No controle positivo deve haver a formação de gel e os resultados da curva de concentração de endotoxina devem ser:

- O ponto da curva 0,25 EU/mL obrigatoriamente gelifica;
- Os pontos 0,125 EU/mL e 0,06 EU/mL podem ou não gelificar;
- O ponto 0,03 EU/mL não deve gelificar.

Com estes resultados o reagente LAL é considerado aprovado para uso. Esta avaliação do LAL deve ser feita sempre que mudar o lote do LAL e/ou endotoxina.

2.3 Procedimento para validação

2.3.1 Limpeza do tanque

O procedimento de limpeza descrito abaixo ocorreu após aguardar o tempo máximo em que o tanque pode permanecer sujo. Neste caso, segundo informação da Divisão de Formulação este tanque permanece sujo por no máximo três dias até a sua lavagem.

Inicialmente o tanque foi desmontado. O tanque e as peças removíveis foram rinsadas com PW por aproximadamente 5 minutos. Após esta rinsagem, uma solução de NaOH 0,5 mol/L foi borrifada no tanque e nas peças removíveis, a cada 15 min, sendo este procedimento repetido por 4 vezes. Após este tempo o tanque e as peças foram enxaguados com PW por 5 minutos em abundância. Em seguida ocorre a rinsagem com WFI 90°C por 4 min e 30 segundos. Na rotina este tempo é de 5 minutos, porém, para simular o pior caso na validação do processo de limpeza, este tempo foi diminuído em 10%.

Ao final o tanque foi montado, preenchido com WFI a 90°C e as amostragens foram realizadas. Os operadores que realizam este procedimento são treinados e utilizaram uniformes e luvas cirúrgicas.

2.3.2 Metodologia analítica escolhida para determinação de resíduo de produto

A determinação de carbono orgânico total (TOC) foi escolhida por ser uma técnica não específica permitindo assim quantificar os resíduos antes e após o procedimento de limpeza. Apesar de não específica, a determinação de TOC possui

elevada sensibilidade, rápido tempo de determinação e baixo custo quando comparada a outros métodos.

A Figura 8 mostra que a determinação de TOC, por ser uma técnica não específica, permite determinar contaminação de diferentes fontes, fornecendo informações não apenas do princípio ativo, mas também sobre agente de limpeza, subprodutos e excipientes. Assim, a determinação de TOC é considerada para validação de limpeza como uma técnica que avalia um pior caso já que o resultado da determinação é considerado como proveniente apenas do princípio ativo apesar de na realidade ser a mistura de todos os resíduos que possuem carbono orgânico na amostra.

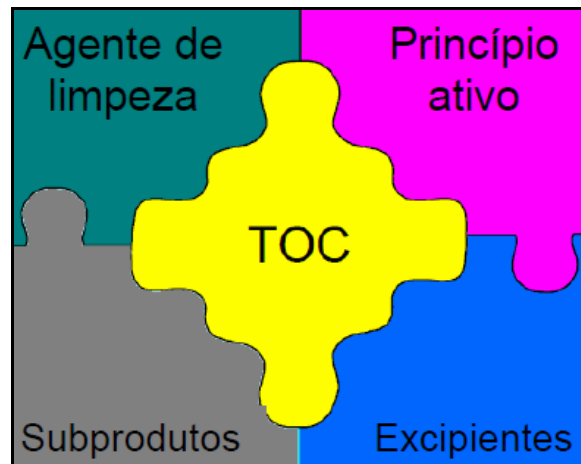


Figura 8 - Determinação de TOC - técnica não-específica (Fonte: JENKINS, 1996)

O uso do equipamento de TOC para a determinação de resíduos em validação de limpeza tem crescido sendo necessário que as substâncias avaliadas sejam solúveis em água.

Como as vacinas Hib e Meningite A e C são solúveis em água, a dosagem de resíduo de produtos foi realizada pela quantificação de TOC nas amostras de *swab* e rinsagem final.

O aparelho de TOC utilizado estava devidamente calibrado e qualificado. Além desta qualificação, o método para determinação do produto selecionado como pior caso também estava validado.

2.3.3 Seleção do produto contaminante “pior caso”

Para a execução desta validação foi selecionado o pior caso em relação ao contaminante a ser processado uma vez que o tanque não é de uso dedicado.

Neste mesmo tanque pode ser formulada a vacina Hib e a vacina Meningite A e C. Para determinação de qual destas vacinas seria o “pior caso” foram realizados os procedimentos descritos a seguir a fim de testar a solubilidade destas em água purificada. A solubilidade é um parâmetro avaliado para definição de pior caso, pois quanto mais solúvel for o produto em água mais fácil é sua remoção. Foi utilizada água purificada, pois conforme procedimento de limpeza é com este tipo de água que é realizada a primeira rinsagem no tanque.

2.3.3.1 Limpeza do material para o teste de avaliação do produto “pior caso”

Uma amostra de material do tanque, denominada de “coupon” (Figura 9), foi fixada através de uma pinça hemostática de acordo com a Figura 10. Este material possui a mesma constituição do tanque: aço inox 316L.



Figura 9 - "Coupon" de aço inox 316L

O “coupon” foi colocado no interior de um becher de 250mL contendo uma barra magnética. Todo o sistema foi rinsado com PW. Após esta etapa, foram adicionados 200 mL de solução de detergente neutro Extran 2% v/v no becher e o sistema foi agitado por um agitador magnético, em agitação de 480 rpm por 10 min. O enxágüe foi realizado por 10 enchimentos deste becher com PW. Em seguida o “coupon” foi seco em estufa.

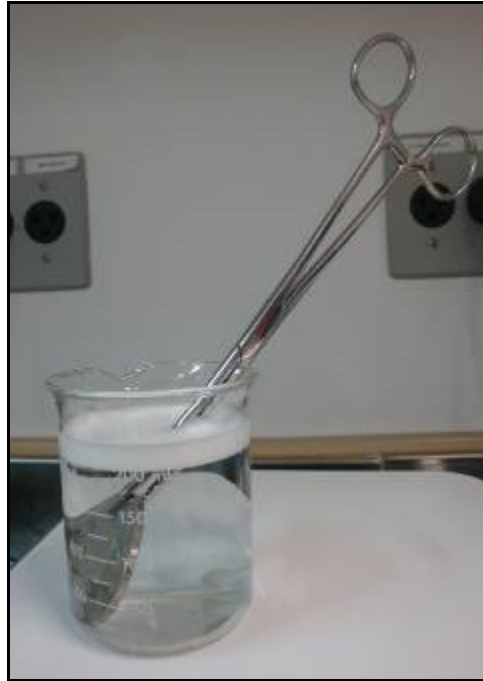


Figura 10 - Modelo para limpeza do “coupon”

2.3.3.2 Avaliação da solubilidade dos produtos

O “coupon” foi impregnado com 200 μ L de vacina Hib e seco em estufa por no mínimo 24h de 56°C a 58°C. Após este período o “coupon” foi retirado da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente.

Adicionou-se 150 mL de PW em um becher de 250 mL e posicionou-se sobre um agitador magnético conforme Figura 11. A Figura 12 mostra como o “coupon” foi inserido na água evitando contato desta com a pinça hemostática. Após 10 segundos com a agitação de 180 rpm, o “coupon” e a solução de extração são separados a fim de interromper o processo e em seguida a última foi analisada em triplicata em relação ao TOC.



Figura 11 - Modelo para teste de solubilidade e recuperação por água de rinsagem



Figura 12 - Posicionamento do "coupon"

2.3.3.3 Controle positivo

Foi adicionado 150 mL de PW a um becher de 250mL limpo. Em seguida 200 µL de vacina em teste foi adicionado diretamente na água. O becher foi posicionado sobre o agitador magnético para agitação a 180 rpm.

O “coupon” foi então inserido na água em agitação, de forma que a pinça hemostática não entrasse em contato com a água. Aguardou-se 10 ou 30 segundos e então o becher foi retirado interrompendo o processo. Em seguida, a água foi analisada, em triplicata, em relação ao TOC.

2.3.3.4 Controle negativo

Foi adicionado 150 mL de PW a um becher de 250 mL limpo. Em seguida o becher foi posicionado sobre o agitador magnético para agitação a 180 rpm. O “coupon” foi então inserido na água em agitação, de forma que a pinça hemostática não entrasse em contato com a água. Aguardou-se 10 ou 30 segundos e então o becher foi retirado interrompendo o processo. Em seguida a água foi analisada, em triplicata, em relação ao TOC.

Este procedimento foi repetido para vacina Meningite A e C. Foram realizadas três corridas utilizando o mesmo lote das vacinas a serem testadas. Para comparação da solubilidade entre vacina Hib e vacina Meningite A e C, o procedimento descrito acima foi repetido com 30 segundos. Desta forma foram obtidos resultados para cada vacina no tempo de 10 segundos e no tempo de 30 segundos. Como estas vacinas são muito solúveis em água houve a necessidade de realizar este teste em tempos diferentes para comparação e confirmação dos resultados.

2.3.3.5 Avaliação dos resultados

A avaliação dos resultados foi feita a partir dos cálculos realizados para cada tempo de extração de acordo com a Equação 2.6.

$$\%rec = \frac{Vrec - Cneg}{Cpos - Cneg} \times 100 \quad (2.6)$$

Onde:

%rec = Percentagem de recuperação

V rec = Valor de TOC obtido na recuperação

C neg = Média do valor de TOC obtido no controle negativo

C pos = Média do valor de TOC obtido no controle positivo

Para os diferentes tempos de exposição em cada produto, calculou-se separadamente a taxa de recuperação para cada valor de TOC obtido e a média de recuperação para cada corrida. A menor percentagem de recuperação calculada (%rec) entre as corridas é a considerada para comparação entre os produtos.

Por fim, comparam-se as taxas de recuperações obtidas por tempo de exposição e produto. A vacina considerada pior caso será aquela que possuir menor recuperação, pois esta é a vacina que mais fica aderida ao aço inoxidável, sendo mais difícil a sua remoção.

2.3.4 Validação do processo de limpeza de tanque multiuso

Para a validação deste processo de limpeza foram realizados três processos de formulação distintos, em diferentes dias. Desta forma obtiveram-se amostras distintas para as determinações analíticas. Todo o procedimento foi realizado três vezes para gerar um relatório de validação.

Para validação de limpeza de tanques dedicados ou não dedicados o resíduo do produto deve ser proveniente de uma produção, pois desta forma considera-se as condições em que estes itens e o resíduo foram expostos, por exemplo, temperatura, pressão, tempo de contato dentre outros fatores que podem aumentar a aderência e dispersão dos contaminantes.

2.3.4.1 Cálculo da área compartilhada pelos produtos

Antes do início da validação do processo de limpeza propriamente dito foi calculada a área compartilhada pelos produtos. Para este cálculo foi realizada a avaliação de todo material necessário para formulação das vacinas Hib e Meningite A e C. Calculou-se então a área em comum compartilhada para a formulação. Foi utilizado o programa *WebCalc* como auxílio nestes cálculos.

2.3.4.2 Critério de aceitação para o resíduo de produto e de agente de limpeza

Estes critérios foram calculados conforme descrito no item 1.2.3 do capítulo fundamentos teóricos. Com base nestes resultados foram realizados os ensaios de

recuperação para *swab* e água de rinsagem. De acordo com o item 3.1 verifica-se que a vacina Hib foi a considerada “pior caso”. Assim a avaliação dos percentuais de recuperação foi realizada apenas para esta vacina.

2.3.4.3 Correlação da concentração de polissacarídeo e medida de TOC

Os cálculos de limite para resíduo de produto fornecem a máxima concentração de polissacarídeo aceitável. Como as medidas das amostras serão em teor de carbono orgânico total e não em concentração de polissacarídeo, estes valores devem ser correlacionados. Esta conversão pode ser realizada através da equação da reta obtida a partir de uma curva de concentração de polissacarídeo *versus* medida de TOC. Com esta equação pode-se realizar a conversão do valor de TOC para polissacarídeo, e vice-versa. Para que na validação de limpeza já verificasse de imediato se o resultado de medida de TOC estaria no limite calculado, optou-se por converter o valor do limite de polissacarídeo para TOC.

Para construção da curva foram utilizados três lotes da vacina Hib: 096VZF002Z, 097VZF007Z e 097VZF008Z. Foram utilizadas 8 concentrações de cada lote da vacina, de forma a contemplar 50%, 100% e 150% dos valores dos limites calculados no passo C (item 3.2.2) para concentração de polissacarídeo nas amostras de *swab* e água de rinsagem.

Sabe-se que cada 0,5 mL de vacina Hib (01 dose) tem-se no mínimo 10 µg de polissacarídeo. A quantificação de polissacarídeo é realizada pelo controle de qualidade atestado através do certificado de análise deste produto. Os lotes 096VZF002Z, 097VZF007Z e 097VZF008Z utilizados para esta avaliação possuíam respectivamente 12,70 µg/dose, 13,93 µg/dose e 12,84 µg/dose de polissacarídeo. Adicionou-se 12 µL, 9 µL, 6 µL, 4 µL, 2 µL, 1 µL, 0,5 µL e 0,25 µL de cada lote da vacina em 20 mL de WFI para obtenção de 8 concentrações. As soluções foram preparadas com concentrações decrescentes para realização do teste de linearidade.

Cada solução foi analisada em triplicata para quantificação de TOC.

O gráfico Medida de TOC *versus* Concentração de polissacarídeo (µg/mL) foi construído a partir dos dados de medida de TOC, com desconto do valor do branco dos três lotes diferentes de vacina Hib analisados.

2.3.4.4 Ensaio de recuperação

Para o cálculo do fator de recuperação, deve se considerar os seguintes aspectos:

- Parte do tanque a testar – possibilidade do local mais difícil para amostrar;
- Tipo de superfície – quanto mais porosa a superfície menor será o fator de recuperação;
- Técnica de recuperação do resíduo – *Swab* ou rinsagem.

O método analítico foi desafiado em combinação com o método de amostragem utilizado, a fim de demonstrar que os contaminantes podem ser recuperados da superfície do equipamento e demonstrar o “nível” de recuperação e sua “consistência”. Por “nível” entende-se a percentagem do resíduo que pode ser recuperada no meio em que está aderido, e por “consistência”, a dispersão dos valores encontrados para amostragens repetidas feitas sob a mesma condição. Esse estudo de recuperação é necessário antes da avaliação dos resultados provenientes das amostras de validação, pois estes devem ser corrigidos pelos fatores de recuperação.

Estudos de recuperação foram realizados para a amostragem adotada na validação. Os estudos foram realizados pela amostragem direta (*swab*) e indireta (água de rinsagem) para avaliação da recuperação de produto uma vez que estes métodos são os utilizados para avaliação de resíduo de produto após a limpeza. Já para avaliação da recuperação de agente de limpeza foi utilizada apenas a amostragem indireta, pois esta é a amostragem utilizada para verificar resíduo de agente de limpeza após o tanque ser limpo.

A determinação foi realizada em triplicata e apenas considerou-se a técnica de amostragem adequada quando o produto teve quantidade superior a 75% da quantidade teórica. Resultados negativos podem ser uma consequência de uma metodologia de amostragem inadequada.

❖ *Swab*

A percentagem de recuperação do resíduo de produto por parte do *swab* foi 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).

Neste caso 5 quadrantes com 25 cm² fabricados com o mesmo material do tanque foram utilizados para contaminação de quantidade conhecida de vacina Hib. Um outro quadrante não é contaminado para realização do controle negativo da placa. O modelo mostrado na Figura 13 é exemplo de uma placa com 3 quadrantes.

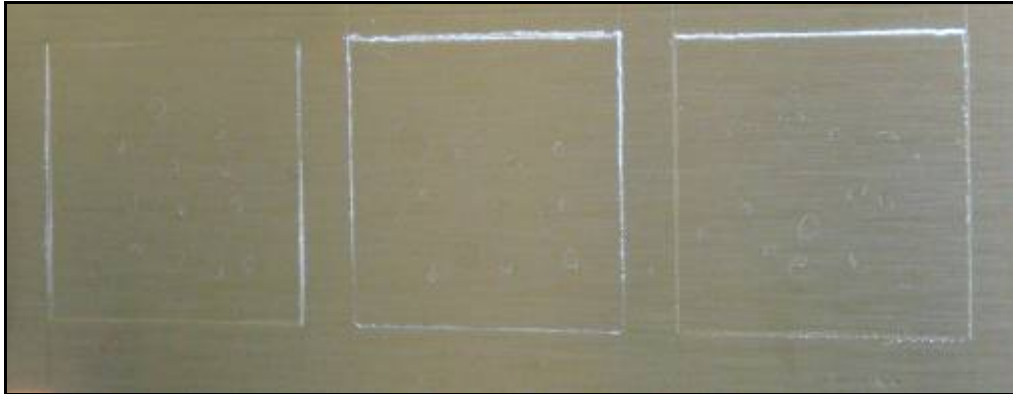


Figura 13 – Quadrantes em aço inox utilizados para teste de recuperação por *swab*

a. Limpeza do material para o teste

Cada placa com 3 quadrantes de 25 cm² foi rinsada com PW por 1 minuto. A placa foi limpa com movimentos unidirecionais com um *wiper* embebido com solução de detergente neutro (Extran 2% v/v). Após esta limpeza, a placa foi rinsada novamente com PW corrente por aproximadamente 5 minutos e por fim colocada em estufa a 56°C - 58°C para secagem.

b. Avaliação da recuperação

Foi preparada uma solução de vacina de forma que 200 µL a ser adicionado à placa contivesse a quantidade calculada no passo B do critério de aceitação mais rigoroso para resíduo de produto (item 3.2.2) multiplicado por 25 cm² que é a área de um quadrante. Foi escolhido o volume de 200 µL, pois esta é uma quantidade ideal para contaminar uma área de 25 cm².

No passo B determina-se o limite de aceitação do contaminante por área compartilhada (µg/cm²). Assim, obteve-se 0,0046 µg/cm² que para 25 cm² resulta em 0,115 µg de polissacarídeo.

A cada 200 µL da solução a ser utilizada para impregnação deve-se ter 0,115 µg de polissacarídeo, ou seja, em 1000 µL tem-se 0,575 µg de polissacarídeo. Desta forma preparou-se a solução de 0,575 µg/mL de polissacarídeo.

O lote de vacina utilizado para esta avaliação de recuperação possuía 12,70 µg/dose, ou seja, 25,4 µg/mL. Esta solução foi diluída com WFI para obtenção de 0,575 µg/mL de polissacarídeo.

Cada superfície de 25 cm² foi impregnada com 200 µL da solução de 0,575 µg/mL de polissacarídeo. A placa foi seca em estufa por, no mínimo, 24h a 56°C - 58°C. Após este tempo a placa foi retirada da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente.

Um frasco com 20 mL de WFI foi utilizado para adição dos *swabs*. A amostragem foi realizada utilizando 2 *swabs* por superfície. O primeiro *swab* foi embebido em frasco com 20mL de WFI antes de realizar a amostragem no ponto (Figura 14). O segundo *swab* foi passado seco no ponto de amostragem. Esta amostragem foi realizada de acordo com os movimentos do anexo A. Os dois *swabs* foram inseridos no mesmo frasco que continha 20 mL de água.

A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por, no mínimo, dez vezes. A determinação de TOC foi realizada em triplicata.

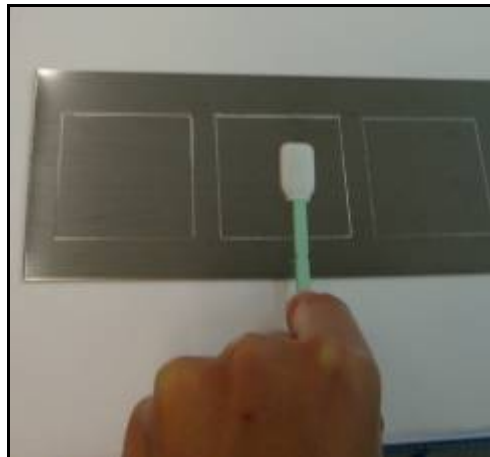


Figura 14 - Amostragem com *swab*

c. Controle positivo do *swab*

Um frasco com 20 mL de WFI foi utilizado para adição de dois *swabs*. Foi adicionado 200 µL da solução de 0,575 µg/mL de polissacarídeo diretamente sob um dos *swabs*. Os dois *swabs* foram inseridos no frasco. A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por, no mínimo, dez vezes. A determinação de TOC foi realizada em triplicata.

d. Controle negativo da placa

A placa foi limpa e seca em estufa por, no mínimo, 24h a 56°C - 58°C. Após este tempo a placa foi retirada da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente.

Um frasco com 20 mL de WFI foi utilizado para adição dos *swabs*. A amostragem foi realizada utilizando 2 *swabs* por superfície. O primeiro *swab* foi embebido em frasco com 20 mL de WFI antes de realizar a amostragem no ponto. O segundo *swab* foi passado seco no ponto de amostragem. Esta amostragem foi realizada de acordo com os movimentos do anexo A. Os dois *swabs* foram inseridos no mesmo frasco que continha 20 mL de água.

A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por, no mínimo, dez vezes. A determinação de TOC foi realizada em triplicata.

e. Controle negativo Swab

Um frasco com 20 mL de WFI foi utilizado para adição de dois *swabs*. Os dois *swabs* foram inseridos no frasco. A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por, no mínimo, dez vezes. A determinação de TOC foi realizada em triplicata.

f. Avaliação dos resultados

$$\%rec = \frac{(V_{rec} - C_{neg.swab}) - (C_{neg.placa} - C_{neg.swab})}{C_{pos.swab} - C_{neg.swab}} \times 100 =$$

$$\%rec = \frac{V_{rec} - C_{neg.placa}}{C_{pos.swab} - C_{neg.swab}} \times 100 \quad (2.7)$$

Onde:

%rec = Percentagem de recuperação

V_{rec} = Valor de TOC obtido na recuperação

C_{neg.placa} = Média do valor de TOC obtido no controle negativo da superfície da placa

C_{pos.swab} = Média do valor de TOC obtido no controle positivo do *swab*

$C_{neg.swab}$ = Média do valor de TOC obtido no controle negativo do *swab*

Para avaliação da taxa de recuperação do produto, foi calculada separadamente a taxa de recuperação para cada quadrante analisado. A menor percentagem de recuperação calculada (% rec) foi a considerada como resultado final. Calculou-se também o desvio padrão entre os resultados de recuperação.

❖ Água de rinsagem

No caso de água de rinsagem foram pesquisados resíduos de produto e agente de limpeza, assim realizou-se o teste de recuperação nestes dois resíduos.

Para o cálculo do fator de recuperação da água de rinsagem foram realizados testes com “coupon” conforme item 2.3.3, porém a análise realizada foi a determinação de TOC para o caso de resíduo de produto e determinação de pH para agente de limpeza.

a. Limpeza do material para o teste

Os “coupons” foram limpos e secos conforme descrito no item 2.3.3.1. Este mesmo procedimento de limpeza de “coupon” é realizado para os que serão utilizados no teste com resíduo de produto e no teste com agente de limpeza.

b. Avaliação da recuperação

A quantidade de vacina utilizada no teste com resíduo de produto foi a calculada no passo B do critério de aceitação mais rigoroso multiplicado por 25 cm², conforme descrito para amostragem com *swab*.

Para este teste foram utilizados 6 “coupons”. Cada um de 5 “coupons” foi impregnado com 200 µL da solução de 0,575 µg/mL de polissacarídeo e seco em estufa por no mínimo 24h a 56°C - 58°C. Um “coupon” não foi impregnado, pois foi utilizado como controle negativo. Após este período os “coupons” foram retirados da estufa e aguardou-se até que atingissem a temperatura ambiente.

Para determinação da recuperação por rinsagem foi utilizado o mesmo método descrito no item 2.3.3.2, porém aumentou-se o tempo de contato para 5 minutos, pois este é o tempo de rinsagem utilizado no processo real.

Já para o teste com agente de limpeza, os 5 “coupons” foram impregnados com a quantidade de NaOH calculada no passo B do critério de aceitação mais

rigoroso multiplicado por 25 cm². Neste passo calculou-se 23,14 µg/cm² como limite, que para 25 cm² resulta em 578,52 µg de NaOH.

Esta quantidade de NaOH deve estar em 200 µL da solução a ser utilizada para impregnação. Assim, em 1000 µL tem-se 2,9 mg. Preparou-se então uma solução de NaOH com concentração de 2,9 mg/mL.

Preparou-se a solução através da diluição de 3,6 mL de NaOH 1M em um balão volumétrico de 50 mL que resulta em uma concentração de 0,072 M que corresponde a 2,9 mg/mL.

Cada “coupon” foi impregnado com 200 µL da solução 2,9 mg/mL de NaOH. O “coupon” não foi seco, pois no processo real a solução de NaOH é retirada logo após as aplicações, não estando portanto seca.

Para esta determinação da recuperação também foi utilizado o método descrito no item 2.3.3.2, porém aumentou-se o tempo de contato para 5 minutos, pois este é o tempo de rinsagem utilizado no processo real. Neste caso a análise realizada foi a determinação de pH, também em triplicata.

c. Controle positivo

O controle positivo foi realizado conforme item 2.3.3.3 utilizando 200 µL da solução de 0,575 µg/mL de polissacarídeo para o caso de resíduo de produto e 200 µL da solução de a 2,9 mg/mL de NaOH para o caso de agente de limpeza. O tempo de contato foi alterado para 5 minutos nos dois casos.

d. Controle negativo da placa

O controle negativo foi realizado conforme item 2.3.3.4 apenas para o caso de recuperação do produto alterando o tempo de contato para 5 minutos. Não houve a necessidade da realização deste teste para agente de limpeza, pois na determinação de pH não há o desconto do controle negativo.

e. Avaliação dos resultados

A avaliação dos resultados foi feita a partir dos cálculos realizados de acordo com a Equação 2.8.

$$\%rec = \frac{Vrec - Cneg}{Cpos - Cneg} \times 100 \quad (2.8)$$

Onde:

%rec = Percentagem de recuperação

V rec = Valor de TOC ou concentração de NaOH (agente de limpeza) obtido na recuperação

C neg = Média do valor de TOC obtido no controle negativo. Para o caso do agente de limpeza excluiu-se o termo C neg na equação.

C pos = Média do valor de TOC ou concentração de NaOH (agente de limpeza) obtido no controle positivo

Conforme descrito anteriormente para recuperação por *swab*, a taxa de recuperação foi calculada separadamente para cada “coupon” analisado. A menor percentagem de recuperação calculada (% rec) foi a considerada como resultado final. Calculou-se também o desvio padrão entre os resultados de recuperação.

O menor valor de recuperação obtido é o que deve ser utilizado para correção dos valores de TOC encontrados na análise de água de rinsagem e *swab*. Esta correção se faz necessária, pois não se consegue recuperar 100% do resíduo das superfícies. Desta forma o resultado de TOC que obteve-se na validação está correspondendo a menor percentagem de recuperação calculada e deve-se, então convertê-lo para 100%.

Para o caso de pH não é necessária a correção uma vez que, conforme o item 2.3.4.9, o critério utilizado para validação está bem abaixo do calculado. No caso do agente de limpeza NaOH, este teste de recuperação foi necessário apenas para verificar e demonstrar que o resíduo de agente de limpeza pode ser removido do material aço inox 316 L com eficiência.

2.3.4.5 Definição do “holding time”

Para validação de limpeza de tanques é exigido a definição e avaliação dos “holding times”. Estes tempos são definidos pela produção uma vez que têm impacto direto na sua demanda e cronograma. De acordo com o setor de formulação o “holding time” sujo seria de 3 dias e o “holding time” limpo de 30 dias. Estes tempos são acrescidos de 1 dia para simulação do pior caso.

2.3.4.6 Definição dos pontos de amostragem

Foram considerados mais críticos os pontos na parede interior do tanque, no fundo e no pescador uma vez que estes possuem contato direto com o produto. Na Figura 15 observa-se a localização exata dos pontos:

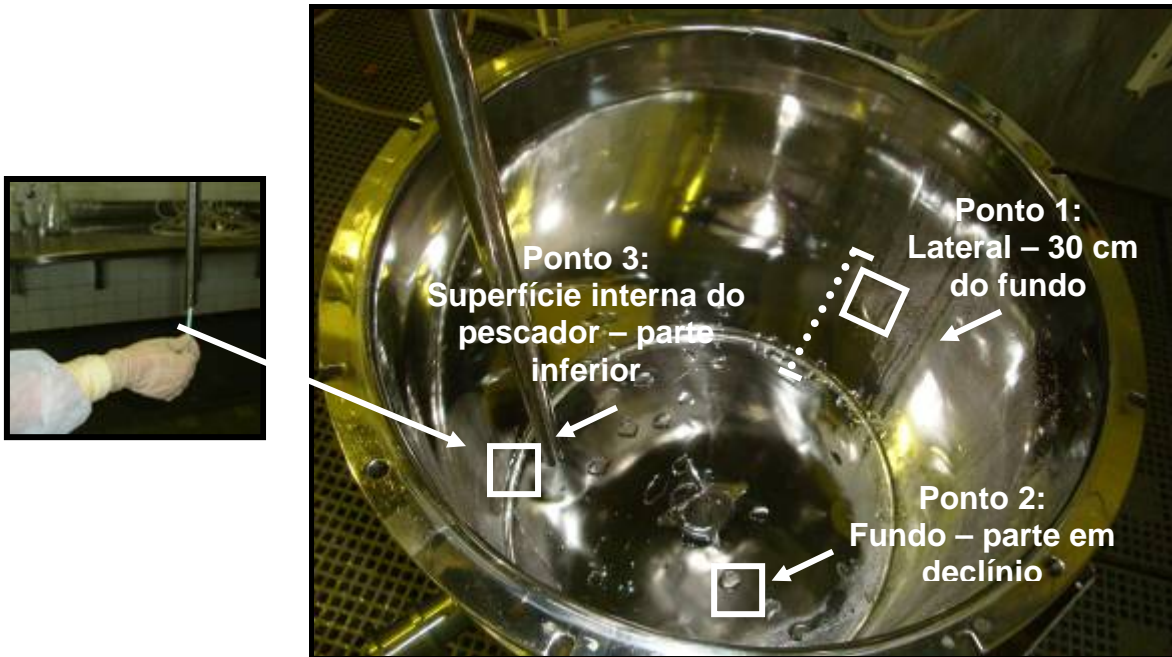


Figura 15 - Pontos de amostragem do tanque utilizando swab

- 1 - A parte interior do tanque possui por igual a mesma criticidade em relação a resíduo, desta forma, apenas como padronização sempre foi amostrada no seu lado esquerdo quando o tanque visto de frente a altura de 30 cm do fundo do tanque.
- 2 - O fundo do tanque sempre foi amostrado na parte mais inclinada. O tanque possui este desenho para melhor aproveitamento do produto no envase.
- 3 - Já o pescador foi amostrado na parte inferior, em sua superfície interna.

Todas estas amostras foram realizadas com swab em uma área de 25 cm². Para amostragem de água de rinsagem o tanque foi montado e preenchido com WFI conforme descrito no item 2.3.4.8.

2.3.4.7 Impregnação do tanque com endotoxina

Por tratar-se de vacina, logo um injetável, durante a validação de limpeza há a necessidade de se demonstrar uma redução de 1000 vezes na concentração de endotoxina contida no tanque a ser limpo. Desta forma, como a água de rinsagem

final tem como limite de endotoxina a concentração de 0,250 EU/mL, é necessário que o tanque possua uma concentração igual ou superior a 250 EU/mL antes de sua limpeza.

Após a formulação da vacina o tanque foi disponibilizado com resíduo do processo para contaminação com endotoxina. A solução de endotoxina utilizada para esta impregnação possuía a concentração de $4,5 \times 10^6$ EU/mL e foi aplicada nas superfícies internas do tanque com auxílio de um borrifador.

Esta concentração foi calculada de acordo com o volume de WFI a ser utilizada na rinsagem final do tanque. Neste caso, o volume de rinsagem foi 150 L e o volume da solução de desafio foi 10 mL, assim foi realizado o seguinte cálculo para determinar qual a concentração da solução de desafio necessária para contaminação:

$$C_{des} = \frac{300 \times V_{rin}}{V_{des}} \quad (2.9)$$

Onde:

C_{des} = Concentração da solução de desafio (EU/mL)

V_{des} = Volume final da solução de desafio (mL)

V_{rin} = Volume de WFI utilizado na rinsagem final (mL)

300 EU/mL = Concentração de endotoxina a ser adicionada ao material

Assim:

$$C_{des} = \frac{300 \times 150.000}{10} = 4,5 \times 10^6 \text{ EU / mL}$$

Após o cálculo de concentração, a solução de endotoxina foi preparada a partir de frascos de endotoxina de validação contendo 10.000.000 EU/frasco.

A endotoxina é liofilizada e então foi reconstituída conforme recomendação do fabricante com 1000 μ L de água apirogênica e agitada em vórtex, em alta velocidade, por 5 minutos. Como seriam necessárias $4,5 \times 10^7$ EU, foram reconstituídos 5 frascos de endotoxina 10.000.000 EU. Destes frascos, 4 tiveram os 1000 μ L transferidos para um frasco apirogênico e do outro frasco apenas 500 μ L foi

utilizado para completar a quantidade de endotoxina (45.000.000 EU). Esta quantidade de endotoxina teve seu volume completado para 10 mL obtendo-se assim uma solução de $4,5 \times 10^6$ EU/mL.

2.3.4.8 Amostragens para avaliação do procedimento de limpeza

Após a contaminação com endotoxina sob o resíduo de vacina Hib restante da formulação foram aguardados os 4 dias simulando o pior caso do tempo máximo que este tanque pode permanecer sujo.

Antes da realização do procedimento de limpeza pelos operadores do setor de formulação foram realizadas as seguintes amostragens:

- ❖ Avaliação da recuperação da solução desafio quanto à concentração de Endotoxina – Amostra A

Com esta avaliação verifica-se a concentração de endotoxina que pode ser recuperada do material, e assim se o tanque realmente foi contaminado com a quantidade de endotoxina necessária para posterior demonstração de redução de 1000 vezes em sua concentração.

O tanque foi preenchido com 150L de WFI, pressurizado e uma amostra de 20mL foi retirada através do pescador em um frasco apirogênico para o teste de endotoxina. Este foi o volume utilizado para o cálculo da concentração de endotoxina que deveria ser impregnada no tanque. Após a retirada da amostra A o procedimento de limpeza do tanque foi realizado, conforme item 2.3.1, pelos operadores do setor de formulação. Estas amostras foram analisadas enquanto os operadores realizavam o procedimento de limpeza, pois no caso de contaminação com endotoxinas (300 EU/mL), a recuperação no tanque contaminado deve ser superior a 250 EU/mL para que o teste de validação possa ter continuidade.

Os operadores foram avaliados em relação aos procedimentos de limpeza do tanque seguindo procedimento específico. Foram observados também os tempos de rinsagens, concentração da solução de limpeza, tipos de água utilizada em cada rinsagem e outros parâmetros críticos.

Ao término da limpeza foram coletadas as seguintes amostras:

❖ Inspeção visual

Após a realização do processo de limpeza, o tanque foi avaliado quanto a resíduos de contaminante visíveis a olho nu.

❖ Avaliação do resíduo do produto com *swab* – Amostra B

Foram realizadas amostragens com *swabs* em 25 cm² na superfície dos pontos selecionados no item 2.3.4.6: lateral, fundo e pescador. Conforme ensaio de recuperação descrito no item 2.3.4.4 foram utilizados 2 *swabs* por ponto de amostragem.

Para amostragem o primeiro *swab* foi embebido em frasco com 20 mL de WFI antes de realizar a amostragem no ponto. O segundo *swab* foi passado seco no ponto de amostragem. Esta amostragem foi realizada de acordo com os movimentos do anexo A. Os dois *swabs* foram inseridos no mesmo frasco que continha 20 mL de água.

A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por no mínimo 10 vezes e foi realizada a determinação de TOC para avaliação do resíduo de produto.

Nesta avaliação também foi realizado o controle negativo do *swab*, para que este valor seja descontado do valor de TOC encontrado para o resíduo do produto. Assim foram colocados 2 *swabs* em um frasco com 20 mL de água e realizada a determinação de TOC.

❖ Avaliação dos resíduos de produto e agente de limpeza através de método de rinsagem – Amostra C

O tanque foi preenchido 150 L com WFI e foi realizada uma amostragem desta água de rinsagem em frasco de polipropileno de 500 mL. Antes de realizar a amostragem este frasco foi rinsado três vezes com WFI evitando assim interferentes no valor de TOC. A determinação de TOC foi realizada para avaliação do resíduo de produto.

Além da determinação de TOC também foi realizada a determinação de pH e condutividade na água de rinsagem.

- ❖ Avaliação da concentração de Endotoxina – Amostra D

Após a amostragem acima foi coletado 20 mL desta mesma água de rinsagem em frasco apirogênico para teste de endotoxina.

- ❖ Avaliação da água para injetáveis (WFI) – Amostras E e F

Foi realizada a amostragem diretamente do ponto de WFI utilizada durante o processo de limpeza para controle das análises realizadas na água de rinsagem.

Neste caso foram retiradas a amostra E, em frasco de polipropileno de 500 mL, para avaliação de TOC, pH e condutividade e a amostra F, em frasco apirogênico de 20 mL, para avaliação da concentração de endotoxina.

Antes de realizar a amostragem o frasco de polipropileno foi rinsado três vezes com WFI evitando assim interferentes no valor de TOC.

Após a retirada das amostras B a F, o tanque foi armazenado na sala de material do setor de formulação. Na rotina de produção os tanques ficam armazenados nesta sala após a limpeza até sua utilização. Assim foram aguardados 31 dias simulando o pior caso do tempo máximo que este tanque pode permanecer armazenado após limpeza até sua esterilização.

Ao término deste tempo o tanque foi avaliado através das seguintes amostragens:

- ❖ Avaliação do resíduo do produto com *swab* – Amostra G

A amostragem foi a mesma realizada para Amostra B.

- ❖ Avaliação dos resíduos de produto e agente de limpeza através de método de rinsagem – Amostra H

A amostragem foi a mesma realizada para Amostra C.

- ❖ Avaliação da concentração de Endotoxina – Amostra I

A amostragem foi a mesma realizada para Amostra D.

- ❖ Avaliação da água para injetáveis (WFI) – Amostras J e K

A amostragem foi a mesma realizada para as Amostras E e F.

Após o término da avaliação do “holding time limpo”, o tanque foi levado à autoclave. Para avaliar a interferência do vapor utilizado durante a esterilização do tanque e detecção de algum resíduo que poderia ter desprendido das paredes deste, foi necessária a realização da análise do condensado.

Após a esterilização foram realizadas as seguintes amostragens para avaliação do condensado:

- ❖ Avaliação de resíduos através do método de rinsagem – Amostra L

A amostragem foi a mesma realizada para Amostra C.

- ❖ Avaliação da concentração de Endotoxina – Amostra M

A amostragem foi a mesma realizada para Amostra D.

- ❖ Avaliação da água para injetáveis (WFI) – Amostras N e O

A amostragem foi a mesma realizada para as Amostras E e F.

No anexo B encontra-se uma tabela com o resumo das amostragens realizadas durante uma corrida de validação.

2.3.4.9 Critérios de aceitação

- ❖ Inspeção visual

Após a realização do processo de limpeza, o tanque não deve conter resíduos de contaminante visíveis a olho nu.

- ❖ Parâmetros de resíduo de produto e agente de limpeza

Os resíduos de produto e agente de limpeza encontrados devem estar dentro do limite calculado para *swab* e/ou água de rinsagem no item 3.2.2.

Para o resíduo de produto o limite calculado mais criterioso foi o de 0,01% da dose limite. Assim, o resíduo de produto máximo permitido é de 0,006 µg/mL de polissacarídeo (TOC = 3,49 µg/mL) para amostras de *swab* e 0,0007 µg/mL de polissacarídeo (TOC = 0,49 µg/mL) para água de rinsagem. Os valores encontrados devem ser corrigidos pela menor percentagem de recuperação encontrada conforme descrito no item 3.2.1.

Já para resíduo de agente de limpeza o limite encontrado mais criterioso foi de 3,5 µg/mL de NaOH dado calculado pelo critério que considera o limite de aceitação de 10 ppm do produto contaminante no produto subsequente. Neste caso

considera-se o agente de limpeza como o produto contaminante. O limite foi calculado apenas para água de rinsagem, pois esta é a amostra utilizada para detecção deste resíduo. Transformando este limite em pH tem-se:

$$3,5 \mu\text{g/mL} = 3,5 \text{ mg/L} = 0,0035 \text{ g/L} = 8,78 \times 10^{-5} \text{ mol/L de NaOH}$$

$$\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$$

$$\text{pOH} = -\log 8,78 \times 10^{-5} = 4,06$$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14,00$$

$$\text{pH} = 14,00 - \text{pOH} = 14,00 - 4,06 = 9,94$$

Assim 9,94 seria o valor máximo de pH que poderia ser encontrado na água de rinsagem, porém o critério adotado para agente de limpeza é pH de 5 a 7 conforme o da WFI, segundo USP. Este critério foi escolhido para maior segurança em relação ao produto uma vez que não há evidências de que este resíduo de agente de limpeza (NaOH) na concentração encontrada para o limite calculado não interferirá quimicamente ao entrar em contato com a vacina.

❖ Parâmetros físico-químicos

Para que este processo fosse considerado validado, os resultados de análise nas amostras de água de rinsagem final, análise do condensado e WFI deveriam obedecer aos limites especificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Critérios de aceitação

Parâmetro Testado	Água de rinsagem final e análise do condensado	WFI
pH	5-7	5-7
Condutividade à 25°C(μS/cm)	< 1,3 (1º estágio USP) ou < 2,1 (2º estágio USP)	< 1,3 (1º estágio USP) ou < 2,1 (2º estágio USP)
TOC (ppb)	3,49 μg/mL (<i>swab</i>) 0,49 μg/mL (água de rinsagem)	< 500
Concentração de Endotoxina (EU/mL)	< 0,250	< 0,250

(Fonte: USP XXXIII).

Como nesta validação é necessário demonstrar a despirogenização do tanque, deve ser observada uma redução, na água de rinsagem final, de 1000 vezes na concentração inicial de endotoxina. Assim é necessário que a concentração inicial recuperada do tanque antes do processo de limpeza esteja > 250 EU/mL e após este processo seja < 0,250 EU/mL.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção do produto contaminante “pior caso”:

Vacina Hib x Vacina Meningite A e C

3.1.1 Avaliação da solubilidade da Vacina Hib

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os resultados de avaliação de solubilidade da vacina Hib. Com este teste foi avaliada a dificuldade de remoção da vacina impregnada em “coupon” de aço inoxidável 316L. Para as três corridas desta avaliação foi utilizada vacina Hib produzida em Bio-Manguinhos lote 096VZF002Z. Nestas tabelas também estão as percentagens de recuperação calculadas pela Equação 2.6 citada no item 2.3.3.

Tabela 3 - Extração por 30 segundos da Vacina Hib

Vacina Hib	Exposição em 30 segundos								
	1ª corrida			2ª corrida			3ª corrida		
	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)
Produto	22,9	22,8	21,5	22,6	22,8	23,0	21,4	21,4	21,7
Controle Negativo	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Média do Controle Negativo	0,3			0,3			0,3		
Controle Positivo	22,4	22,7	24,2	22,4	22,7	24,2	22,4	22,7	24,2
Média do Controle Positivo	23,1			23,1			23,1		
% recuperação	99,1	98,7	93,0	97,8	98,7	99,6	92,5	92,6	93,9
Média da % recuperação	96,9			98,7			93,0		

Tabela 4 - Extração por 10 segundos da Vacina Hib

Vacina Hib	Exposição em 10 segundos								
	1ª corrida			2ª corrida			3ª corrida		
	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)
Produto	16,0	16,0	16,0	15,5	15,7	15,6	15,4	15,6	15,7
Controle Negativo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Média do Controle Negativo	0,1			0,1			0,1		
Controle Positivo	22,8	24,4	21,5	22,8	24,4	21,5	22,8	24,4	21,5
Média do Controle Positivo	22,9			22,9			22,9		
% recuperação	69,7	69,7	69,7	67,5	68,4	68,0	67,1	68,0	68,4
Média da % recuperação	69,7			68,0			67,8		

Para o cálculo destas recuperações foram considerados os valores dos controles positivo e negativo. Os valores de medida de TOC obtidos para estes controles se repetem nas três corridas, pois os ensaios foram realizados no mesmo dia, porém com diferentes soluções do produto.

No tempo de exposição de 30 segundos as primeira, segunda e terceira corridas apresentaram, respectivamente, recuperação média de 96,9%, 98,7% e 93,0%.

Já no tempo de exposição de 10 segundos, as primeira, segunda e terceira corridas apresentaram, respectivamente, recuperação média de 69,7%, 68,0% e 67,8%.

Esta diferença nos resultados de recuperação entre os tempos de 10 e 30 segundos era esperada uma vez que em 10 segundos o “coupon” permaneceu menos tempo em contato com a água para extração da vacina. Assim em 10 segundos tem-se uma menor recuperação do que em 30 segundos.

Para a comparação entre os produtos considera-se a menor porcentagem de recuperação obtida, sendo assim 93,0% para o tempo de exposição de 30 segundos e 67,8% para o tempo de 10 segundos.

3.1.2 Avaliação da solubilidade da Vacina Meningite A e C

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os resultados de avaliação de solubilidade de vacina Meningite A e C. Com este teste foi avaliada a remoção da vacina impregnada em “coupon” de aço inoxidável 316L. Para as três corridas desta avaliação foi utilizada vacina Meningite A e C produzida em Bio-Manguinhos lote 089VMH011Z. Nestas tabelas também estão as percentagens de recuperação calculadas pela Equação 2.6 citada no item 2.3.3.

Tabela 5 - Extração por 30 segundos da Vacina Meningite A e C

Vacina Meningite A e C	Exposição em 30 segundos								
	1ª corrida			2ª corrida			3ª corrida		
	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)
Produto	16,5	16,5	16,5	16,8	16,9	16,7	16,2	16,2	16,2
Controle Negativo	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Média do Controle Negativo	0,2			0,2			0,2		
Controle Positivo	15,8	17,5	16,1	15,8	17,5	16,1	15,8	17,5	16,1
Média do Controle Positivo	16,5			16,5			16,5		
% recuperação	100,2	100,2	100,2	102,0	102,5	101,4	98,4	98,4	98,4
Média da % recuperação	100,2			102,0			98,4		

Tabela 6 - Extração por 10 segundos da Vacina Meningite A e C

Vacina Meningite A e C	Exposição em 10 segundos								
	1ª corrida			2ª corrida			3ª corrida		
	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)	Medida 1 (µg/mL)	Medida 2 (µg/mL)	Medida 3 (µg/mL)
Produto	12,1	12,0	12,2	14,7	14,7	14,7	11,9	11,9	11,9
Controle Negativo	0,281	0,263	0,269	0,281	0,263	0,269	0,281	0,263	0,269
Média do Controle Negativo	0,271			0,271			0,271		
Controle Positivo	15,6	16,9	16,4	15,6	16,9	16,4	15,6	16,9	16,4
Média do Controle Positivo	16,3			16,3			16,3		
% recuperação	73,8	73,1	74,4	90,0	90,0	90,0	72,5	72,5	72,5
Média da % recuperação	73,8			90,0			72,5		

Para o cálculo destas recuperações também foram considerados os valores dos controles positivo e negativo. Como no teste de avaliação da vacina Hib, os valores de medida de TOC obtidos para estes controles também se repetem nas três corridas, pois os ensaios foram realizados no mesmo dia com diferentes soluções do produto.

No tempo de exposição de 30 segundos as primeira, segunda e terceira corridas apresentaram, respectivamente, recuperação média de 100,2%, 102,0% e 98,4%.

Já no tempo de exposição de 10 segundos, as primeira, segunda e terceira corridas apresentaram, respectivamente, recuperação média de 73,8%, 90,0% e 72,5%.

Esta diferença nos resultados de recuperação entre os tempos de 10 e 30 segundos era esperada conforme explicado anteriormente, pois estes valores são diretamente afetados pelo tempo em que o “coupon” permanece em contato com a água para extração da vacina. Assim, conforme observado para vacina Hib, em 10 segundos tem-se uma menor recuperação do que em 30 segundos.

Para a comparação entre os produtos considera-se a menor porcentagem de recuperação obtida, sendo assim 98,4% para o tempo de exposição de 30 segundos e 72,6% para o tempo de 10 segundos.

A Tabela 7 mostra um resumo dos resultados obtidos para as recuperações das vacinas analisadas.

Tabela 7 - Resumo dos resultados das recuperações

Resumo dos resultados			
Parâmetro		Menor % recuperação	
		30s	10s
Material Aço-inox 316L	% recuperação – produto I (Vacina Hib)	93,0	67,8
	% recuperação – produto II (Vacina Meningite A e C)	98,4	72,5

Este teste foi realizado em dois tempos de extração para confirmação dos resultados uma vez que estas vacinas são muito solúveis em água. Comparando a menor porcentagem de recuperação no tempo de 30 segundos tem-se 93,0% para vacina Hib e 98,4% para vacina Meningite A e C o que mostra que a vacina Hib é a de mais difícil remoção, por apresentar menor percentual de recuperação que a vacina Meningite A e C, permanecendo assim mais aderida ao aço inox 316L. Quando se compara o tempo de exposição de 10 segundos tem-se 67,8% como a menor recuperação encontrada para vacina Hib e 72,5% para vacina Meningite A e C o que confirma a afirmação anterior de que a vacina Hib é a de mais difícil remoção, sendo assim considerada como “pior caso”.

Desta forma, a validação de limpeza dos tanques utilizados na formulação da vacina Hib e vacina Meningite A e C foi realizada após os processos de formulação de vacina Hib.

3.2 Validação do processo de limpeza de tanque multiuso

3.2.1 Cálculo da área compartilhada pelos produtos

A área utilizada nos cálculos para definição de critério de aceitação não pode ser a apenas a área do tanque, pois nesse caso, não considera a contaminação que

o produto pode sofrer ao longo de toda produção. Foi utilizada a área compartilhada pelas vacinas Hib e Meningite A e C em sua rota de fabricação. Neste caso existem alguns materiais utilizados na formulação que também são multiuso. A área compartilhada pelos produtos foi então calculada conforme mostrado no anexo C. As fórmulas utilizados contemplam a área total dos itens, e não apenas a área lateral que estaria em contato direto com o produto. Esta prática de extrapolação de área é frequentemente utilizada pelas indústrias farmacêuticas uma vez que o valor de critério de aceitação calculado permanece mais rigoroso, ou seja, ocorre a simulação de um pior caso. De acordo com a fórmula 1.3 a área calculada é utilizada no denominador de uma divisão sendo assim quanto maior a área, menor será o critério calculado. Como resultado final obteve-se a área total de 22.767 cm².

3.2.2 Critério de aceitação para o resíduo de produto e de agente de limpeza

Primeiramente, foi necessário o cálculo deste critério de aceitação, pois os ensaios de recuperação são realizados a partir do limite de aceitação para resíduo de produto.

Conforme descrito no capítulo fundamentos teóricos, dois critérios podem ser utilizados na determinação do limite de aceitação de resíduos de produtos e de agentes de limpeza, são eles:

1. Presença de não mais que 0,01% da dose limite no caso de injetáveis, onde o fator de segurança é igual a 0,0001.
2. Não mais que 10 ppm do contaminante no produto subsequente.

Seguem abaixo os cálculos necessários para determinação de cada um destes critérios, sendo que o mais crítico, severo, foi utilizado como critério de aceitação da validação.

❖ **Critério 1 - 0,01% da dose limite**

Passo A: Determinação do limite de aceitação máximo em µg do contaminante no produto subsequente.

$$A = \frac{0,001 \times MTD_{CONT} \times MBS_{SUBS}}{M_{AX} TD_{SUBS}} \quad (1.1)$$

Para o caso de vacina devem ser feitas algumas considerações antes do cálculo utilizando a Equação 1.1:

- O fator de segurança utilizado deve ser 0,0001 uma vez que este é o utilizado para parenterais, injetáveis;

- Uma dose da vacina selecionada como pior contaminante foi considerada como a mínima dose diária do contaminante (MTD_{cont}). Assim, o MTD_{cont} será igual a 1 dose de vacina Hib que corresponde a 10 μ g de polissacarídeo.

- A máxima dose diária do subsequente ($M_{ax} TD_{subs}$) foi considerada como uma dose de vacina Meningite A e C. Esta vacina é o produto subsequente à vacina Hib e uma dose é representada por 0,5 mL.

Para o cálculo deste passo A resta apenas o tamanho mínimo do lote subsequente (MBS_{subs}). Foi feita uma análise do tamanho de todos os lotes produzidos e verificou-se que o menor lote formulado de vacina Meningite A e C foi de 52.685 mL.

Com estas considerações, o critério foi calculado:

$$A = \frac{0,0001 \times 10 \mu g \times 52.685 mL}{0,5 mL} = 105,4 \mu g$$

No caso de resíduo de solução de limpeza (NaOH), como a MTD_{cont} não é conhecida, utilizou-se o NOEL - nível de efeito não observado. O NOEL, expresso em mg, substitui os termos “0,001 x MTD_{cont} ” no cálculo do Passo A e foi calculado pela Equação 1.2:

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times 70}{2000} \quad (1.2)$$

Neste caso o valor 70 que corresponde ao peso médio de uma pessoa adulta é substituído pelo peso médio de uma criança de 4 kg já que se trata de vacina Hib que é aplicada em crianças de 2 meses a 5 anos.

Para o NaOH 0,5 mol/L, o LD₅₀ oral em ratos é > 90 mL/Kg (MSDS, Iowa State University, 2009). Como o NaOH possui a concentração de 0,5 mol/L, calculou-se a LD₅₀ em mg/Kg.

Solução de NaOH 0,5 mol/L = 2% m/v =

2g de NaOH ----- 100mL

x ----- 90 mL x = 1,8 g = 1800 mg

$$NOEL = \frac{1800 \text{ mg} \times 4}{2000} = 3,6 \text{ mg}$$

Assim:

$$A = \frac{3,6 \text{ mg} \times 52.685 \text{ mL} \times 1000 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right)}{0,5 \text{ mL}} = 3,8 \times 10^8 \mu\text{g}$$

Passo B: Determinação do limite de aceitação do contaminante por área compartilhada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

$$B = \frac{A}{SRSA} \quad (1.3)$$

Utilizando a Equação 1.3 calculou-se o passo B para o resíduo de produto da seguinte forma:

$$B = \frac{105,4 \mu\text{g}}{22.767 \text{ cm}^2} = 4,6 \times 10^{-3} \mu\text{g} / \text{cm}^2$$

Já para o resíduo de agente de limpeza calculou-se:

$$B = \frac{3,8 \times 10^8 \mu\text{g}}{22.767 \text{ cm}^2} = 1,67 \times 10^4 \mu\text{g} / \text{cm}^2$$

Passo C: Determinação do limite de aceitação do contaminante na amostra analisada ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}} \quad (1.4)$$

O passo C para o resíduo de produto foi calculado pela Equação 1.4:

Swab:

$$C = \frac{4,6 \times 10^{-3} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right) \times 25 \text{ cm}^2}{20 \text{ mL}} = 0,006 \mu\text{g} / \text{mL}$$

Água de rinsagem:

$$C = \frac{4,6 \times 10^{-3} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right) \times 22.767 \text{ cm}^2}{150.000 \text{ mL}} = 0,0007 \mu\text{g} / \text{mL}$$

Já para o resíduo de agente de limpeza foi calculado apenas em relação a amostra de água de rinsagem, pois é nesta que foi realizada a determinação deste resíduo.

Água de rinsagem:

$$C = \frac{1,67 \times 10^4 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right) \times 22.767 \text{ cm}^2}{150.000 \text{ mL}} = 2534,6 \mu\text{g} / \text{mL}$$

❖ **Critério 2 - O limite de aceitação de 10 ppm do produto contaminante no produto subsequente**

Para o cálculo deste critério, somente o passo A se altera conforme Equação 1.5:

$$A = 10 \times MBS_{SUBS} \quad (1.5)$$

$$A = 10 \left(\frac{\mu g}{mL} \right) \times 52.685 mL = 526.850 \mu g$$

Os passos B e C são calculados, respectivamente pelas Equações 1.3 e 1.4.

$$B = \frac{526.850 \mu g}{22.767 cm^2} = 23,1 \mu g / cm^2$$

Swab:

$$C = \frac{23,1 \left(\frac{\mu g}{cm^2} \right) \times 25 cm^2}{20 mL} = 28,9 \mu g / mL$$

Água de rinsagem:

$$C = \frac{23,1 \left(\frac{\mu g}{cm^2} \right) \times 22.767 cm^2}{150.000 mL} = 3,5 \mu g / mL$$

Na Tabela 8 está descrito um resumo dos valores obtidos como critérios:

Tabela 8 - Resumo dos critérios calculados

Tipo de resíduo	Critérios	Amostragem	
		Swab	Água de rinsagem
Produto	0,01% da dose limite	0,006 µg/mL de polissacarídeo	0,0007 µg/mL de polissacarídeo
	10 ppm do produto contaminante no produto subseqüente	28,9 µg/mL de polissacarídeo	3,5 µg/mL de polissacarídeo
Agente de limpeza	0,01% da dose limite	n/a	2.534,6 µg/mL de NaOH
	10 ppm do produto contaminante no produto subseqüente	n/a	3,5 µg/mL de NaOH

O limite calculado de resíduo de produto e selecionado como critério de aceitação é o de 0,006 µg/mL de polissacarídeo para amostras de *swab* e 0,0007 µg/mL de polissacarídeo para água de rinsagem, por serem os menores, ou seja, os mais criteriosos. Estes limites estão acima do limite de detecção e o limite de quantificação do método que são respectivamente 0,0001 µg/mL de polissacarídeo e 0,0005 µg/mL de polissacarídeo para dosagem de resíduo, o que torna este método aceitável para ser utilizado nesta validação de limpeza.

Para o limite de resíduo de agente de limpeza foi considerado o valor relacionado ao critério de 10 ppm do produto contaminante no produto subseqüente que é 3,5 µg/mL de NaOH, por ser o mais criterioso.

3.2.3 Correlação da concentração de polissacarídeo e medida de TOC

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos de concentração de TOC para as diferentes concentrações de polissacarídeo do lote de vacina Hib 096VZF002Z analisado. Cada resultado de determinação de TOC obtido é denominado de “valor real”. Este valor foi corrigido pela medida do branco que corresponde à análise da água utilizada nas diluições da vacina.

Tabela 9 - Resultados para Vacina Hib lote 096VZF002Z

Volume de Hib (µL) avolumado para 20 mL	Polissacarídeo (µg)	Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)	Real (µg/mL)	Real - branco (µg/mL)	Média
12	0,3048	0,0152	9,08	9,06	9,06
12	0,3048	0,0152	9,07	9,05	
12	0,3048	0,0152	9,08	9,06	
9	0,2286	0,0114	6,82	6,80	6,81
9	0,2286	0,0114	6,82	6,80	
9	0,2286	0,0114	6,84	6,82	
6	0,1524	0,0076	4,44	4,42	4,44
6	0,1524	0,0076	4,46	4,44	
6	0,1524	0,0076	4,47	4,45	
4	0,1016	0,0051	3,14	3,12	3,13
4	0,1016	0,0051	3,15	3,13	
4	0,1016	0,0051	3,16	3,14	
2	0,0508	0,0025	1,56	1,54	1,56
2	0,0508	0,0025	1,55	1,53	
2	0,0508	0,0025	1,63	1,61	
1	0,0254	0,0013	0,759	0,74	0,76
1	0,0254	0,0013	0,764	0,75	
1	0,0254	0,0013	0,799	0,78	
0,5	0,0127	0,0006	0,544	0,53	0,52
0,5	0,0127	0,0006	0,517	0,50	
0,5	0,0127	0,0006	0,544	0,53	
0,25	0,0064	0,0003	0,395	0,38	0,39
0,25	0,0064	0,0003	0,403	0,38	
0,25	0,0064	0,0003	0,427	0,41	
0	N/A	N/A	0,0174	N/A	0,02
0	N/A	N/A	0,0176	N/A	
0	N/A	N/A	0,0183	N/A	

O lote de vacina Hib 097VZF007Z também foi utilizado neste teste. A Tabela 10 mostra os resultados obtidos de concentração de TOC para as diferentes concentrações de polissacarídeo do analisado. Os valores obtidos também foram corrigidos pelo branco da análise para retirada de interferência do TOC da água utilizada.

Tabela 10 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF007Z

Volume de Hib (µL) avolumado para 20 mL	Polissacarídeo (µg)	Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)	Real (µg/mL)	Real - branco (µg/mL)	Média
12	0,3343	0,0167	9,11	9,01	9,03
12	0,3343	0,0167	9,13	9,03	
12	0,3343	0,0167	9,15	9,05	

Tabela 11 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF007Z (continuação)

Volume de Hib (µL) avolumado para 20 mL	Polissacarídeo (µg)	Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)	Real (µg/mL)	Real - branco (µg/mL)	Média
9	0,2507	0,0125	7,12	7,02	7,05
9	0,2507	0,0125	7,21	7,11	
9	0,2507	0,0125	7,11	7,01	
6	0,1672	0,0084	4,49	4,39	4,38
6	0,1672	0,0084	4,50	4,40	
6	0,1672	0,0084	4,44	4,34	
4	0,1114	0,0056	4,22	4,12	4,13
4	0,1114	0,0056	4,22	4,12	
4	0,1114	0,0056	4,25	4,15	
2	0,0557	0,0028	1,63	1,53	1,52
2	0,0557	0,0028	1,61	1,51	
2	0,0557	0,0028	1,61	1,51	
1	0,0279	0,0014	0,714	0,62	0,62
1	0,0279	0,0014	0,705	0,61	
1	0,0279	0,0014	0,745	0,65	
0,5	0,0139	0,0007	0,557	0,46	0,48
0,5	0,0139	0,0007	0,565	0,47	
0,5	0,0139	0,0007	0,616	0,52	
0,25	0,0070	0,0003	0,317	0,22	0,25
0,25	0,0070	0,0003	0,356	0,26	
0,25	0,0070	0,0003	0,372	0,28	
0	N/A	N/A	0,081	N/A	0,10
0	N/A	N/A	0,103	N/A	
0	N/A	N/A	0,105	N/A	

O terceiro lote de vacina Hib utilizado foi o 097VZF008Z. Os resultados obtidos de concentração de TOC para as diferentes concentrações de polissacarídeo do analisado estão indicados na Tabela 11. Os valores obtidos também foram corrigidos pela medida do branco.

Tabela 12 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF008Z

Volume de Hib (µL) avolumado para 20 mL	Polissacarídeo (µg)	Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)	Real (µg/mL)	Real - branco (µg/mL)	Média
12	0,3082	0,0154	8,68	8,58	8,58
12	0,3082	0,0154	8,67	8,57	
12	0,3082	0,0154	8,68	8,58	
9	0,2311	0,0116	7,48	7,38	7,38
9	0,2311	0,0116	7,49	7,39	
9	0,2311	0,0116	7,47	7,37	

Tabela 13 - Resultados para Vacina Hib lote 097VZF008Z (continuação)

Volume de Hib (µL) avolumado para 20 mL	Polissacarídeo (µg)	Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)	Real (µg/mL)	Real - branco (µg/mL)	Média
6	0,1541	0,0077	4,44	4,34	4,36
6	0,1541	0,0077	4,46	4,36	
6	0,1541	0,0077	4,48	4,38	
4	0,1027	0,0051	3,42	3,32	3,35
4	0,1027	0,0051	3,43	3,33	
4	0,1027	0,0051	3,49	3,39	
2	0,0514	0,0026	1,75	1,65	1,69
2	0,0514	0,0026	1,88	1,78	
2	0,0514	0,0026	1,73	1,63	
1	0,0257	0,0013	0,737	0,64	0,64
1	0,0257	0,0013	0,734	0,64	
1	0,0257	0,0013	0,738	0,64	
0,5	0,0128	0,0006	0,608	0,51	0,57
0,5	0,0128	0,0006	0,694	0,60	
0,5	0,0128	0,0006	0,699	0,60	
0,25	0,0064	0,0003	0,252	0,16	0,17
0,25	0,0064	0,0003	0,265	0,17	
0,25	0,0064	0,0003	0,280	0,18	
0	N/A	N/A	0,081	N/A	0,10
0	N/A	N/A	0,103	N/A	
0	N/A	N/A	0,105	N/A	

Na Tabela 12 encontra-se um resumo dos resultados de análises obtidos para diferentes concentrações permitindo assim a construção do gráfico e avaliação da correlação entre concentração de polissacarídeo e medida de TOC:

Tabela 14 - Resumo dos resultados

Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)			Real - branco (µg/mL)		
096VZF002Z	097VZF007Z	097VZF008Z	096VZF002Z	097VZF007Z	097VZF008Z
0,0152	0,0167	0,0154	9,06	9,01	8,58
			9,05	9,03	8,57
			9,06	9,05	8,58
0,0114	0,0125	0,0116	6,80	7,02	7,38
			6,80	7,11	7,39
			6,82	7,01	7,37
0,0076	0,0084	0,0077	4,42	4,39	4,34
			4,44	4,40	4,36
			4,45	4,34	4,38

Tabela 15 - Resumo dos resultados (continuação)

Concentração de Polissacarídeo (µg/mL)			Real - branco (µg/mL)		
096VZF002Z	097VZF007Z	097VZF008Z	096VZF002Z	097VZF007Z	097VZF008Z
0,0051	0,0056	0,0051	3,12	4,12	3,32
			3,13	4,12	3,33
			3,14	4,15	3,39
0,0025	0,0028	0,0026	1,54	1,53	1,65
			1,53	1,51	1,78
			1,61	1,51	1,63
0,0013	0,0014	0,0013	0,74	0,62	0,64
			0,75	0,61	0,64
			0,78	0,65	0,64
0,0006	0,0007	0,0006	0,53	0,46	0,51
			0,50	0,47	0,60
			0,53	0,52	0,60
0,0003	0,0003	0,0003	0,38	0,22	0,16
			0,38	0,26	0,17
			0,41	0,28	0,18

A Figura 16 mostra o gráfico que foi construído com todas as medidas individuais, subtraindo-se o branco, e não somente com a média destas.

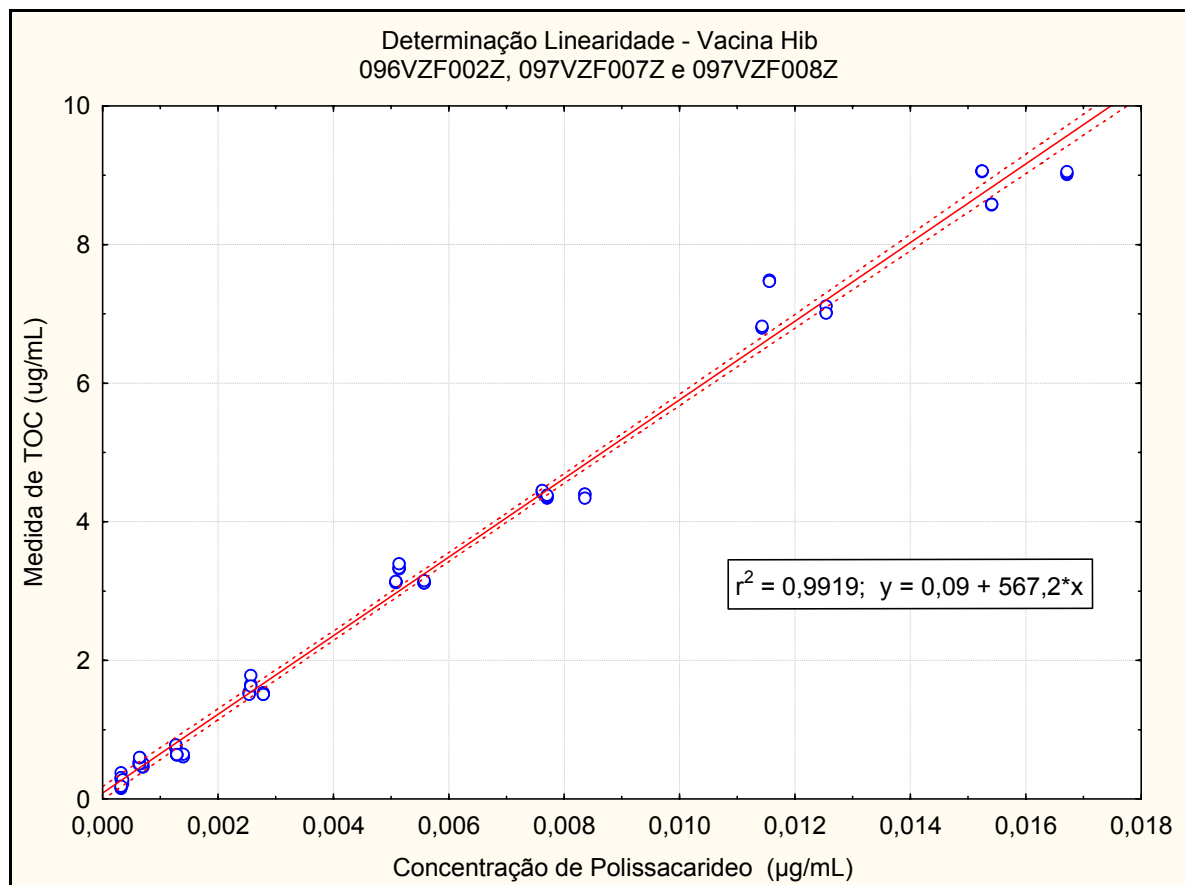


Figura 16 - Gráfico de concentração de polissacarídeo versus medida de TOC

Esta metodologia analítica promoveu uma medida correlacionável a uma concentração do contaminante. As variáveis apresentaram respostas lineares com um coeficiente de determinação para um modelo linear de $R^2 = 0,9919$ e equação $y = 567,2x + 0,09$ onde y representa as medidas de TOC e x a concentração de polissacarídeo expressa em $\mu\text{g/mL}$.

Através da equação da reta obtida, os limites calculados anteriormente foram transformados de concentração de polissacarídeo para TOC conforme Tabela 13.

Tabela 16 - Conversão do critério calculado

Critérios	Amostragem	
	Swab	Água de rinsagem
0,01% da dose limite	0,006 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo = 3,49 $\mu\text{g/mL}$ de TOC	0,0007 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo = 0,49 $\mu\text{g/mL}$ de TOC

Assim, o limite de resíduo de produto calculado como critério de aceitação para a validação de limpeza de tanque multiuso utilizado na formulação de vacina Hib e vacina Meningite A e C é de 3,49 $\mu\text{g/mL}$ de TOC para amostras de *swab* e 0,49 $\mu\text{g/mL}$ de TOC para água de rinsagem.

3.2.4 Ensaio de recuperação

3.2.4.1 Recuperação de produto (vacina Hib) através de amostragem por *swab* e água de rinsagem

Nas Tabelas 14 e 15 a seguir estão demonstrados os resultados dos valores de TOC obtidos para cada quadrante e “coupon” analisados, para controle positivo e controle negativo. Nestas tabelas também estão as percentagens de recuperação calculadas. Para o caso de recuperação por *swab* foi utilizada a Equação 2.7 citada no item 2.3.4 e para o caso de água de rinsagem foi utilizada a Equação 2.6 citada no item 2.3.3.

Tabela 17 - Resultados de recuperação de produto por *swab*

Aço inox 316 L	Vacina Hib (<i>Swab</i>)				
	Medida 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Medida 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Medida 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Média	% recuperação
Produto - Quadrante 1	4,71	4,70	4,72	4,71	98,6
Produto - Quadrante 2	4,68	4,72	4,70	4,70	98,4
Produto - Quadrante 3	4,74	4,74	4,77	4,75	99,6
Produto - Quadrante 4	4,74	4,71	4,75	4,73	99,2
Produto - Quadrante 5	4,74	4,72	4,78	4,75	99,5
Controle Positivo <i>Swab</i>	4,58	4,79	4,80	4,72	Menor valor de recuperação = 98,4%
Controle Negativo <i>Swab</i>	0,34	0,35	0,33	0,34	
Controle Negativo Placa	0,38	0,38	0,40	0,39	

Tabela 18 - Resultados de recuperação de produto por água de rinsagem

Aço inox 316 L	Vacina Hib (Água de rinsagem)				
	Medida 1 ($\mu\text{g/mL}$)	Medida 2 ($\mu\text{g/mL}$)	Medida 3 ($\mu\text{g/mL}$)	Média	% recuperação
Produto - "Coupon" 1	0,882	0,881	0,882	0,882	98,5
Produto - "Coupon" 2	0,892	0,899	0,904	0,898	100,9
Produto - "Coupon" 3	0,881	0,889	0,903	0,891	99,8
Produto - "Coupon" 4	0,889	0,894	0,891	0,891	99,9
Produto - "Coupon" 5	0,891	0,901	0,898	0,897	100,6
Controle Positivo	0,910	0,891	0,876	0,892	Menor valor de recuperação = 98,5%
Controle Negativo	0,194	0,192	0,194	0,193	

Os resíduos de vacina Hib foram recuperados dos quadrantes por *swab* com nível acima de 75% da quantidade teórica, o que demonstra que este resíduo pode

ser efetivamente recuperado do aço inox 316L através desta técnica. Além disso, o desvio padrão entre as recuperações foi de 0,5% mostrando assim a consistência do teste.

Este resíduo foi recuperado de cada “coupon”, através da rinsagem, também com nível acima de 75% da quantidade teórica, demonstrando que este resíduo também pode ser recuperado do aço inox 316L pela rinsagem. A rinsagem também foi uma técnica consistente uma vez que o desvio padrão entre as recuperações foi de 0,9%.

Os menores valores de recuperação foram utilizados para as correções necessárias nas amostras de validação, sendo 98,5% para amostras de água de rinsagem e 98,4% para amostras de *swab*.

3.2.4.2 Recuperação de agente de limpeza (NaOH) através de amostragem por água de rinsagem

Na Tabela 16 estão demonstrados os resultados dos valores de pH obtidos para cada “coupon” analisado e para o controle positivo. Nesta tabela também estão as percentagens de recuperação calculadas para cada “coupon”. Neste caso, a Equação 2.6 citada no item 2.3.3 foi utilizada para o cálculo da recuperação de hidróxido de sódio por água de rinsagem. Como as medidas foram feitas em pH, calculou-se o valor de pOH permitindo assim a transformação deste último em concentração de NaOH para cálculo da percentagem de recuperação deste agente de limpeza.

Tabela 19 - Resultados de recuperação de agente de limpeza por água de rinsagem

Aço inox 316 L	Agente de Limpeza – NaOH					
	“Coupon” 1	“Coupon” 2	“Coupon” 3	“Coupon” 4	“Coupon” 5	Controle Positivo
Medida 1 (pH)	9,860	9,861	9,858	9,860	9,861	9,869
pOH	4,140	4,139	4,142	4,140	4,139	4,131
Concentração Molar	$7,24 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-5}$	$7,21 \times 10^{-5}$	$7,24 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-5}$	$7,39 \times 10^{-5}$

Tabela 20 - Resultados de recuperação de agente de limpeza por água de rinsagem (continuação)

Aço inox 316 L	Agente de Limpeza – NaOH					
	“Coupon” 1	“Coupon” 2	“Coupon” 3	“Coupon” 4	“Coupon” 5	Controle Positivo
Medida 2 (pH)	9,866	9,86	9,857	9,859	9,858	9,867
pOH	4,134	4,14	4,143	4,141	4,142	4,133
Concentração Molar	$7,34 \times 10^{-5}$	$7,24 \times 10^{-5}$	$7,19 \times 10^{-5}$	$7,23 \times 10^{-5}$	$7,21 \times 10^{-5}$	$7,36 \times 10^{-5}$
Medida 3 (pH)	9,863	9,866	9,861	9,862	9,863	9,865
pOH	4,137	4,134	4,139	4,138	4,137	4,135
Concentração Molar	$7,29 \times 10^{-5}$	$7,34 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-5}$	$7,28 \times 10^{-5}$	$7,29 \times 10^{-5}$	$7,33 \times 10^{-5}$
Média Concentração Molar	$7,29 \times 10^{-5}$	$7,28 \times 10^{-5}$	$7,22 \times 10^{-5}$	$7,25 \times 10^{-5}$	$7,26 \times 10^{-5}$	$7,36 \times 10^{-5}$
% recuperação	99,1	98,9	98,1	98,5	98,6	Menor valor de recuperação = 98,1%

Neste caso verifica-se que o resíduo de NaOH pode ser removido com eficiência do aço inox 316L uma vez que o menor valor encontrado de recuperação foi de 98,1%. Não é necessária a correção de pH para amostras de água de rinsagem, pois o critério da USP a ser utilizado, 5 a 7, é muito mais crítico que o calculado.

O valor de desvio padrão foi de 0,4%, o que também demonstra que a recuperação de agente de limpeza pode ser feita com consistência.

3.2.5 Avaliação da limpeza para validação

Como Bio-Manguinhos atende a demanda do país através do PNI, suas produções são voltadas para demanda de pedidos efetivos. Este fato ocasionou a maior dificuldade encontrada no desenvolvimento deste trabalho que foi a demora para realização das três corridas de validação do processo de limpeza já que para esta validação é necessário o tanque com resíduo de processo de produção da vacina selecionada como pior caso.

A avaliação do processo de limpeza dos tanques ocorreu nos dias 27/07/2009, 21/09/2009 e 11/12/2009 após a formulação e o envase respectivamente dos lotes de vacina Hib 097VZF011Z, 099VZF016Z e 09UVZF023Z.

O tanque foi impregnado com solução de endotoxina preparada a partir de frascos de endotoxina com 10.000.000 EU/frasco. O lote de endotoxina utilizado foi EVV9414 com validade até janeiro de 2011. Após 4 dias (“holding time” sujo) foi realizado o procedimento de limpeza pelos operadores da área de formulação. Antes do procedimento de limpeza é realizada a amostragem para verificação da concentração de endotoxina. Os resultados obtidos para estas amostras estão apresentados a seguir:

Tabela 21 - Resultado da análise antes do procedimento de limpeza

Amostras / Tipo de análise	Resultados		
	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
A / Determinação da concentração de endotoxina	> 250 EU/mL	> 250 EU/mL	> 250 EU/mL

Nesta etapa realizou-se a verificação do LAL para uso. Foi utilizado o LAL lote Y1581L com validade até dezembro de 2011 e a endotoxina padrão lote EX72972 com validade até outubro de 2010. No controle negativo não houve formação do gel nas duas amostras. Na amostra A, em duplicata, ocorreu a formação de gel indicando assim a concentração de endotoxina > 250 EU/mL. Já no controle positivo ocorreu a formação de gel nas concentrações de endotoxina de 0,25 EU/mL, 0,125 EU/mL e 0,06 EU/mL. Não ocorreu formação de gel no ponto 0,03 EU/mL. Desta forma o LAL foi considerado aprovado para uso, tornando assim o teste válido. Não foi necessário repetir esta verificação uma vez que não ocorreram mudanças nos lotes de endotoxina e LAL durante as três corridas para validação desta limpeza.

Com estes resultados verifica-se que o tanque foi devidamente impregnado com endotoxina uma vez que a concentração desta substância antes da limpeza apresentava-se superior a 250 EU/mL.

Depois de retirada a amostra A foi realizado o procedimento de limpeza do tanque com resíduo de vacina Hib e endotoxina conforme descrito no item 2.3.1. Em seguida foram retiradas amostras que, de acordo com a Tabela 18, apresentaram os resultados a seguir.

Tabela 22 - Resultados das análises após o procedimento de limpeza

Amostras / Tipo de análise	Resultados		
	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
Inspeção visual: Presença de resíduos visíveis após a limpeza?	Não	Não	Não
B / Quantificação de resíduo de produto por TOC (<i>swab</i>)	Haste: 1,130 µg/mL Lateral: 1,060 µg/mL Fundo: 0,878 µg/mL	Haste: 0,443 µg/mL Lateral: 0,453 µg/mL Fundo: 0,456 µg/mL	Haste: 0,698 µg/mL Lateral: 0,945 µg/mL Fundo: 0,993 µg/mL
Controle negativo swab	0,544 µg/mL	0,231 µg/mL	0,485 µg/mL
C / Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH (água de rinsagem)	TOC: 0,0716 µg/mL Condutividade: 0,914 µS/cm pH: 5,498	TOC: 0,0905 µg/mL Condutividade: 0,636 µS/cm pH: 5,654	TOC: 0,2930 µg/mL Condutividade: 0,676 µS/cm pH: 5,313
D / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL
E (WFI) / Determinação de TOC, condutividade e pH	TOC: 0,0535 µg/mL Condutividade: 0,670 µS/cm pH: 5,576	TOC: 0,0543 µg/mL Condutividade: 0,648 µS/cm pH: 5,732	TOC: 0,1950 µg/mL Condutividade: 0,611 µS/cm pH: 5,362
F (WFI) / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL

A primeira verificação a ser realizada após a limpeza do tanque é a inspeção visual que para as três corridas apresentou resultado satisfatório uma vez que não foram encontrados resíduos visíveis.

Os valores de TOC para as amostras de *swab* foram corrigidos pelo controle negativo do *swab*, que considera também a interferência do valor de TOC da WFI. Já os relacionados à água de rinsagem foram corrigidos pelo valor de TOC encontrado na WFI utilizada na rinsagem.

Além disso, as amostras de *swab* e água de rinsagem devem ter os valores de TOC corrigidos também de acordo com a porcentagem de recuperação obtida. Para o caso do *swab* deve ser corrigida por 98,4%. Já o valor correspondente a água de rinsagem deve ser corrigido por 98,5%.

Seguem os resultados na Tabela 19 após todas as correções:

Tabela 23 - Correção dos resultados obtidos após o procedimento de limpeza

Amostra B / Quantificação de resíduo de produto por TOC (swab)	Resultados		
	Medida	Correção - Controle Negativo swab	Correção - Recuperação
1ª corrida	Haste: 1,130 µg/mL Lateral: 1,060 µg/mL Fundo: 0,878 µg/mL	Haste: 1,130 – 0,544 = 0,586 µg/mL Lateral: 1,060 – 0,544 = 0,516 µg/mL Fundo: 0,878 – 0,544 = 0,334 µg/mL	Haste: 0,586 x 100/98,4 = 0,596 µg/mL Lateral: 0,516 x 100/98,4 = 0,524 µg/mL Fundo: 0,334 x 100/98,4 = 0,339 µg/mL
2ª corrida	Haste: 0,443 µg/mL Lateral: 0,453 µg/mL Fundo: 0,456 µg/mL	Haste: 0,443 – 0,231 = 0,212 µg/mL Lateral: 0,453 – 0,231 = 0,222 µg/mL Fundo: 0,456 – 0,231 = 0,225 µg/mL	Haste: 0,212 x 100/98,4 = 0,215 µg/mL Lateral: 0,222 x 100/98,4 = 0,226 µg/mL Fundo: 0,225 x 100/98,4 = 0,229 µg/mL
3ª corrida	Haste: 0,698 µg/mL Lateral: 0,945 µg/mL Fundo: 0,993 µg/mL	Haste: 0,698 – 0,485 = 0,213 µg/mL Lateral: 0,945 – 0,485 = 0,460 µg/mL Fundo: 0,993 – 0,485 = 0,508 µg/mL	Haste: 0,213 x 100/98,4 = 0,216 µg/mL Lateral: 0,46 x 100/98,4 = 0,468 µg/mL Fundo: 0,508 x 100/98,4 = 0,516 µg/mL
Amostra C / Quantificação de resíduo de produto por TOC (água de rinsagem)	Resultados		
	Medida	Correção – Medida da WFI	Correção - Recuperação
1ª corrida	0,0716 µg/mL	0,0716 – 0,0535 = 0,018 µg/mL	0,018 x 100/98,5 = 0,0183 µg/mL
2ª corrida	0,0905 µg/mL	0,0905 – 0,0543 = 0,036 µg/mL	0,036 x 100/98,5 = 0,0366 µg/mL
3ª corrida	0,2930 µg/mL	0,2930 – 0,1950 = 0,098 µg/mL	0,098 x 100/98,5 = 0,0995 µg/mL

As amostras da haste, lateral e fundo do tanque retiradas por *swab* apresentaram nas três corridas o maior valor de resíduo de produto como 0,596 µg/mL. Este valor encontra-se dentro do critério de aceitação para resíduo de produto que é 3,49 µg/mL para *swab*. Já para amostra de água de rinsagem o maior valor corrigido obtido nas três corridas foi de 0,0995 µg/mL que também está abaixo do critério de aceitação para resíduo de produto que é 0,49 µg/mL para água de

rinsagem. As figuras 17 e 18 a seguir mostram respectivamente os gráficos de resíduo de produto por swab e água de rinsagem. Todos os resíduos encontrados permaneceram abaixo do limite especificado.

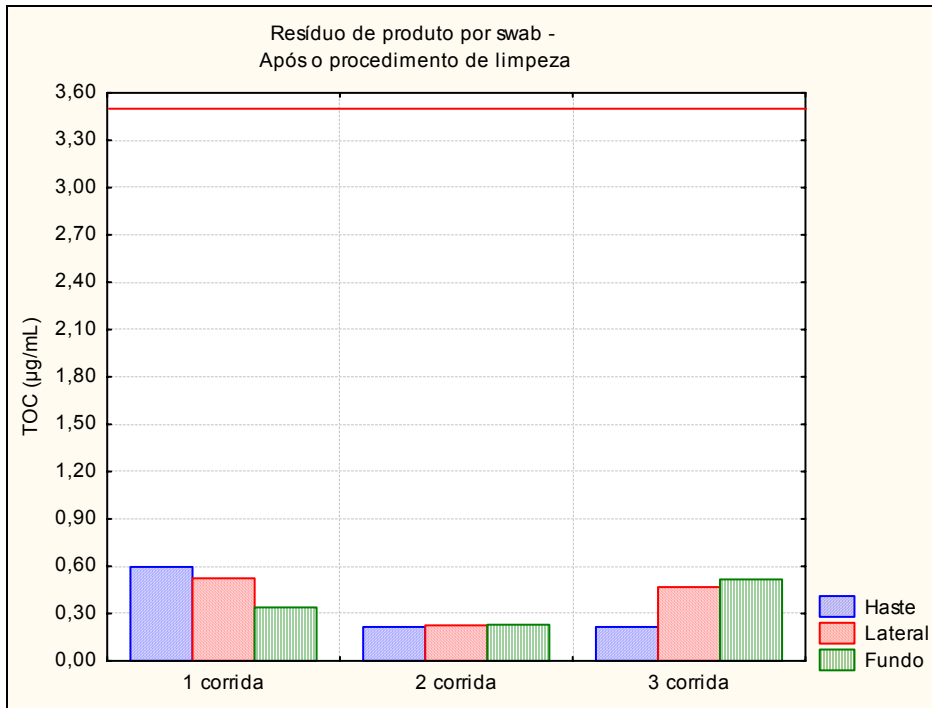


Figura 17 - Resíduo de produto por swab - após o procedimento de limpeza

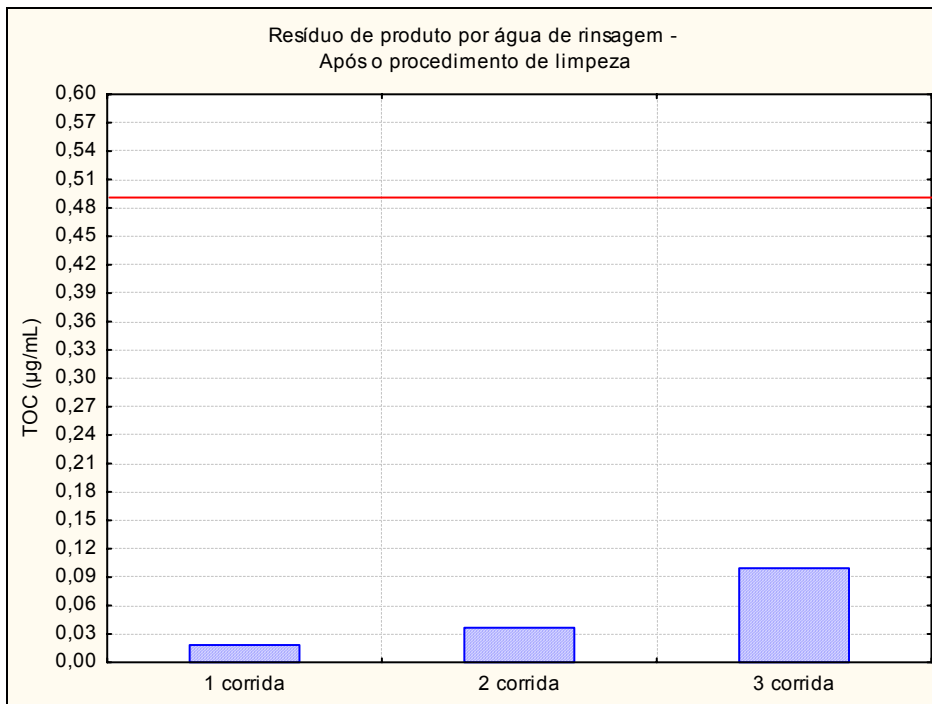


Figura 18 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após o procedimento de limpeza

Verificou-se que após o procedimento de limpeza não há resíduos de NaOH, agente utilizado para limpeza, uma vez que, conforme gráfico mostrado na figura 19, o pH da água de rinsagem ficou bem abaixo do limite calculado 9,94 e dentro do parâmetro USP que é pH de 5 a 7. Nas três corridas avaliadas obteve-se os resultados de 5,498, 5,654 e 5,313 respectivamente para as primeira, segunda e terceira corridas.

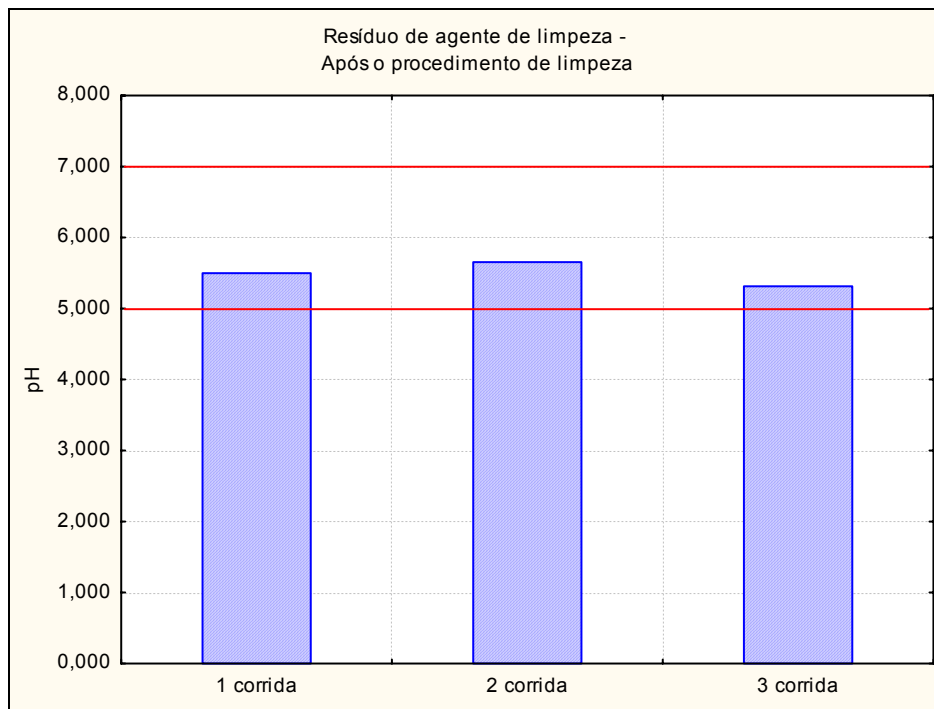


Figura 19 - Resíduo de agente de limpeza - após o procedimento de limpeza

Além disso, ocorreu a redução maior ou igual a 1000 vezes na concentração de endotoxina indicando assim a despirogenização química do tanque após o procedimento de limpeza.

Os valores de condutividade obtidos permaneceram dentro do especificado para as três corridas.

Observa-se também que a WFI utilizada para esta limpeza estava dentro dos parâmetros farmacopéicos para determinação de TOC, pH, condutividade e concentração de endotoxina podendo assim ser utilizada para seu fim.

Após a limpeza, o tanque permaneceu armazenado por 31 dias simulando assim o “holding time” do tanque limpo. Após este tempo novas amostras foram retiradas e apresentaram os resultados a seguir indicados na Tabela 20.

Tabela 24 - Resultados das análises após o “holding time” do tanque limpo

Amostras / Tipo de análise	Resultados		
	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
Inspeção visual: Presença de resíduos visíveis após “holding time” limpo?	Não	Não	Não
G / Quantificação de resíduo de produto por TOC (<i>swab</i>)	Haste: 0,866 µg/mL Lateral: 0,509 µg/mL Fundo: 0,602 µg/mL	Haste: 0,695 µg/mL Lateral: 0,726 µg/mL Fundo: 0,789 µg/mL	Haste: 1,050 µg/mL Lateral: 1,090 µg/mL Fundo: 0,715 µg/mL
Controle negativo swab	0,349 µg/mL	0,564 µg/mL	0,569 µg/mL
H / Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH (água de rinsagem)	TOC: 0,0777 µg/mL Condutividade: 0,678 µS/cm pH: 5,674	TOC: 0,2150 µg/mL Condutividade: 0,819 µS/cm pH: 5,806	TOC: 0,3420 µg/mL Condutividade: 0,769 µS/cm pH: 5,071
I / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL
J (WFI) / Determinação de TOC, condutividade e pH	TOC: 0,0286 µg/mL Condutividade: 0,797 µS/cm pH: 5,686	TOC: 0,1510 µg/mL Condutividade: 0,985 µS/cm pH: 5,775	TOC: 0,1930 µg/mL Condutividade: 0,647 µS/cm pH: 5,725
K (WFI) / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL

Os valores de TOC para amostras de *swab* e água de rinsagem também foram corrigidos da mesma forma citada anteriormente, visando a retirada de interferência do *swab*, da WFI e ainda corrigindo o valor obtido pela percentagem de recuperação conforme descrito na Tabela 21.

Tabela 25 - Correção dos resultados obtidos após o “holding time” do tanque limpo

Amostra G / Quantificação de resíduo de produto por TOC (swab)	Resultados		
	Medida	Correção - Controle Negativo swab	Correção - Recuperação
1ª corrida	Haste: 0,866 µg/mL Lateral: 0,509 µg/mL Fundo: 0,602 µg/mL	Haste: 0,866 – 0,349 = 0,517 µg/mL Lateral: 0,509 – 0,349 = 0,160 µg/mL Fundo: 0,602 – 0,349 = 0,253 µg/mL	Haste: 0,517 x 100/98,4 = 0,525 µg/mL Lateral: 0,16 x 100/98,4 = 0,163 µg/mL Fundo: 0,253 x 100/98,4 = 0,257 µg/mL
2ª corrida	Haste: 0,695 µg/mL Lateral: 0,726 µg/mL Fundo: 0,789 µg/mL	Haste: 0,695 – 0,564 = 0,131 µg/mL Lateral: 0,726 – 0,564 = 0,162 µg/mL Fundo: 0,789 – 0,564 = 0,225 µg/mL	Haste: 0,131 x 100/98,4 = 0,133 µg/mL Lateral: 0,162 x 100/98,4 = 0,165 µg/mL Fundo: 0,225 x 100/98,4 = 0,229 µg/mL
3ª corrida	Haste: 1,050 µg/mL Lateral: 1,090 µg/mL Fundo: 0,715 µg/mL	Haste: 1,050 – 0,569 = 0,481 µg/mL Lateral: 1,090 – 0,569 = 0,521 µg/mL Fundo: 0,715 – 0,569 = 0,146 µg/mL	Haste: 0,481 x 100/98,4 = 0,489 µg/mL Lateral: 0,521 x 100/98,4 = 0,530 µg/mL Fundo: 0,146 x 100/98,4 = 0,148 µg/mL
Amostra H / Quantificação de resíduo de produto por TOC (água de rinsagem)	Resultados		
	Medida	Correção – Medida da WFI	Correção - Recuperação
1ª corrida	0,0777 µg/mL	0,0777 – 0,0286 = 0,049 µg/mL	0,049 x 100/98,5 = 0,0498 µg/mL
2ª corrida	0,2150 µg/mL	0,2150 – 0,1510 = 0,064 µg/mL	0,064 x 100/98,5 = 0,0650 µg/mL
3ª corrida	0,3420 µg/mL	0,3420 – 0,1930 = 0,149 µg/mL	0,149 x 100/98,5 = 0,1510 µg/mL

A maior quantidade de resíduo de produto encontrado por amostragem com swab da haste, lateral e fundo do tanque foi de 0,530 µg/mL que encontra-se abaixo do critério calculado que é de 3,49 µg/mL. Já a maior quantidade deste mesmo resíduo amostrado por água de rinsagem foi de 0,1510 µg/mL que está abaixo de 0,49 µg/mL que é o critério calculado para este resíduo neste tipo de amostragem.

As figuras 20 e 21 a seguir mostram respectivamente os gráficos de resíduo de produto por swab e água de rinsagem. Todos os resíduos encontrados permaneceram abaixo do limite especificado.

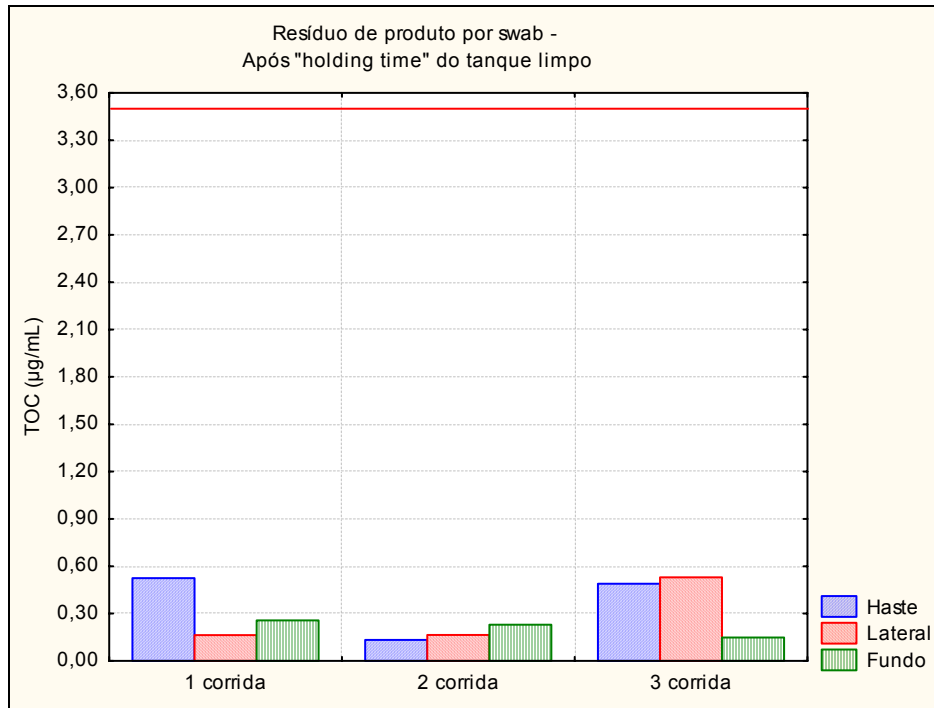


Figura 20 - Resíduo de produto por swab - após "holding time" do tanque limpo

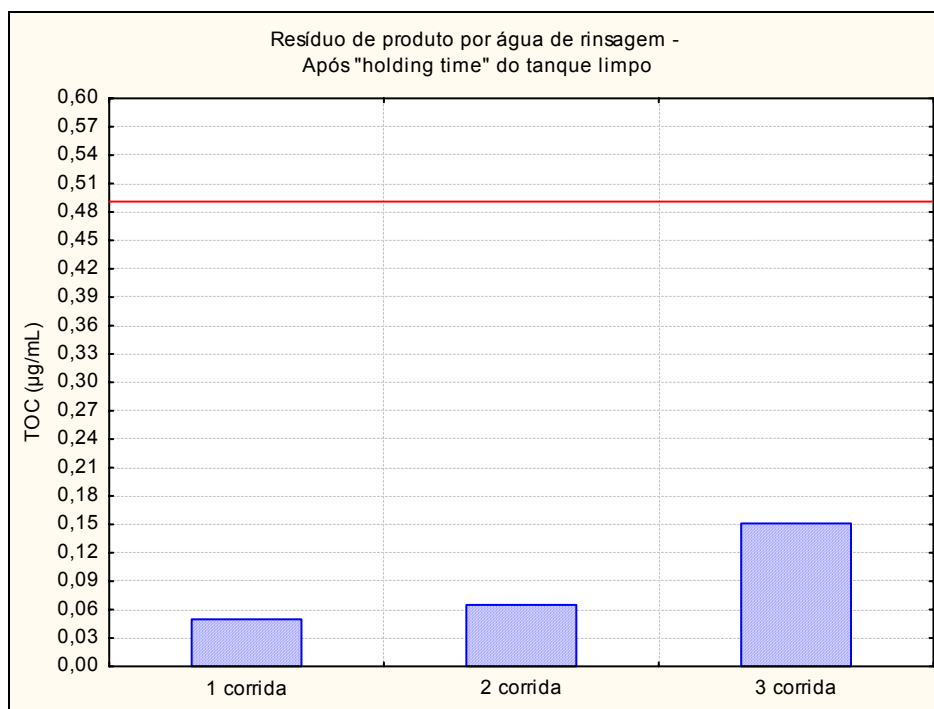


Figura 21 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após "holding time" do tanque limpo

Nesta etapa, após o “holding time” do tanque limpo, verificou-se que não há resíduos de NaOH uma vez que nas três corridas avaliadas obteve-se os resultados de pH iguais a 5,674, 5,806 e 5,071 respectivamente para as primeira, segunda e terceira corridas. Estes valores de pH de água de rinsagem ficou bem abaixo do limite calculado 9,94 e dentro do parâmetro USP que é pH de 5 a 7, conforme gráfico mostrado na figura 22.

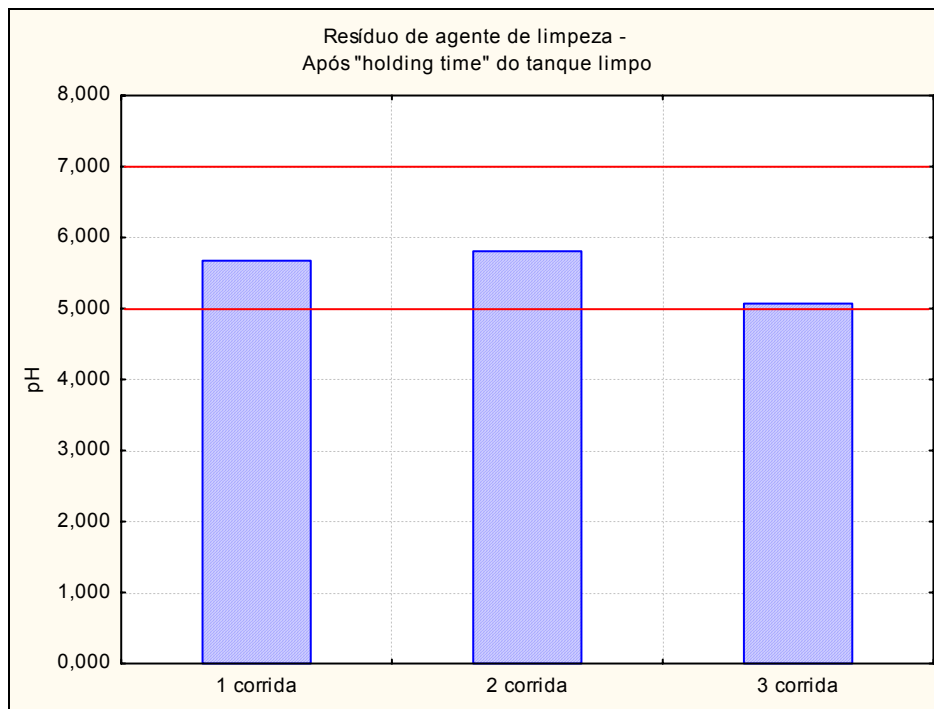


Figura 22 - Resíduo de agente de limpeza - após "holding time" do tanque limpo

Além disso, ocorreu a despirogenização do tanque uma vez que a concentração de endotoxina foi menor que 0,250 EU/mL nas três corridas.

Os valores de condutividade obtidos permaneceram dentro do especificado para as três corridas.

A WFI utilizada para esta avaliação estava aprovada para o uso, pois a determinação de seu TOC, pH, condutividade e concentração de endotoxina estavam dentro dos parâmetros farmacopéico.

Após a retirada das amostras para a avaliação do “holding time” o tanque foi esterilizado. Visando analisar a interferência do condensado após a esterilização foram retiradas mais amostras do tanque. Os resultados de análise estão a seguir na Tabela 22.

Tabela 26 - Resultados das análises após a esterilização do tanque limpo

Amostras / Tipo de análise	Resultados		
	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
L / Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH (água de rinsagem)	TOC: 0,0369 µg/mL Condutividade: 0,782 µS/cm pH: 5,662	TOC: 0,2150 µg/mL Condutividade: 0,819 µS/cm pH: 5,806	TOC: 0,1970 µg/mL Condutividade: 0,637 µS/cm pH: 5,703
M / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL
N(WFI) / Determinação de TOC, condutividade e pH	TOC: 0,0286 µg/mL Condutividade: 0,797 µS/cm pH: 5,686	TOC: 0,1510 µg/mL Condutividade: 0,985 µS/cm pH: 5,775	TOC: 0,1930 µg/mL Condutividade: 0,647 µS/cm pH: 5,725
O(WFI) / Determinação da concentração de endotoxina	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL	< 0,250 EU/mL

O valor de TOC obtido para água de rinsagem foi corrigido pelo valor de TOC da WFI e pela percentagem de recuperação conforme descrito na Tabela 23.

Tabela 27 - Correção dos resultados obtidos após a esterilização do tanque limpo

Amostra L / Quantificação de resíduo de produto por TOC (água de rinsagem)	Resultados		
	Medida	Correção – Medida da WFI	Correção - Recuperação
1ª corrida	0,0369 µg/mL	$0,0369 - 0,0286 =$ 0,0083 µg/mL	$0,0083 \times 100/98,5 =$ 0,00843 µg/mL
2ª corrida	0,2150 µg/mL	$0,2150 - 0,1510 =$ 0,0640 µg/mL	$0,0640 \times 100/98,5 =$ 0,0650 µg/mL
3ª corrida	0,1970 µg/mL	$0,1970 - 0,1930 =$ 0,0040 µg/mL	$0,0040 \times 100/98,5 =$ 0,00406 µg/mL

Nesta etapa verificou-se que a maior quantidade de resíduo de produto encontrado, nas três corridas, por amostragem através da água de rinsagem foi de 0,0650 µg/mL que está abaixo do critério calculado que é de 0,49 µg/mL. A figura 23 mostra o gráfico com os resíduos obtidos nas três corridas que encontram-se muito abaixo do limite aceitável. Este resultado mostra que o vapor utilizado para a

esterilização do tanque não promoveu o desprendimento de resíduos de produto das paredes do mesmo.

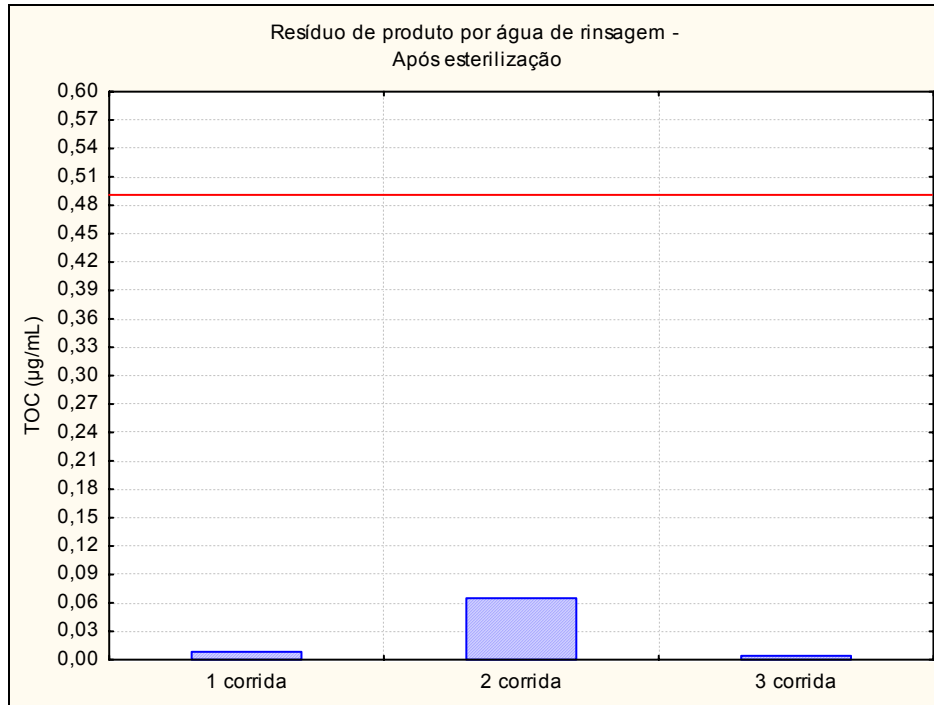


Figura 23 - Resíduo de produto por água de rinsagem - após esterilização

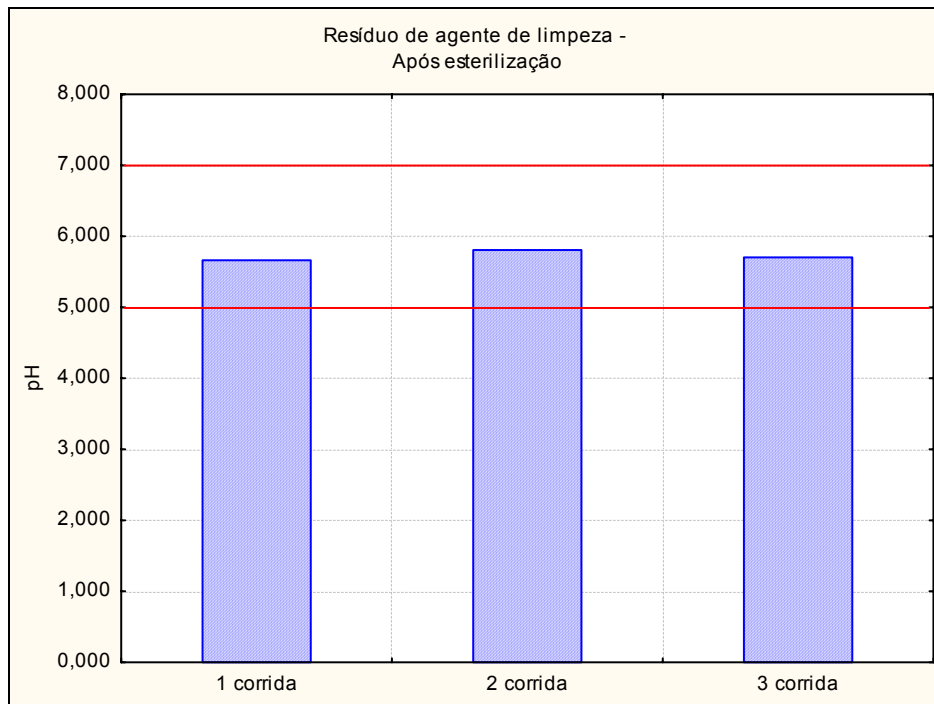


Figura 24 - Resíduo de agente de limpeza - após esterilização

Conforme gráfico mostrado na figura 24, nas três corridas avaliadas obteve-se o maior valor de pH de 5,775 o que demonstra que não há resíduos de NaOH uma vez que este valor de pH de água de rinsagem ficou dentro do parâmetro USP que é pH de 5 a 7.

Os valores de condutividade obtidos permaneceram dentro do especificado para as três corridas.

Com os resultados de concentração de endotoxina nas três corridas verificou-se que o tanque permaneceu despirogenizado uma vez que a concentração de endotoxina foi menor que 0,250 EU/mL.

Observa-se que a WFI utilizada para esta avaliação também estava dentro dos parâmetros farmacopéico de TOC, pH, condutividade e concentração de endotoxina, tornando válido este teste.

4 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

4.1 Conclusões

❖ A vacina Hib foi utilizada como pior caso para esta validação do processo de limpeza de tanque multiuso por possuir maior aderência ao aço inox 316L, apresentando uma menor percentagem de recuperação quando comparada à vacina Meningite A e C.

❖ Os ensaios de recuperação mostram que a vacina Hib e o hidróxido de sódio podem ser removidos de forma efetiva da superfície de aço inox 316L uma vez que apresentaram valores de recuperação maiores que 75%, conforme solicitado pela ANVISA.

❖ Todas as análises realizadas para resíduo de produto apresentaram resultado menores que 0,49 µg/mL de TOC para amostras de água de rinsagem e 3,49 µg/mL de TOC para amostras de swab permanecendo assim dentro dos parâmetros aceitáveis. Já as análises realizadas para resíduo de hidróxido de sódio apresentaram resultado de pH entre 5 e 7, permanecendo também dentro dos parâmetros aceitáveis.

❖ De acordo com os resultados obtidos dentro dos limites especificados considera-se aprovada a validação do processo de limpeza manual deste tipo de tanque multiuso utilizado para formulação das vacinas Hib e Meningite A e C. Vale ressaltar que a metodologia desenvolvida foi específica para esta validação necessitando assim de adaptações para utilização em outros equipamentos e substância ativa. Por exemplo, caso sejam utilizadas vacinas virais deve ser realizada a avaliação de potência viral além da quantificação de resíduos de produto e agente de limpeza.

❖ Esta validação de limpeza gera a confiabilidade de que o tanque multiuso para formulação destas vacinas é limpo de forma adequada e eficaz removendo os resíduos de produto e agente de limpeza até nível aceitável calculado com base científica. Com isto há a garantia e segurança na qualidade dos produtos fabricados uma vez que exclui-se a possibilidade de contaminação cruzada.

❖ Esta validação traz o benefício de aumento de produção industrial já que um mesmo equipamento pode ser utilizado para formulação de dois tipos de produtos.

4.2 Sugestões

❖ Avaliar a possibilidade de aplicação da metodologia de validação proposta em outros processos de limpeza executados em Bio-Manguinhos.

❖ Quantificar os resíduos de agente de limpeza e de produto, após os procedimentos de limpeza, através do monitoramento deste processo. Desta forma não seriam necessárias as revalidações periódicas uma vez que este acompanhamento forneceria uma análise constante de resultados.

❖ Utilizar o método de titulação ácido-base para quantificar resíduo de agente de limpeza ao invés da determinação de pH. Assim teríamos resultados mais específicos de resíduos de NaOH.

❖ Quantificar resíduos de produto por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por este ser um método de análise específico. Apesar de os resíduos de produto analisados apresentarem valores dentro do especificado, não são valores que correspondem apenas ao polissacarídeo. A determinação de TOC, por ser um método não específico, é considerada um pior caso, pois os resultados encontrados possuem contribuições, por exemplo, dos excipientes. A determinação por HPLC forneceria resultados apenas da contribuição de polissacarídeo.

❖ Realizar um novo estudo completo de validação com um “holding time” de tanque limpo maior. Isto pode ser proposto uma vez que o presente estudo de validação de limpeza apresentou resultados satisfatórios para 31 dias de “holding time” do tanque limpo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. *Guias relacionados à garantia de qualidade*. Brasília: ANVISA, 2006.

ANVISA. *RDC nº 17: Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos*, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR ISO 13485: Produtos para a saúde - Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos para fins regulamentares*, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR ISO 9000: Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário*, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR ISO 9001: Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos*, 2000.

ATHAIDE, A. *Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos*. São Paulo: Controle de Contaminação, maio/jun 2000.

BIO-MANGUINHOS - a, Bula de produto – Vacina *Haemophilus Influenzae* do tipo b conjugada (Hib), Rio de Janeiro, 2010.

BIO-MANGUINHOS - b, Bula de produto – Vacina polissacarídica meningocócica sorogrupos A e C (Meningite A e C), Rio de Janeiro, 2010.

BIO-MANGUINHOS - c, DI 4285 - Avaliação do percentual de recuperação para definição do produto “pior caso” e definição dos fatores de recuperação para validação de limpeza. Rio de Janeiro, 2010.

BIO-MANGUINHOS - d, DI 0811 - Lavagem de tanques – DIFOR. Rio de Janeiro, 2009.

BIO-MANGUINHOS - e, DI 1030 - Manual de Validação. Rio de Janeiro, 2010.

BIO-MANGUINHOS - f, DI 3993 - Política de validação de limpeza. Rio de Janeiro, 2010.

BIO-MANGUINHOS - g, DI 2320 - Protocolo de lavagem de tanque – DIFOR. Rio de Janeiro, 2008.

BIO-MANGUINHOS (h), DI 0470 - Protocolo de validação do processo de limpeza de tanques e equipamentos. Rio de Janeiro, 2010.

CAMPOS VF. *TQC: Controle da Qualidade Total (no estilo japonês)*. Belo Horizonte: Bloch, 1992.

DENYER, S. P.; HODGES, N. A.; GORMAN, S. P. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. USA: Blackwell Science, seventh edition, 2004.

FDA. *Guide to inspections validation of cleaning processes*. 1993.

FDA. *Guideline on General Principles of Process Validation*. 1987.

FDA. *Draft Guidance for Industry - Process Validation: General Principles and Practices*. 2008.

FDA. *Good Manufacturing Practice Regulations for Medical Devices - Quality System Regulation, 21 CFR (Code of Federal Regulations), Part 820*. 2007.

FDA. *Current Good Manufacturing Practices Regulations for Finished Pharmaceuticals, 21 CFR (Code of Federal Regulations), Parts 210 and 211, Section 211.67*. 2004.

FIALHO, B. d. *Dependência Tecnológica e Biodiversidade. Um estudo histórico sobre a indústria farmacêutica no Brasil e nos Estados Unidos*. 2005. Dissertação (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/COPPE, Rio de Janeiro.

FOURMAN, G.L.; MULLEN, M.V. Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. *Pharmaceutical Technology*, 17(4), 54-60, 1993.

GE SIEVERS. *Manual Técnico de operação e manutenção do analisador de carbono orgânico total (TOC), modelo 900 laboratory*. 2009

ICH. Disponível em : <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>. Acesso em: 22 de janeiro, 2010.

ICH, Q7. *Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients*. 2000.

IMMEL, B. K. A Brief History of the GMPs for Pharmaceuticals. *Pharmaceutical Technology*, 2001.

IOWA STATE UNIVERSITY DEPARTMENT OF CHEMISTRY. MSDS NaOH. Disponível em: <<http://avogadro.chem.iastate.edu/MSDS>>. Acesso em: 30 de julho, 2009.

ITW TEXWIPE. *TOC Cleaning Validation Kits*. USA, 2006.

JENKINS, K.M. et al. Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation. *PDA J. Pharm. Sci. & Tech.*, Vol. 50 No. 1, pp. 615, 1996.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA W. M.; SCHRECKENBERGER P. C.; WINN W. C. *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*. fifth edition. USA: Lippincott, 1997.

LEBLANC, D. A. *Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing*. New York: CRC, 2000.

LUZ, K. R.; SOUZA, D. C. C.; CICONELLI, R. M. Vacinação em pacientes imunossuprimidos e com doenças reumatológicas auto-imunes. *Revista Brasileira de Reumatologia*, São Paulo, v.47, n.2, mar./abr., 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SI-PNI - Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização. Disponível em: <http://pni.datasus.gov.br/calendario_vacina_Infantil.asp>. Acesso em: 28 de janeiro, 2010.

MOLLAH, A. H. Cleaning Validation for Biopharmaceutical Manufacturing at Genentech Part 1 and Part 2. *BioPharm.*, 2008.

OMS. *Technical Report Series No. 897 Annex 1 - Recommendations for the production and control of Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines*. Geneva, 2000.

OMS. *Technical Report Series No. 937 Annex 4 - OMS Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*. Geneva, 2006.

PALMIGIANI, A. L. M., *Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de um Modelo de Controle*. 2005. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

PINTO, D. A. S. *Sistemas de Gestão da qualidade na indústria farmacêutica: uma análise da compatibilidade entre os modelos de referência RDC210/2003, ISO 9001, ICH Q10 e Modelo de excelência da Gestão® MEG*. 2009. Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz/Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. São Paulo: Manole, 1994.

ROSENBERG, G. *Desempenho global da Fundação Oswaldo Cruz: um instrumento de auto-avaliação*. 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/Escola de Química, Rio de Janeiro.

SÁNCHEZ, J. A. M. Equipment Cleaning Validation Within a Multi-Product Manufacturing Facility. *BioPharm.*, 2006.

SANTOS, H.M.M. Validação de processos farmacêuticos. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/heltonsantos/validao-de-processos-farmacuticos>>. Acesso em: 23 de fevereiro, 2010.

USP. *United States Pharmacopeia (Farmacopéia Americana)*. XXXIII ed. 2010.

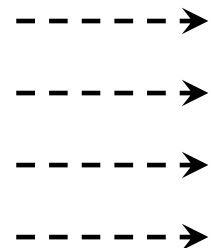
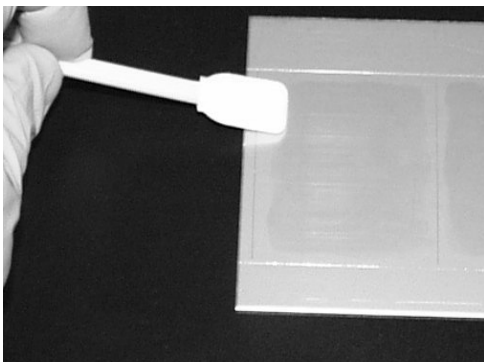
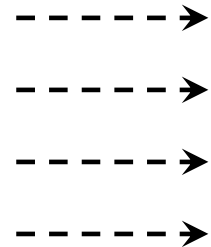
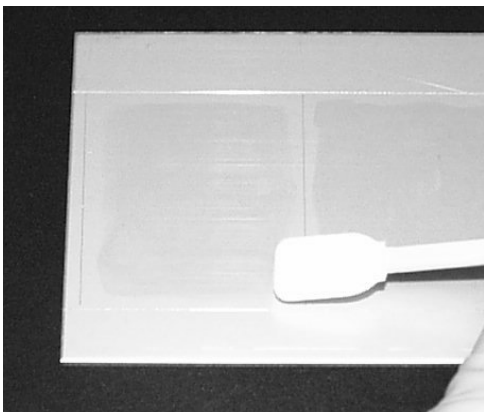
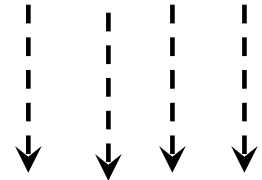
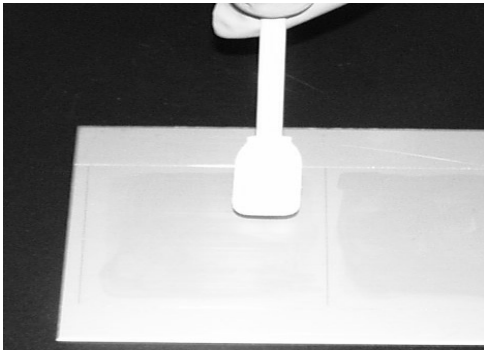
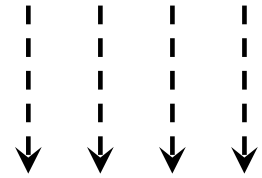
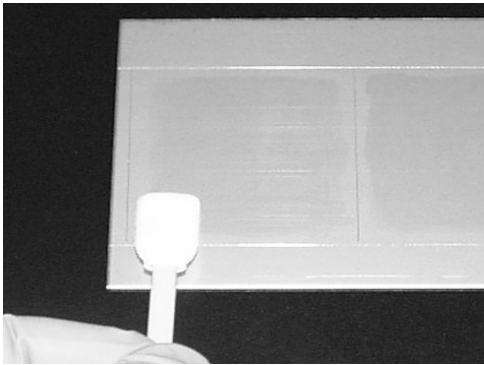
WEITZEL, S.A. *Critical Process Cleaning & Cleaning Validation*. Amsterdam: CfPA, 2009.

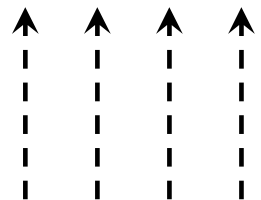
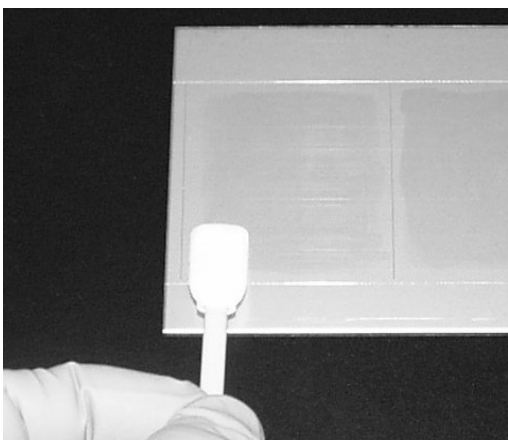
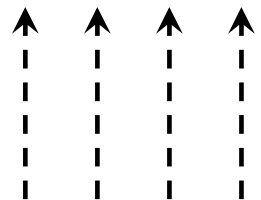
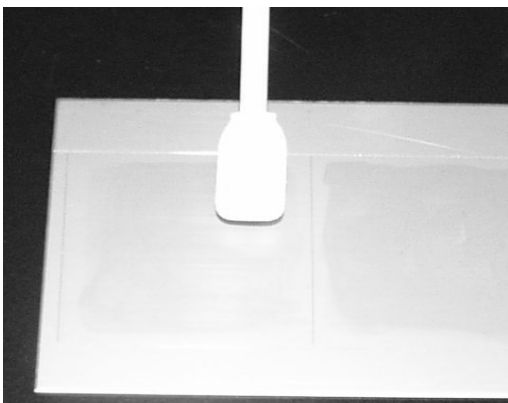
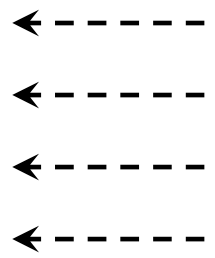
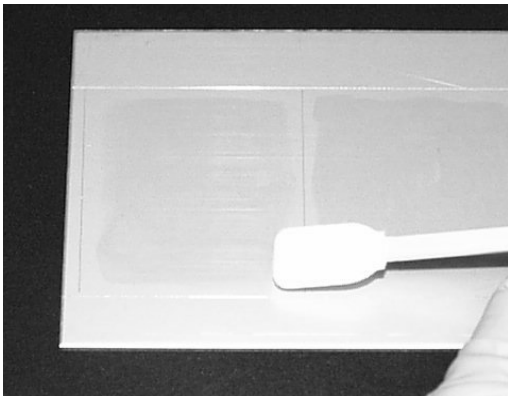
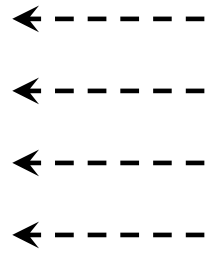
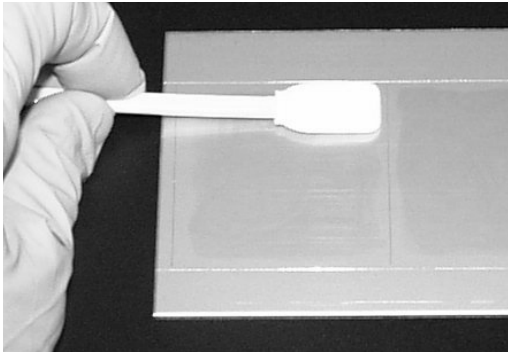
WHITE, E. K. Risk-Based Cleaning Validation in Biopharmaceutical API Manufacturing. *BioPharm.*, 2005.

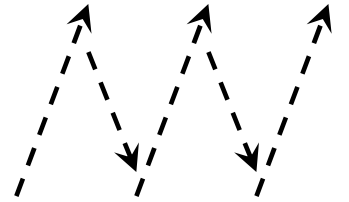
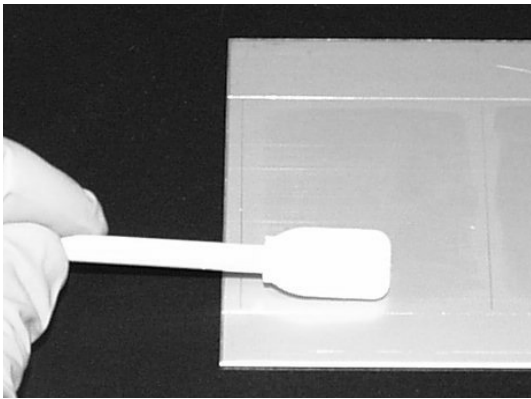
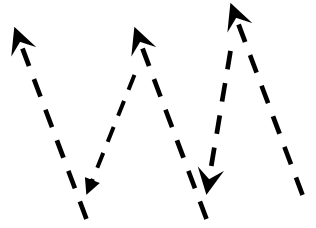
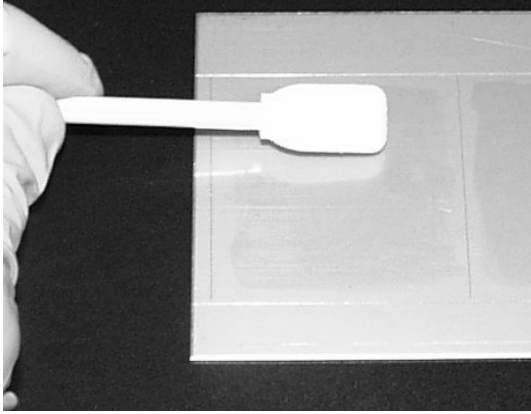
WORKSHOP SOBRE LAL, III, 2006, Rio de Janeiro. *Teste de Gel-Clot*. Rio de Janeiro: ALKO BRASIL, 2006.

YUGUE, V.; PRIA, J. *Validação de limpeza: casos, práticas e soluções*. São Paulo: Yugue assessores, 2009.

ANEXO A - Técnica para extração por swab



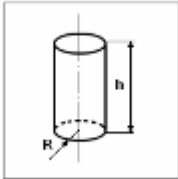
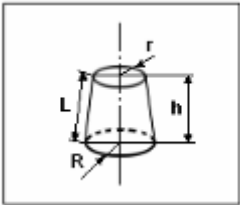
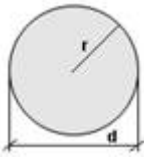




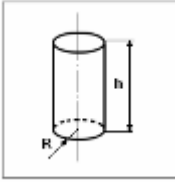
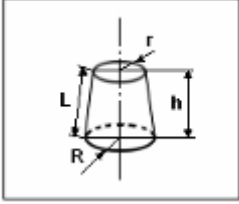
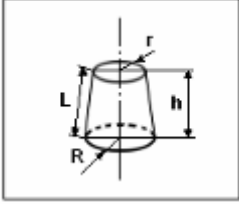
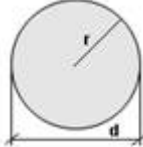
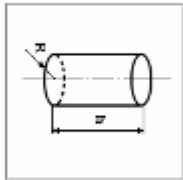
ANEXO B - Resumo das amostragens realizadas durante uma corrida de validação

Etapa da amostragem	Amostras	Tipo de amostra	Tipo de análise
Antes do procedimento de limpeza	A	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
Ao término da limpeza	B	<i>Swab</i>	Quantificação de resíduo de produto por TOC
	C	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH.
	D	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
	E (WFI)	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Determinação de TOC, condutividade e pH
	F (WFI)	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
Após “holding time” do tanque limpo	G	<i>Swab</i>	Quantificação de resíduo de produto por TOC
	H	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH.
	I	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
	J (WFI)	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Determinação de TOC, condutividade e pH
	K (WFI)	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
Após esterilização	L	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Quantificação de resíduos por TOC, análise de condutividade e pH.
	M	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina
	N(WFI)	Frasco policarbonato ou polipropileno 500 mL	Determinação de TOC, condutividade e pH
	O(WFI)	Frasco apirogênico de 20 mL	Determinação da concentração de endotoxina

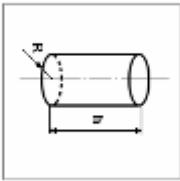
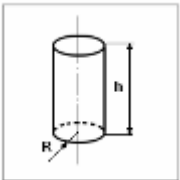
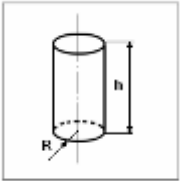
ANEXO C – Cálculo da área compartilhada pelos produtos

 Materiais utilizados na formulação que entram em contato com o produto 				
<i>Item</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fórmulas</i>	<i>Medidas (cm)</i>	<i>Área (cm²)/item</i>
Garrafa de 5 L	2	<ul style="list-style-type: none"> Gargalo e corpo da garrafa Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	Gargalo: R = 1,6 h = 2,5	(41,2) x 2
		<ul style="list-style-type: none"> Início do corpo da garrafa Tronco de cone (área lateral):  $S_L = \pi L(R + r)$	Corpo: R = 8,75 h = 21	[406,4 (tronco) + 240,5 (círculo) + 8,0 (círculo)] x 2
		Gargalo: R = 1,6 h = 2,5	41,2	
Garrafa de 2 L	1	Círculo (área total):  $S = \pi r^2$	Início do corpo: R = 6,25 r = 1,6 L = 8	197,3 (tronco) + 122,2 (círculo) + 8,0 (círculo)
		Corpo: R = 6,25 h = 16	873,8	

ANEXO C – Cálculo da área compartilhada pelos produtos (continuação)

 Materiais utilizados na formulação que entram em contato com o produto 				
<i>Item</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fórmulas</i>	<i>Medidas (cm)</i>	<i>Área (cm²)/item</i>
Garrafa de 0,5 L	1	<ul style="list-style-type: none"> Gargalo e corpo da garrafa Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	Gargalo: R = 1,6 h = 2,5	41,2
		<ul style="list-style-type: none"> Início do corpo da garrafa Tronco de cone (área lateral):  $S_L = \pi L(R + r)$	Início do corpo: R = 3,75 r = 1,6 L = 4	67,2 (tronco) + 44,2 (círculo) + 8,0 (círculo)
		<ul style="list-style-type: none"> Início do corpo da garrafa Tronco de cone (área lateral):  $S_L = \pi L(R + r)$	Corpo: R = 3,75 h = 10,5	335,8
		<ul style="list-style-type: none"> Círculo (área total):  $S = \pi \cdot r^2$		
Barra magnética	2	Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	R = 0,6 h = 8	(32,4) x 2

ANEXO C – Cálculo da área compartilhada pelos produtos (continuação)

Materiais utilizados na formulação que entram em contato com o produto				
<i>Item</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fórmulas</i>	<i>Medidas (cm)</i>	<i>Área (cm²)/item</i>
Conexões de engate rápido	3	Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	R = 0,4 h = 10	(26,1) x 3
<i>Área do material de formulação =</i>				6.547
Itens do tanque de formulação que entram em contato com o produto				
<i>Item</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Fórmulas</i>	<i>Medidas (cm)</i>	<i>Área (cm²)/item</i>
Tanque	1	Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	R = 28,5 h = 61,0	16.026,8
Pescador (Haste)	1	Cilindro (área total):  $S = 2\pi R(R + h)$	R = 0,5 h = 61,0	193,2
<i>Área do tanque de formulação =</i>				16.220
<i>Área total compartilhada pelos produtos =</i>				22.767 cm²

**ANEXO D – Trabalho publicado no XVIII COBEQ
(Congresso Brasileiro de Engenharia Química)**



VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE LIMPEZA DE TANQUE MULTIUSO UTILIZADO PARA FORMULAÇÃO DE VACINAS

B. C. B. BAGO^{1,2}, A. S. LUNA¹ e A. C. A. COSTA¹

¹ PPG-EQ/IQ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
e-mail: asluna@uerj.com; acosta@uerj.com

² Biomanguinhos – Fundação Oswaldo Cruz
e-mail: barbara@bio.fiocruz.br

RESUMO – A validação de limpeza de equipamentos é requisito regulatório para assegurar que os procedimentos de limpeza removem os resíduos de produto e agente de limpeza existente até um nível de aceitação pré-determinado, garantindo que não haja contaminação cruzada. A metodologia analítica escolhida para monitorar a ocorrência de contaminação cruzada foi a determinação de carbono orgânico total (TOC) por ser uma técnica não específica permitindo assim quantificar os resíduos antes e após o procedimento de limpeza. Para execução desta validação foi selecionado o pior caso em relação ao contaminante, calculou-se a área compartilhada pelos produtos e o critério de aceitação, realizou-se os ensaios de recuperação para *swab* e água de rinsagem, definiram-se os pontos de amostragem, e realizou-se a validação com resíduo de processo. Os resultados encontrados permitem a conclusão de que o procedimento de limpeza para tanque de aço inox 316L é eficiente removendo os resíduos até níveis aceitáveis.

PALAVRAS-CHAVE: validação de limpeza; multiuso; vacina; Hib; Meningite A e C

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2006) o objetivo da validação de limpeza é provar que o equipamento está limpo, com resíduos de produto e agente de limpeza em níveis aceitáveis para prevenir possível contaminação e contaminação cruzada. O período e condições de estocagem do equipamento antes de sua limpeza e o tempo entre limpeza e reuso do equipamento devem fazer parte desta validação. Após a limpeza os equipamentos devem ser estocados em uma condição seca, não podendo haver água estagnada.

No mínimo três aplicações consecutivas do procedimento de limpeza devem ser executadas demonstrando sucesso para que o procedimento possa ser considerado validado (ANVISA, 2006). O estudo de validação do pior caso é considerável aceitável. O produto representante escolhido como pior caso deve ser aquele com maior dificuldade de limpeza.

A amostragem para esta validação deve incluir *swab* (amostragem direta) ou rinsagem (amostragem indireta), conforme o caso, para detectar resíduos insolúveis e solúveis. Segundo OMS, o ideal é a combinação destes



dois métodos. Estudos de recuperação devem ser realizados para a amostragem adotada. No cálculo final do fator de recuperação, sugere-se levar em consideração o menor resultado de recuperação encontrado e não a média dessas recuperações. Segundo a OMS uma recuperação maior que 80% é considerada boa, entre 50% e 80% razoável e menor que 50% questionável. Já para ANVISA são desejáveis fatores de recuperação acima de 75,0%.

Para o caso de injetáveis é necessário realizar o teste para avaliação de concentração de endotoxina nas amostras. As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) associados à membrana externa de bactérias Gram negativas, e se constituem na mais significativa fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica (Pinto *et al.*, 2003). O LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) é um produto com emprego específico na determinação de endotoxinas bacterianas derivadas de bacilos Gram- negativos, entre outros pelo método da formação de gel. Este indica uma resposta para a presença de endotoxina na amostra contendo quantidade igual ou superior à sua sensibilidade (Pinto *et al.*, 2003).

Existe uma variedade de métodos analíticos que podem ser utilizados para validação do processo de limpeza. A natureza química do resíduo a ser medido possui relevância para escolha do método analítico. Podem ser utilizados métodos específicos ou não específicos. O caso da análise de TOC pode ser utilizado como exemplo de método não específico onde o valor de TOC é expresso como se todos os átomos de carbono presentes fossem provenientes da espécie orgânica de resíduo de produto. Sabe-se que o carbono orgânico medido não é apenas devido aos ativos orgânicos, podendo ter outras contribuições como a do agente de limpeza e excipientes. Isto seria considerado um pior caso e tem-se base científica que permite o uso

de TOC para chegar a tal conclusão, pois o objetivo é determinar que o valor medido seja inferior ao critério de aceitação calculado (LeBlanc, 2000). Apesar de não específica, a análise de TOC possui elevada sensibilidade e baixo custo quando comparada a outros métodos. A metodologia analítica utilizada deve prover uma medida que seja correlacionável a uma concentração do contaminante (ANVISA, 2006).

Os três critérios a seguir são os mais utilizados para determinação dos limites de aceitação, com suas possíveis variações individuais:

❖ **Critério 1 - 0,1% da dose limite** = Presença de não mais que 0,1% da dose limite; 1/1000 ou a milésima parte da dose diária mínima do contaminante pode aparecer na dose diária máxima do produto subsequente. Para o caso de produtos injetáveis é aceitável apenas 0,01% da dose limite. Assim o fator de segurança para este caso é igual a 0,0001.

Passo A: Determinação do limite de aceitação máximo em μg do contaminante no produto subsequente.

$$A = \frac{0,0001 \times MTD_{CONT} \times MBS_{SUBS}}{M_{AX} TD_{SUBS}} \quad (1)$$

Onde: 0,0001 = Fator de segurança para injetáveis.

MTD_{CONT} = Mínima dose diária do contaminante em μg

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote do subsequente em g ou mL

$M_{AX} TD_{SUBS}$ = Máxima dose diária do subsequente na mesma unidade do tamanho mínimo do lote subsequente (MBS_{SUBS})



No caso de solução de limpeza, como a MTD_{cont} não é conhecida, utiliza-se o NOEL - nível de efeito não observado. O NOEL substitui os termos “ $0,0001 \times MTD_{cont}$ ” no cálculo do Passo A e é calculado pela seguinte fórmula:

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times 70}{2000} \quad (2)$$

Onde: LD_{50} = é a quantidade de uma substância química que quando é administrada em uma única dose por via oral, expressa em massa da substância por massa de animal, produz a morte de 50% dos animais expostos. É expressa em mg/Kg.

70 = Peso médio de uma pessoa adulta em kg

2000 = Constante empírica

Passo B: Determinação do limite de aceitação do contaminante por área compartilhada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

$$B = \frac{A}{SRSA} \quad (3)$$

Onde: A = Limite de aceitação máximo em μg do contaminante no produto subsequente, que é o valor calculado no passo A.

SRSA = Área compartilhada pelos produtos em cm^2 .

Passo C: Determinação do limite de aceitação do contaminante na amostra analisada ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

$$C = \frac{B \times \text{ÁREA}}{\text{Volume}} \quad (4)$$

Onde: B = Limite de aceitação do contaminante por área compartilhada, que é o valor calculado no passo B.

ÁREA = No caso de água de rinsagem é toda área compartilhada. Já no caso de *swab* é a área amostrada. Deve ser expressa em cm^2 .

Volume = No caso de água de rinsagem é o volume utilizado para rinsagem. Já no caso de *swab* é o volume utilizado na recuperação do *swab*. Deve ser expressa em mL.

❖ **Critério 2 - O limite de aceitação de 10 ppm do produto contaminante no produto subsequente** = Nos cálculos, somente o passo A se altera, passando a ser:

$$A = 10 \times MBS_{SUBS} \quad (5)$$

Onde: 10 = Representa o limite de aceitação de 10 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$ ou $\mu\text{g}/\text{g}$)

MBS_{SUBS} = Tamanho mínimo do lote do subsequente em g ou mL

Os passos B e C são calculados da mesma maneira.

❖ **Critério 3 - Inspeção Visual** = A inspeção visual pode permitir a detecção de contaminação grosseira concentrada em pequenas áreas que poderiam passar despercebida por amostragem e / ou análise.

Tais critérios são aplicáveis aos resíduos de produtos e de agentes de limpeza. O critério mais severo é o que deve ser utilizado, sendo que o critério visualmente limpo deve ser incluído em todos os procedimentos de limpeza executados, exceto naqueles em que a limpeza não pode ser verificada visualmente.

2. METODOLOGIA

2.1 Seleção do Produto Contaminante Pior Caso

A solubilidade é um parâmetro avaliado para definição de pior caso, pois quanto mais



solúvel o produto em água mais fácil é sua remoção. Esta validação foi realizada em um tanque multiuso onde podem ser formuladas a Vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada (Hib) e a Vacina polissacarídica de meningite meningocócica sorogrupos A e C (Meningite A e C). Para determinação de qual destas vacinas seria o pior caso foram realizados os seguintes procedimentos a fim de testar a solubilidade destas em água purificada. Foi utilizada água purificada, pois conforme procedimento de limpeza é com este tipo de água que é realizada a primeira rinsagem no tanque.

Uma amostra de material do tanque, denominada de “coupon” (Figura 1a), foi impregnada com 200 µL de Vacina Hib e seco em estufa por no mínimo 24h a 56°C a 58°C. Após este período o “coupon” foi retirado da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente. Adicionou-se 150 mL de água purificada em um becher de 250 mL e posicionou-se sobre um agitador magnético. Através de agitação de 180 rpm o “coupon” foi inserido na água evitando contato com a pinça hemostática (figura 1b). Após 30 segundos o “coupon” e a solução de extração são separados a fim de interromper o processo e em seguida a solução de extração foi analisada em triplicata em relação ao TOC.

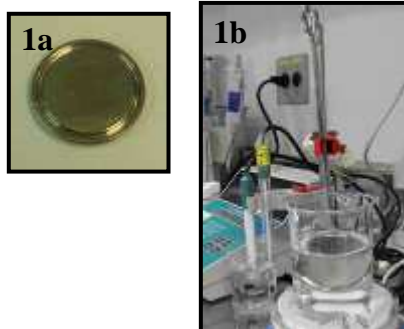


Figura 1 a – “Coupon” de aço inox 316L
b – Teste de solubilidade

Foram realizados os controles negativo (sem a adição da vacina) e positivo (com a adição da mesma quantidade de vacina diretamente no becher com água purificada).

Este procedimento foi repetido para Vacina Meningite A e C. Foram realizadas três corridas utilizando o mesmo lote das vacinas a serem testadas. A avaliação dos resultados foi feita a partir dos cálculos realizados para cada tempo de extração de acordo com a equação 6:

$$\%rec = \frac{Vrec - Cneg}{Cpos - Cneg} \times 100 \quad (6)$$

Onde: %rec = Percentagem de recuperação
V rec = Valor de TOC obtido na recuperação
C neg = Média do valor de TOC obtido no controle negativo
C pos = Média do valor de TOC obtido no controle positivo

A vacina considerada pior caso foi aquela que possuiu menor recuperação, pois esta é a vacina que mais fica aderida ao aço inoxidável, sendo mais difícil a sua remoção.

2.2 Critérios de Aceitação

2.2.1 Cálculo do Critério de Aceitação de Resíduo de Produto e Agente de Limpeza para cada Técnica de Amostragem: Utilizando as equações de 1 a 5 calculou-se o critério de aceitação de resíduo de produto e agente de limpeza.

2.2.2 Critério de Aceitação para amostras de água de rinsagem final, condensado e WFI: Para que este processo seja considerado validado, os resultados de análise nas amostras de água de rinsagem final, condensado e WFI devem obedecer aos limites especificados na tabela 1.



Tabela 1 - Resumo dos critérios de aceitação

Parâmetro Testado	Água de Rinsagem Final e Condensado	WFI
pH	5-7	5-7
Condutividade 25°C (μS/cm)	< 1,3	< 1,3
TOC (ppb)	Item 3.2	< 500
Concentração de Endotoxina (EU/mL)	< 0,250	< 0,250

Como nesta validação é necessário demonstrar a despirogenização do tanque, deve ser observada três reduções logarítmicas da concentração de endotoxina na água de rinsagem final, ou seja, uma redução de 1000 vezes da sua concentração inicial. Assim é necessário que a concentração inicial recuperada do tanque antes do processo de limpeza esteja > 250 EU/mL e após este processo seja $< 0,250$ EU/mL.

2.3 Avaliação da Recuperação do Produto

De acordo com o item 3.1 o produto selecionado pior caso foi a Vacina Hib. A avaliação dos percentuais de recuperação para este produto foi realizada para os métodos de amostragem de rinsagem e *swab* uma vez que estes são utilizados para avaliação de resíduo de produto após a limpeza.

Para a definição do fator de recuperação para rinsagem também foi realizado teste utilizando “coupon”. A quantidade de produto a ser utilizada foi a encontrada no passo B do limite calculado como mais rigoroso $\times 25\text{cm}^2$ que é a área do “coupon”. Foi preparada uma solução de vacina de forma que em 200 μL a ser adicionado a placa contivesse a quantidade de produto calculada acima. Foi escolhido o volume de 200 μL, pois esta é uma quantidade ideal para contaminar uma área de 25 cm^2 .

Para este teste foram utilizados 6 “coupons”. Cada um de 5 “coupons” foi impregnado com 200 μL da solução de vacina Hib e seco em estufa por no mínimo 24h a 56°C - 58°C. Um “coupon” não foi impregnado, pois foi utilizado como controle negativo. Após este período os “coupons” foram retirados da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente. Para análise de recuperação por rinsagem foi utilizado o mesmo método descrito para definição do pior caso, porém aumentou-se o tempo de contato para 5 minutos, pois este é o tempo de rinsagem utilizado no processo real. Também foram realizados os controles negativos e positivos conforme citado no procedimento para definição do pior caso, porém utilizou-se 200 μL da solução de vacina Hib para o controle positivo e o tempo de contato de 5 minutos. Foi utilizada a equação 6 para cálculo da porcentagem de recuperação.

Para a definição do fator de recuperação para *swab* foram utilizados 5 quadrantes de aço inox 316L com 25cm^2 , cada um representando uma corrida de teste, fabricados com o mesmo material do tanque e contaminados com quantidade conhecida de vacina Hib. Um outro quadrante não é contaminado para realização do controle negativo da placa. Cada superfície de 25cm^2 foi impregnada com 200 μL da solução de vacina Hib. A placa foi seca em estufa por no mínimo 24h a 56°C - 58°C. Após este tempo a placa foi retirada da estufa e aguardou-se até que atingisse a temperatura ambiente. O quadrante sem contaminação (controle negativo da superfície da placa) e os quadrantes contaminados com a vacina foram avaliados da seguinte forma: um frasco com 20mL de água para injetáveis foi utilizado para adição dos *swabs*. A amostragem foi realizada utilizando 2 *swabs* por superfície. O primeiro *swab* foi embebido em frasco com 20mL de WFI antes de realizar a amostragem no ponto.



O segundo *swab* foi passado seco no ponto de amostragem. Esta amostragem foi realizada de acordo com os movimentos a seguir sempre utilizando os dois lados do *swab*: parte superior em direção a inferior; da esquerda para a direita; da direita para a esquerda; parte inferior em direção a superior e por fim em zig zag da esquerda para a direita e ao contrário. Os dois *swabs* foram inseridos no mesmo frasco que continha 20 mL de água. A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por no mínimo 10 vezes. A análise de TOC foi realizada em triplicata. Também foi realizado o controle negativo e positivo com o *swab*. Para o primeiro, um frasco com 20mL de água para injetáveis foi utilizado para adição de dois *swabs*. Os dois *swabs* foram inseridos no frasco. A homogeneização da solução contida no frasco com os *swabs* foi realizada invertendo o mesmo por no mínimo 10 vezes. A análise de TOC também foi realizada em triplicata. Para o controle positivo foi realizado o mesmo procedimento porem foram adicionados 200 μ L da solução de vacina Hib diretamente sob um dos *swabs*.

Para avaliação deste fator de recuperação do produto por rinsagem e *swab*, foi calculada separadamente a porcentagem de recuperação média para cada corrida. A menor porcentagem de recuperação calculada (%rec) foi a considerada como resultado final.

2.4 Avaliação da Recuperação do Agente de Limpeza

A avaliação dos percentuais de recuperação do agente de limpeza foi realizada pelos métodos de rinsagem com análise de pH uma vez que através destes que é verificada a presença de resíduo de agente de limpeza após o tanque ser limpo. O critério de 10 ppm é o mais rigoroso permitindo assim até 3,512

μ g/mL de NaOH. Para este teste com agente de limpeza 5 “coupons” foram impregnados com a quantidade de NaOH calculada no passo B do critério mais rigoroso $\times 25\text{cm}^2$. Esta quantidade de NaOH deve estar em 200 μ L da solução a ser utilizada para impregnação. Cada “coupon” foi impregnado com 200 μ L da solução de NaOH. O “coupon” não foi seco, pois no processo real a solução de NaOH é retirada logo após as aplicações, não estando portanto seca.

Para esta análise de recuperação também foi utilizado o método descrito para definição do pior caso, porém aumentou-se o tempo de contato para 5 minutos, pois este é o tempo de rinsagem utilizado no processo real. Também foi realizado o controle positivo conforme citado acima no procedimento para definição do pior caso, porém utilizou-se 200 μ L da solução de NaOH e o tempo de contato de 5 minutos.

2.5 Limpeza do Tanque e Amostragens

Após o processo de formulação da vacina Hib o tanque foi impregnado com solução de endotoxina. O procedimento de limpeza ocorreu após aguardar o tempo máximo em que o tanque pode permanecer sujo - no máximo três dias até a sua lavagem.

Após este tempo, antes de iniciar a limpeza, encheu-se o tanque com WFI para retirada da amostra de recuperação (amostra A) em frascos específicos, para determinação da concentração de endotoxina bacteriana. O tanque foi pressurizado e a amostra foi retirada através do pescador. Em seguida o tanque foi desmontado. O tanque e as peças removíveis foram rinsadas com água purificada (*purified water* - PW) por aproximadamente 5 minutos. Após esta rinsagem, uma solução de NaOH 0,5



mol/L foi borrifada no tanque e nas peças removíveis, a cada 15 min, sendo este procedimento repetido por 4 vezes. Após este tempo o tanque e as peças foram enxaguados com PW por 5 minutos em abundância. Em seguida ocorre a rinsagem com WFI 90°C por 4 min e 30 segundos. Na rotina este tempo é de 5 minutos, porém para simular o pior caso na validação do processo de limpeza este tempo foi diminuído em 10%. Os operadores que realizam este procedimento são treinados e utilizaram uniformes e luvas cirúrgicas. Ao final o tanque foi montado, preenchido com WFI a 90°C e as amostragens foram realizadas. Neste momento foram coletadas amostras por *swab* e água de rinsagem.

Para o caso de *swab* foram utilizados 3 pontos de amostragem por *swab* para determinação de TOC (quantificação do produto - amostras B): Fundo, lateral e pescador. Foram utilizados 2 *swabs* em cada ponto. O 1º *swab* foi embebido em WFI que estava contida em frasco de 20mL e posteriormente foi realizada a amostragem do ponto seguindo o mesmo procedimento citado no item 2.3. A amostragem com o 2º *swab* foi realizada da mesma forma que anterior, porém com o *swab* seco. Após a amostragem cada *swab* é inserido no mesmo frasco com 20mL de WFI. Já para o caso de rinsagem encheu-se o tanque com WFI para retirada da amostra de em frascos específicos para determinação do TOC (quantificação do produto), pH, condutividade (amostra C) e endotoxina bacteriana (amostra D). O tanque foi pressurizado e a amostra foi retirada através do pescador.

O tanque foi então armazenado simulando assim o tempo máximo até a sua utilização. Após este tempo foram retiradas novas amostras para análise por *swab* (amostras G) e rinsagem (amostra H - TOC, condutividade e pH e amostra I - endotoxina)

da mesma forma conforme retirada após a limpeza. Imediatamente após estas amostragens o tanque foi esterilizado. Após o processo de esterilização o tanque foi amostrado novamente por rinsagem (amostra L - TOC, condutividade e pH e amostra M - endotoxina) conforme descrito anteriormente. Esta análise visa verificar a interferência do vapor utilizado na esterilização e detecção de algum resíduo que poderia ter desprendido das paredes deste após o processo.

As coletas das amostras do ponto de WFI utilizada foram realizadas no mesmo ponto utilizado para rinsagem do tanque, em frascos específicos para determinação do TOC, pH, condutividade e endotoxina bacteriana e em todas as datas em que foram retiradas amostras do tanque. Sendo identificadas como:

- Ao término da limpeza:

E (TOC, condutividade e pH) e F (endotoxina)

- Após “holding time” do tanque limpo:

J (TOC, condutividade e pH) e K (endotoxina)

- Após esterilização:

N (TOC, condutividade e pH) e O (endotoxina)

3. RESULTADOS DA VALIDAÇÃO

3.1 Seleção do Produto Contaminante Pior Caso

Observando os valores de recuperação obtidos para cada vacina mostrados nas tabelas 2 e 3 verifica-se que a vacina Hib apresentou menor percentual de recuperação (93,0%). Desta forma, esta validação de limpeza será realizada após processo de formulação da vacina Hib. Esta vacina possui como ativo o polissacarídeo capsular purificado (PRRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) conjugado com toxóide tetânico.



Tabela 2 - Resumo das médias obtidas para as medidas de TOC para Vacina Hib

Vacina Hib	1ª corr.	2ª corr.	3ª corr.
Produto ($\mu\text{g/mL}$)	22,4	22,8	21,5
C neg ($\mu\text{g/mL}$)	0,287	0,287	0,287
C pos ($\mu\text{g/mL}$)	23,1	23,1	23,1
Média % recuperação	96,9	98,7	93,0

Tabela 3 - Resumo das médias obtidas para as medidas de TOC para Vacina Meningite A e C

Vacina Meningite A e C	1ª corr.	2ª corr.	3ª corr.
Produto ($\mu\text{g/mL}$)	16,5	16,8	16,2
C neg ($\mu\text{g/mL}$)	0,201	0,201	0,201
C pos ($\mu\text{g/mL}$)	16,5	16,5	16,5
Média da % recuperação	100,2	102,0	98,4

3.2 Cálculo do Critério de Aceitação de Resíduo de Produto e Agente de Limpeza para cada Técnica de Amostragem

Verifica-se que para resíduo de produto o critério mais rigoroso é o de 0,01% da dose limite com 0,0007 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo para rinsagem e 0,006 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo para *swab*. Estes limites estão acima do limite de detecção do método que é de 0,0001 $\mu\text{g/mL}$ de polissacarídeo para dosagem de resíduo, o que torna este método aceitável para ser utilizado nesta validação de limpeza. De acordo com a equação da reta obtida pela linearidade ($y = 567,21x + 0,087$, $R^2 = 0,9919$) estes valores foram convertidos para TOC permitindo assim a avaliação direta do resultado de TOC obtidos nas amostras de validação. Desta forma obteve-se 0,48 $\mu\text{g/mL}$ de TOC para rinsagem e 3,49 $\mu\text{g/mL}$ de TOC para *swab*.

Já para agente de limpeza o critério mais rigoroso foi o que considera o limite de aceitação de 10 ppm do produto contaminante

no produto subsequente, sendo calculado apenas a rinsagem, pois este é o método utilizado para avaliar resíduo de agente de limpeza na validação. Assim obteve-se 3,512 $\mu\text{g/mL}$ que corresponde a pH = 9,94. Decidiu-se utilizar o mesmo critério de pH de água para injetáveis (*water for injection* - WFI) que é entre 5 e 7, pois não há evidências de que este resíduo de agente de limpeza (NaOH) na concentração encontrada para limite calculado não irá interferir quimicamente ao entrar em contato com a vacina.

3.3 Avaliação da Recuperação do Produto

3.3.1 Amostragem por rinsagem: Foi utilizada a equação 6 para cálculo da porcentagem de recuperação. Em resumo obteve-se os resultados mostrados na tabela 4 onde o valor de 98,5%, por ser o menor, foi o considerado para correção dos resultados das amostras de rinsagem obtidas na validação.

Tabela 4 - Resumo das médias obtidas para as recuperações de Vacina Hib por rinsagem

Aço inox 316 L	Média ($\mu\text{g/mL}$)	% recuperação
“Coupon” 1	0,882	98,5
“Coupon” 2	0,898	100,9
“Coupon” 3	0,891	99,8
“Coupon” 4	0,891	99,9
“Coupon” 5	0,897	100,6
C pos	0,892	Menor valor = 98,5%
C neg	0,193	

3.3.2 Amostragem por swab: Foi utilizada a equação 7 para cálculo da porcentagem de recuperação por *swab*.

Para avaliação deste fator de recuperação do produto por rinsagem e *swab*, foi calculada separadamente a porcentagem de recuperação média para cada corrida. A menor porcentagem de recuperação calculada (%rec) foi a considerada como resultado final.



Obteve-se os resultados mostrados na tabela 5 onde o valor de 98,4%, por ser o menor, foi o considerado para correção dos resultados das amostras de *swab* obtidas na validação.

Tabela 5 - Resumo das médias obtidas para as recuperações de Vacina Hib por *swab*

Aço inox 316 L	Média (µg/mL)	% recuperação
Quadrante 1	4,71	98,6
Quadrante 2	4,70	98,4
Quadrante 3	4,75	99,6
Quadrante 4	4,73	99,2
Quadrante 5	4,75	99,5
C _{pos.swab}	4,72	Menor valor = 98,4%
C _{neg.swab}	0,341	
C _{neg.placa}	0,389	

3.3 Avaliação da Recuperação do Agente de Limpeza

Em resumo obteve-se os resultados mostrados na tabela 6 onde o menor valor encontrado foi de 98,1%.

Tabela 6 - Resumo das médias para as recuperações de NaOH por água de rinsagem

Aço inox 316 L	Média (molar)	% recuperação
“Coupon” 1	$7,29 \times 10^{-5}$	99,1
“Coupon” 2	$7,28 \times 10^{-5}$	98,9
“Coupon” 3	$7,22 \times 10^{-5}$	98,1
“Coupon” 4	$7,25 \times 10^{-5}$	98,5
“Coupon” 5	$7,26 \times 10^{-5}$	98,6
C pos	$7,36 \times 10^{-5}$	Menor valor = 98,1%

Estes resultados demonstram que este método é eficaz para a recuperação do NaOH 0,5N do material aço inox 316L. Não é necessária a correção de pH para amostras de água de rinsagem, pois o critério a ser utilizado, 5 a 7, é muito mais crítico que o calculado.

3.4 Limpeza do Tanque e Amostragens

Todos os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 7 e 8. Os resultados apresentados já estão corrigidos pela recuperação conforme descrito no item 2.4 e com os descontos dos valores de WFI e controle negativo do *swab*.

Tabela 7 - Resumo dos resultados da validação

Amostras		Resultados 1ª corrida
A		> 250 EU/mL
Resíduos visíveis?		Não
B	Haste	0,596 µg/mL
	Lateral	0,524 µg/mL
	Fundo	0,339 µg/mL
C neg swab		0,544 µg/mL
C	TOC	0,0183 µg/mL
	Condut.	0,914µS/cm
	pH	5,498
D, F, I, K, M e O		< 0,250 EU/mL
E	TOC	0,0535 µg/mL
	Condut.	0,670µS/cm
	pH	5,576
G	Haste	0,525 µg/mL
	Lateral	0,163 µg/mL
	Fundo	0,257 µg/mL
C neg swab		0,349 µg/mL
H	TOC	0,0498 µg/mL
	Condut.	0,678µS/cm
	pH	5,674
J	TOC	0,0286 µg/mL
	Condut.	0,797µS/cm
	pH	5,686
L	TOC	0,00843µg/mL
	Condut.	0,782µS/cm
	pH	5,662
N	TOC	0,0286 µg/mL
	Condut.	0,797µS/cm
	pH	5,686



Tabela 8 - Resumo dos resultados da validação

Amostras	Resultados		
	2ª corrida	3ª corrida	
A	> 250 EU/mL	> 250 EU/mL	
Resíduos visíveis?	Não	Não	
B	Haste	0,215 µg/mL	0,216 µg/mL
	Lateral	0,226 µg/mL	0,468 µg/mL
	Fundo	0,229 µg/mL	0,516 µg/mL
C neg swab	0,231 µg/mL	0,485 µg/mL	
C	TOC	0,0366 µg/mL	0,0995 µg/mL
	Conduct	0,636 µS/cm	0,676 µS/cm
	pH	5,654	5,313
D, F, I, K, M e O	< 0,250EU/mL	<0,250EU/mL	
E	TOC	0,0543 µg/mL	0,195 µg/mL
	Conduct	0,648 µS/cm	0,611 µS/cm
	pH	5,732	5,362
G	Haste	0,133 µg/mL	0,489 µg/mL
	Lateral	0,165 µg/mL	0,530 µg/mL
	Fundo	0,229 µg/mL	0,148 µg/mL
C neg swab	0,564 µg/mL	0,569 µg/mL	
H	TOC	0,0650 µg/mL	0,151 µg/mL
	Conduct	0,819 µS/cm	0,769 µS/cm
	pH	5,806	5,071
J	TOC	0,151 µg/mL	0,193 µg/mL
	Conduct	0,985 µS/cm	0,647 µS/cm
	pH	5,775	5,725
L	TOC	0,0650 µg/mL	0,00406 µg/mL
	Conduct	0,819 µS/cm	0,637 µS/cm
	pH	5,806	5,703
N	TOC	0,151 µg/mL	0,193 µg/mL
	Conduct	0,985 µS/cm	0,647 µS/cm
	pH	5,775	5,725

4. CONCLUSÃO

Esta validação de limpeza gera a confiabilidade de que tanques multiuso para formulação destas vacinas são limpos de forma adequada e eficaz removendo os resíduos de produto e agente de limpeza até nível aceitável calculado com base científica. Com isto há a

garantia e segurança na qualidade dos produtos fabricados uma vez exclui-se a possibilidade de contaminação cruzada. Além disso, esta validação traz o benefício de aumento de produção industrial já que um mesmo equipamento pode ser utilizado para formulação de dois tipos de produtos.

De acordo com os resultados obtidos dentro dos limites especificados considera-se aprovada a validação do processo de limpeza manual deste tipo de tanque multiuso, utilizado para formulação das vacinas Hib e Meningite A e C. Vale ressaltar que a metodologia desenvolvida foi específica para esta validação necessitando assim de adaptações para utilização em outros equipamentos e substância ativa.

5. REFERÊNCIAS

ANVISA, *Guias relacionados à garantia de qualidade*. Brasília: ANVISA, 2006.

FARMACOPÉIA AMERICANA (United States Pharmacopeia - USP), XXX ed., 2007.

LEBLANC, D. A. *Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing*. New York: CRC, 2000.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

WEITZEL, S.A. (2009), Comunicação Pessoal.

OMS, *OMS Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*. Geneva: OMS, 2006. Annex 4.

YUGUE, V.; PRIA, J. (2009), Comunicação Pessoal.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)