

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO POR
ENDOTOXINAS BACTERIANAS NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS
VETERINÁRIOS INJETÁVEIS**

GUSTAVO MONTALDI CARVALHO

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

GUSTAVO MONTALDI CARVALHO

Monografia apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia Aplicada.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Souza Dias

Belo Horizonte

2017

RESUMO

Em 2015, o agronegócio abrangeu 21% do Produto Interno Bruto e os produtos veterinários farmacêuticos e imunobiológicos contribuíram com aproximadamente 4,5 bilhões de reais, 0,36% do agronegócio brasileiro. O controle de qualidade é uma ferramenta capaz de antecipar possíveis problemas e verificar se esses produtos atendem aos parâmetros de qualidade e identidade necessários à comercialização. Considerando serem as endotoxinas bacterianas um dos principais contaminantes de produtos farmacêuticos injetáveis, o objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar em uma indústria, localizada na região metropolitana de Belo Horizonte - MG, os possíveis pontos críticos de contaminação por endotoxina em sua linha de produção, e estabelecer procedimentos operacionais que garantam a qualidade do produto desejado. Os parâmetros de potabilidade e a pesquisa de endotoxina foram utilizados na avaliação da qualidade da água utilizada no processo e os testes de esterilidade e de detecção de endotoxinas foram os parâmetros de avaliação do produto final. Afim de alcançar o objetivo proposto, o sistema de tratamento de água e da linha de produção foram representados em forma de fluxograma, para que, em seguida, fossem apontados os possíveis pontos críticos de contaminação e apresentadas as medidas capazes de mitigar ou controlar/eliminar possíveis focos. O fluxogramas também permitiram uma visão sistêmica do processo e o estabelecimento de um plano de gestão de risco com tomadas de decisão sem o comprometimento do processo produtivo. Assim, o mapeamento e a avaliação de risco podem contribuir para o desenvolvimento de processos produtivos mais robustos, diminuindo o potencial risco de contaminação, menor perda econômica para a indústria e garantindo níveis aceitáveis de qualidade microbiológica do produto final.

Palavras-chave: Endotoxina bacteriana; produção de medicamentos veterinários, fluxograma.

ABSTRACT

In 2015, agribusiness covered 21% of the GDP and veterinary pharmaceuticals and immunobiological products contributed to approximately R\$ 4.5 billion, 0.36% of Brazilian agribusiness. Quality control is a tool capable of anticipating potential problems and verifying that these products meet the quality and identity specifications required for commercialization. Considering that bacterial endotoxins are one of the main contaminants of injectable pharmaceutical products, the objective of this work was to identify and evaluate, in a veterinary pharmaceutical plant located in the metropolitan area of Belo Horizonte, MG, possible critical points of endotoxin contamination in its line, and to establish operational procedures that guarantee the desired product quality. Potability parameters and endotoxin detection were used to evaluate the water quality used in the process and sterility and endotoxin detection tests were the final product evaluation parameters. In order to reach the proposed objective, water treatment system and production line were represented schematics, so that possible critical contamination points were indicated and measures presented able to mitigating or controlling / eliminating possible foci. The schematics also allowed a systemic view of the process and establishment of a decision making risk management plan without compromising the production process. Thus, risk mapping and assessment can contribute to the development of more robust production processes, reducing the potential contamination risk, lowering economic loss for the industry and ensuring the final product is within the acceptable specifications for quality.

Keywords: Bacterial endotoxins, microbiological parameters, injectable veterinary drugs, quality control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Parede celular de uma bactéria gram-negativa..... 13
- Figura 02 - Fluxograma do sistema de tratamento de água padrão API (água para injetáveis) de uma indústria localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais..... 18
- Figura 03 - Fluxograma da linha de produção de medicamentos veterinários injetáveis de uma indústria localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais..... 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Faturamento das Indústrias Produtoras de Medicamentos e Produtos Imunobiológicos de 2011 à 2015.....	9
Tabela 02 - Especificações para água potável.....	10
Tabela 03 - Especificações para água purificada.....	11
Tabela 04 - Especificações para água para injetáveis.....	11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadora de Carne

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP - Água purificada

API - Água para injetáveis

BPF - Boas Práticas de Fabricação

IL - Interleucina

L.A.L. - Lisado de Amebócitos de *Lymulus*

LPS - Lipopolissacarídeo

PCC - Ponto crítico de contaminação

PIB - Produto Interno Bruto

ppb - Partes por bilhão

ppm - Partes por milhão

PVC - Policloreto de polivinila

SINDAN - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal

TNF - Fator de Necrose Tumoral

UFC/ml - Unidade formadora de colônia por mililitro

μs/cm - Microsiemens por centímetro

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	V
1.0 INTRODUÇÃO.....	7
2.0 OBJETIVO.....	8
2.1 Objetivo Geral.....	8
2.2 Objetivo Específico.....	8
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1 Atual cenário do comércio de produtos veterinários no Brasil.....	9
3.2 Categorias de produtos veterinários e formas de administração.....	9
3.3 Testes de esterilidade.....	11
3.4 Teste de detecção de endotoxina bacteriana/pirogênio.....	12
3.5 Métodos de análise.....	14
4.0 METODOLOGIA.....	16
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
6.0 CONCLUSÃO.....	26
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1.0 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, o setor de agronegócio tem uma elevada participação no mercado brasileiro, abrangendo 21% de todo o Produto Interno Bruto (PIB) e, devido à expressiva representatividade dos produtos veterinários, em especial a linha de medicamentos, a avaliação da qualidade destes produtos antes da liberação para a comercialização tem sido uma exigência dos órgãos reguladores.

De acordo com a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, os medicamentos são classificados como injetáveis, orais, tópicos e oftálmicos. Com relação aos medicamentos veterinários, os injetáveis, como soluções aquosas, soluções oleosas, suspensões e emulsões são amplamente utilizados por sua grande eficácia no tratamento ou profilaxia de enfermidades.

Assim, o controle de qualidade microbiológico, não apenas dos processos industriais, como também dos produtos, é uma das ferramentas de boas práticas de fabricação (BPF), capazes de antecipar possíveis problemas como também verificar se os produtos atendem aos parâmetros de qualidade e identidade requisitos necessários à sua comercialização (BRASIL, 2010).

Em uma linha de produção de medicamentos em geral, a água exerce um importante papel sobre o produto final. Neste sentido, as indústrias de medicamentos veterinários adotam como critério de qualidade os padrões estabelecidos em legislações nacionais e internacionais para a avaliação e monitoramento da qualidade da água utilizada durante todo o processo (BRASIL, 2010).

Um dos parâmetros de qualidade para medicamentos veterinários injetáveis é a ausência de endotoxina bacteriana (USP 39, 2016; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005; BRASIL, 2010). Para isso, é fundamental que se estabeleça os pontos críticos de contaminação durante o processo produtivo, desde a aquisição de matérias-primas até o término de fabricação, para que se possa estabelecer procedimentos operacionais que garantam a qualidade do produto desejado.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar e avaliar, em uma indústria de medicamentos veterinários injetáveis os possíveis pontos críticos de contaminação por endotoxina bacteriana em sua linha de produção, e estabelecer procedimentos operacionais que garantam a qualidade do produto desejado.

2.2 Específicos

Elaborar o fluxograma, tanto do sistema de tratamento de água, quanto da linha de produção de medicamentos veterinários injetáveis;

Apontar os possíveis pontos críticos de contaminação por endotoxinas bacterianas em toda linha de produção;

Propor procedimentos para monitoramento e apresentar medidas capazes mitigar ou mesmo controlar/eliminar possíveis focos.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Atual cenário do comércio de produtos veterinários no Brasil

O setor de agronegócio tem grande representatividade no mercado brasileiro, abrangendo 21% de todo o Produto Interno Bruto (PIB) em 2015 (ABIEC, 2016).

Conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN) em 2015, o comércio de produtos veterinários farmacêuticos e imunobiológicos contribuiu com aproximadamente 4,5 bilhões de reais no PIB no ano de 2015.

A tabela 01 demonstra separadamente por linha de produtos, a evolução do faturamento das indústrias que comercializam produtos veterinários farmacêuticos e imunobiológicos do ano de 2011 ao ano de 2015.

Tabela 01 - Faturamento das Indústrias Produtoras de Medicamentos e Produtos Imunobiológicos de 2011 à 2015

Linha de Produtos	2011	2012	2013	2014	2015
AVES	478.442.737	507.286.836	527.924.633	585.380.664	677.260.190
CÃES E GATOS	358.233.968	441.946.232	524.363.136	587.460.846	741.400.782
EQUINOS	46.908.626	58.908.569	73.094.060	83.270.442	97.468.456
RUMINANTES	1.764.441.732	1.855.608.129	2.015.515.622	2.219.615.541	2.390.106.271
SUÍNOS	469.574.245	512.529.316	464.334.558	496.366.769	554.312.258
Total Geral	3.117.601.308	3.376.279.081	3.605.232.010	3.972.094.262	4.460.547.956

Fonte: SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL - SINDAN; Mercado; Disponível em <www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>; acesso em 19/11/2016.

3.2 Categorias de produtos veterinários e formas de administração

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), os produtos são classificados por diferentes formas de aplicação ou administração como injetáveis, orais, tópicos, oftálmicos.

Dando ênfase aos produtos injetáveis, estes são amplamente empregados em animais, por sua grande eficácia no tratamento ou profilaxia de enfermidades. Podem ser classificados como soluções aquosas, soluções oleosas, suspensões e emulsões (BRASIL, 2010).

É considerado produto injetável, não apenas substâncias líquidas, mas também materiais de implante que se permitem serem administrados diretamente aos tecidos internos de um organismo. As vias de administração são diversas, como por exemplo subcutânea, intravenosa, intraperitoneal, intra-articular, intramuscular e intraocular (USP 39, 2016).

Em uma indústria produtora de tais produtos, é necessário a realização de diversas análises de controle de qualidade, tendo em vista que cada produto é destinado para as análises cabíveis ou aplicadas a ele dependendo da sua classificação e forma de administração (USP 39, 2016).

Em uma linha de produção de medicamentos em geral, a qualidade da água exerce um importante papel na qualidade do produto final. Neste sentido as indústrias adotam os padrões de qualidade estabelecidas em legislações nacionais e internacionais.

As especificações de qualidade para cada tipo de água estão descritas na Tabela 02, Tabela 03 e Tabela 04:

Tabela 02 - Especificações para água potável

Parâmetro	Especificação
pH	6,0 a 9,5
Substâncias oxidáveis	Conforme prescrito
Cloro	0,2 a 2 ppm de cloro livre
Sulfato	< 250 ppm
Cálcio	Ausência de turbidez
Amônio	Cor amarelada amostra não deve ser mais intensa que o padrão
Dióxido de carbono	Permanecer límpida
Metais pesados	< 0,5 ppm
Ferro total	< 20 ppm
Dureza total	< 500 ppm
Contagem	< 500 UFC/ml
Coliformes fecais	Ausência

Tabela 03 - Especificações para água purificada

Parâmetro	Especificação
Condutividade	<1,3 µs/cm
TOC	<500 ppb
Contagem	<100 UFC/ml

Fonte: *United States Pharmacopoeia* nº 39, 2016.

Tabela 04 - Especificações para água para injetáveis

Parâmetro	Especificação
Condutividade	<1,3 µs/cm
TOC	<500 ppb
Contagem	<10 UFC/100ml
Endotoxina	<0,25 unidades de endotoxina/ml

Fonte: *United States Pharmacopoeia* nº 39, 2016.

As análises do produto final são classificadas como físico-químicas, microbiológicas e biológicas, e devem ser realizadas com o objetivo de mensurar ou verificar se o produto em pesquisa atende os padrões de qualidade mínimos ou desejáveis para a comercialização (USP 39, 2016).

Dando destaque às análises microbiológicas aplicadas aos produtos injetáveis farmacêuticos veterinários e para que estes atendam os padrões de qualidade desejáveis, devem ser submetidos ao teste de esterilidade e ao teste de detecção de endotoxina bacteriana (pirogênio) (BRASIL, 2010).

3.3 Testes de esterilidade

De acordo com as referências, o método tem por finalidade detectar a presença de microrganismos viáveis como bactérias, bolores e leveduras, permitindo seu crescimento em produtos que tenham sido submetidos a algum processo de esterilização durante a fabricação.

As metodologias empregadas para o teste de esterilidade para produtos injetáveis são descritas nas Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010), *British Pharmacopoeia* (2005) e *United State Pharmacopea* nº 39, (2016).

O teste de esterilidade do medicamento pode ser realizado pela inoculação direta, esta consiste na transferência de massas ou volumes preestabelecidos para meios de cultura com também na forma indireta, pela passagem de uma amostra líquida através de filtro esterilizante. Para a escolha do método deve-se considerar a natureza da amostra, facilidade na execução da técnica, disponibilidade circunstancial e limitações de ordem econômica (BUGNO, 2001).

Quando o produto a ser avaliado apresentar atividade antimicrobiana, procedimentos adicionais para a neutralização desses compostos também são previstos nas metodologias oficiais de análise (BRASIL, 2010).

A escolha do número ou volume de amostras a serem analisadas são descritas na NBR 5426 - Planos de amostragem e procedimentos na inspeção por atributos. Porém, os compêndios indicam, no geral, que o teste de esterilidade deva ser efetuado empregando-se de 10 a 20 unidades do produto (BRASIL, 2010; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005; USP 39).

3.4 Teste de detecção de endotoxina bacteriana/pirogênio

Endotoxinas de origem microbiana são complexos associados à membrana externa de bactérias gram negativas, sejam elas patogênicas ou não, e são a fonte mais significativa de pirogênio em uma indústria farmacêutica (PINTO, 2003).

Os pirógenos são divididos em pirógenos exógenos e endógenos. Os pirógenos exógenos, como endotoxinas bacterianas são substâncias que causam elevação da temperatura corporal quando injetadas em humanos ou animais. Os pirogênios endógenos, como por exemplo as citocinas, são produzidos internamente no organismo, em resposta ao estímulo produzido pelos pirogênios exógenos (PERSONS, 1985; KONEMAN et al., 2001).

A membrana externa de uma bactéria gram negativa está fixada à camada glicopeptídica por uma lipoproteína, fortemente lipofílica. Um componente estrutural de membranas externas de bactérias gram negativas é o

lipopolissacarídeo (LPS). As moléculas de LPS são os principais determinantes antigênicos de superfície bacteriana e é formada basicamente pelas camadas de antígenos-O, cerne, ácido 2-ceto-3-desoxioctulônico (KDO) e o Lipídio A (KONEMAN et al., 2001).

O lipídio A contém duas glicosaminas modificadas por fosfato (PO_4) e número variável de ácidos graxos. É o principal componente responsável pelas manifestações de atividade de endotoxina (KONEMAN et al., 2001).

Na maioria das vezes, as endotoxinas bacterianas são liberadas na lise celular. A figura 01 representa esquematicamente a composição da membrana externa e interna da uma bactéria gram negativa. Na base do lipopolissacarídeo, é encontrado o Lipídio A.

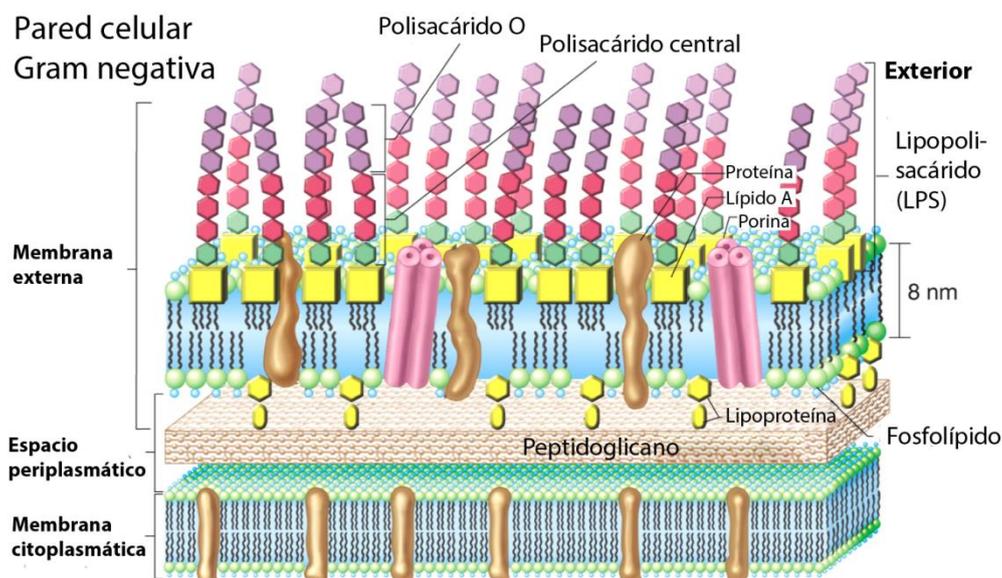


FIGURA 01: Parede celular de uma bactéria gram-negativa.

Fonte: TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10a edição, ed. Artmed, Porto Alegre, 2012.

As endotoxinas geram uma resposta imunológica bastante complexa pois são antígenos fracos não específicos que são pobremente neutralizados por anticorpos, sendo capaz de ativar o sistema complemento. (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Os macrófagos, após a fagocitose, secretam mediadores como citocinas, histamina, interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α). Quantidades em nanogramas de endotoxina pode

causar febre devido à liberação desses pirógenos endógenos, pois atuam no hipotálamo liberando prostaglandinas o que resulta no aumento da produção de calor pelo tecido adiposo marrom (KONEMAN et al., 2001).

Enfatizando todos os malefícios causados pelos efeitos de substâncias pirogênicas em um organismo, é de suma importância que em uma indústria de medicamentos veterinários injetáveis sejam introduzidas diversas formas de controle, com o intuito de detectar as possíveis fontes de endotoxina durante o processo produtivo e no produto final.

3.5 Métodos de análise

Os testes de detecção de endotoxina bacteriana podem ser classificados como “in vivo” e “in vitro” e também estão referenciados na literatura.

O teste de detecção de endotoxina “in vivo” é baseado no ensaio de pirogênio em coelhos. Este teste avalia o aumento da temperatura corpórea dos animais após serem administrados, por via intravenosa, o produto a ser testado (BRASIL, 1996; BRASIL, 2010).

Os ensaios “in vivo” são recomendados para pesquisa de endotoxina em soros antiotídicos e antitetânicos, pois podem causar reação inespecífica com os insumos utilizados nas análises “in vitro”, por exemplo o Lisado de Amebócitos de *Lymulus* (L.A.L.) (BRASIL, 1996).

Reações falso-negativas em produtos hemoderivados e correlatos são devido à capacidade da endotoxina de se ligar às proteínas plasmáticas presentes em tais produtos, não sendo assim detectada pelo L.A.L. (SCHINDLER et al., 2009).

O Teste de detecção de endotoxina utilizando L.A.L. é o ensaio mais simples e amplamente utilizado em indústrias farmacêuticas. O L.A.L. é um extrato dos amebócitos, células sanguíneas da hemolinfa azul, compostos por enzimas que reagem em presença de pequenas quantidades de endotoxina. É extraído do *Lymulus polyphemus*, "carangueijo-ferradura" encontrado em alguns locais na costa do Oceano Atlântico dos Estados Unidos até o Golfo do México (MORALES, 2004).

A detecção de endotoxina utilizando o método *Gel-clot*, disponível no mercado, se baseia na cascata de coagulação enzimática entre o reagente L.A.L. e a endotoxina presente. O fator C é o primeiro componente da cascata de

coagulação, uma protease que é imediatamente ativada na presença da endotoxina e induz a liberação da enzima de coagulação (PINTO, 2003).

Há outros métodos de detecção de endotoxina disponíveis no mercado, também à base do reagente L.A.L. O método cromogênico cinético, que possui um substrato de peptídeo sintético que, ao ser clivado pela enzima de coagulação, exibe uma cor amarela. O método turbidimétrico é composto por um substrato natural que, ao ser clivado na presença de endotoxina, origina um segundo substrato, que induz a formação do gel e conseqüentemente aumento da turbidez. A intensidade da coloração amarela no método cromogênico e da turbidez no método turbidimétrico são diretamente proporcionais à concentração de endotoxina na amostra (PINTO, 2003).

É importante ressaltar que um resultado satisfatório, tanto para o teste de esterilidade, quanto para o teste de detecção de endotoxina bacteriana, indica que a amostra atende aos parâmetros de qualidade, mas não se aplica a todo o lote do produto. A extensão do resultado para todo o lote requer avaliação da segurança dos processos de fabricação e de procedimentos operacionais padrão robustos, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (RDC nº 17, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.0 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado em uma indústria produtora de medicamentos veterinários localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. O sistema de tratamento de água padrão API (água para injetáveis) e a linha de produção de medicamentos injetáveis como complexos vitamínicos, antibióticos e anestésicos, foram representados sob forma de fluxograma.

A análise dos fluxogramas permitiu identificar e avaliar os possíveis pontos críticos de contaminação por endotoxina bacteriana. Uma vez identificados e avaliados, foram propostos procedimentos analíticos para o monitoramento dos mesmos e apresentadas as medidas capazes de mitigar ou mesmo controlar/eliminar os possíveis focos.

No sistema de tratamento de água, a qualidade microbiológica da mesma foi avaliada baseando-se nos parâmetros para potabilidade (contagem máxima de microrganismos heterotróficos e pesquisa de coliformes totais e fecais) estabelecidos pela Portaria Nº 2.914 - Ministério da Saúde (2011), além da pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* devido à habilidade do microrganismo de formar biofilme em superfície de reservatórios e tubulações.

As metodologias de análises de bactérias do grupo coliforme, coliformes de origem fecal (*Escherichia coli*), bactérias heterotróficas e *Pseudomonas aeruginosa* foram as descritas no *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2012).

Para pesquisa de endotoxina bacteriana, tanto nas amostras de água avaliadas durante todo o processo e no produto final, utilizou-se o método "in vitro" (*Gel-Clot*) baseando-se nas metodologias descritas na Farmacopeia Brasileira, 2010, Farmacopeia Britânica, 2005 e na Farmacopeia dos Estados Unidos, 2016.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma indústria de medicamentos injetáveis, pode haver várias linhas de produção que são dimensionadas de forma a atender às especificações de cada categoria de produto e assim garantir a qualidade desejada. A identificação e a avaliação dos possíveis pontos críticos de contaminação tornam-se uma importante ferramenta no monitoramento e controle de contaminantes microbianos e de endotoxina bacteriana.

Os pontos críticos são considerados aqueles pontos onde pode haver contaminação bacteriana do produto, tanto final, como o produto ainda em processo. Água, matérias-primas, materiais de embalagem, tanques, filtros, tubulações, máquinas de envase, ou seja, todo material que entra em contato direto com o produto são considerados pontos de contaminação.

Neste trabalho, o critério adotado para seleção dos pontos críticos de contaminação foi o mapeamento dos mesmos, que nos permitiu ter uma visão geral do sistema de produção e uma análise crítica daqueles que foram controlados e monitorados de forma a não comprometer o processo.

Se um produto utiliza água como matéria-prima, esta deve transcorrer por processos de tratamento até atingir um nível de qualidade satisfatório para ser utilizada em produtos injetáveis. Este "produto" é denominado como água para injetáveis (API).

Conforme o Guia de Qualidade para Sistemas de Purificação de Água para Uso Farmacêutico da ANVISA (2013), o controle da contaminação da água para uso farmacêutico é fundamental, pois a água tem grande susceptibilidade para agregar compostos diversos e pode sofrer contaminação de microrganismos ou recontaminação mesmo após o processo de purificação.

Abaixo está representado o fluxograma de forma esquemática, com a indicação dos possíveis pontos críticos de contaminação microbiana. O mesmo foi elaborado baseado na planta de engenharia desenvolvida pela indústria em questão.

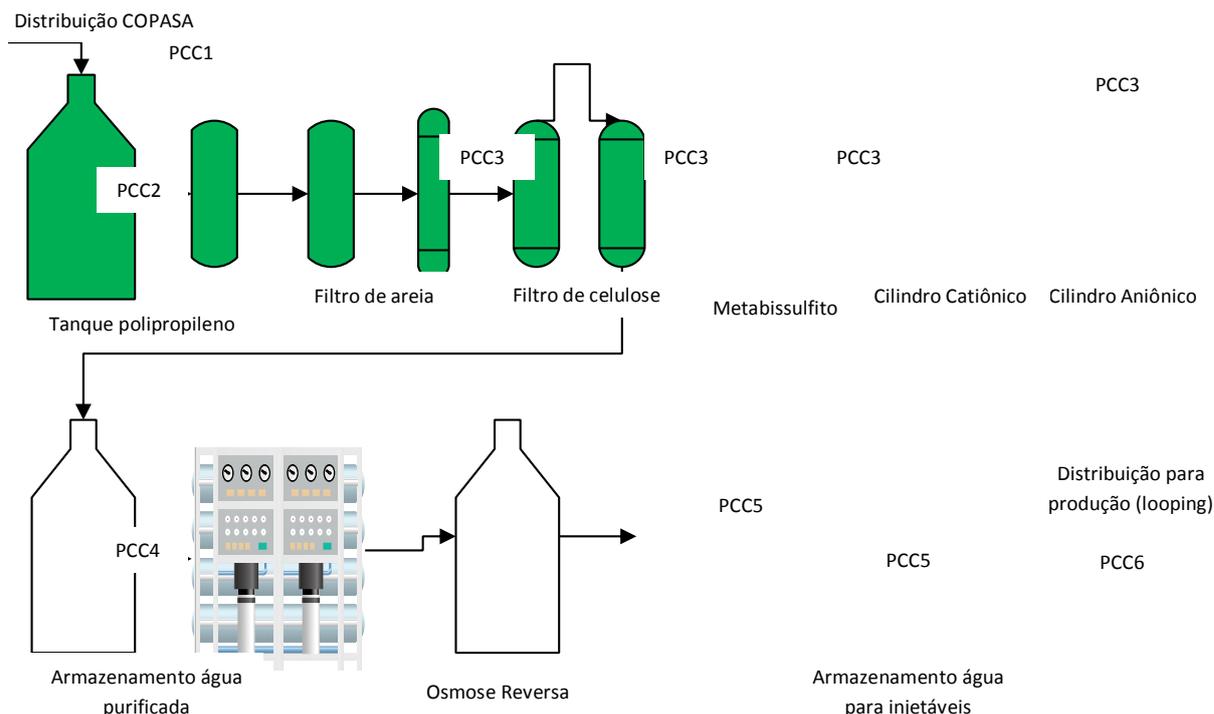


FIGURA 02 - Fluxograma do sistema de tratamento de água padrão API (água para injetáveis) de uma indústria localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Fonte: Próprio autor

Algumas recomendações devem ser consideradas para se estabelecer um fluxograma de tratamento de água que garanta a qualidade do produto desejado.

- 1- Conforme RDC nº 210 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2003) o sistema de tratamento de água não deve ser operado além de sua capacidade instalada, pois isso pode aumentar os riscos de proliferação de microrganismos.

- 2- As instalações e materiais a serem utilizadas na produção de água para injetáveis devem ser projetadas e mantidas procurando assegurar uma produção confiável. (RDC nº 210, 2003)

- 3- Por razões práticas a água farmacêutica é preparada em três etapas conhecidas como: “pré-tratamento”, “tratamento” e armazenamento/distribuição.

O primeiro ponto crítico de contaminação (PCC1) é o fornecimento de água. A fim de minimizar/controlar o risco de introdução de contaminantes no

sistema de produção, a indústria em questão utiliza água fornecida pela concessionária (COPASA), pois esta atende ao padrão de potabilidade, segundo a Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.

A concessionária garante o padrão de potabilidade até o final do sistema de distribuição, cabendo a indústria, o seu armazenamento de forma a garantir sua qualidade.

A mesma é armazenada em tanque de polipropileno (PCC2) e o monitoramento da qualidade microbiológica é baseada nos parâmetros de potabilidade da legislação vigente, além da pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* devido à capacidade do microrganismos de formar biofilmes em superfícies e tubulações.

Para resultados satisfatórios, a água segue em sua trajetória normal no sistema. Para resultados insatisfatórios para qualquer um dos parâmetros, é realizada parada de fornecimento de água ao Sistema de Tratamento para avaliação das não conformidades e ações a serem tomadas. A água deve ser descartada e o tanque deve passar por um processo de limpeza utilizando hipoclorito de sódio 2%. Após a limpeza, é realizada nova amostragem e reanálise das amostras.

Após este processo, inicia-se o tratamento da água para obtenção de água purificada e água padrão API (PCC3). Segundo Gomerzano (2007), a primeira etapa do sistema de tratamento de água é o Pré-tratamento, que tem como finalidade o aumento da qualidade da água potável da rede para que o tratamento final tenha maior eficácia, rendimento e aumento da vida útil de todo o sistema.

De acordo com Gomerzano (2007), os processos de pré-tratamento mais empregados são os seguintes:

- Clarificação;
- Filtração;
- Absorção;
- Redução química (metabissulfito);
- Permutação (troca iônica);
- Desgaseificação;
- Cloração

O sistema de tratamento de água da indústria em questão está de acordo com as recomendações do autor pois, de acordo com o fluxograma, a água da concessionária, após o armazenamento no tanque de polipropileno, é enviada um sistema de filtração de areia, onde retém particulados de tamanho até 40 micras. Em seguida, é passada por filtros de celulose retendo partículas de até 5 micras.

Após isso, através de um sistema de dosagem de metabissulfito de sódio em linha, é realizado processo de decloração. A partir deste processo, a atenção ao crescimento microbiano deve ser maior, pois o sistema não recebe mais substâncias químicas que possam diminuir a concentração de microrganismos.

O cilindro com resina catiônica recebe a água dechlorada onde será realizada a troca de cátions, e posteriormente enviada para o cilindro aniônico, que tem a função de realizar a troca de ânions. Após estes dois processos, a água é considerada isenta de componentes químicos, sendo denominada água purificada (AP).

Para avaliação da eficiência do sistema de "pré- tratamento de água" (PCC3), são realizadas análises microbiológicas da água (potabilidade) em todos os pontos de coleta, através de um rodízio frequente entre eles (semanalmente).

Para resultados satisfatórios, a água é enviada para armazenamento em um tanque de aço inoxidável (PCC4) que abastece a segunda etapa do "tratamento" (osmose reversa). Para resultados insatisfatórios para qualquer um dos parâmetros, o fornecimento é interrompido e realizada sanitização do sistema com peróxido de hidrogênio 2% e ácido peracético 2%. Após esta sanitização, é realizada nova amostragem para reanálise.

Na etapa de osmose reversa, a água é transferida sobre pressão em filtros de poliamida aromática. Após este processo (PCC5), é armazenada em tanque de aço inoxidável e denominada-se a produção de água para injetáveis (API).

Osmose é o nome usado para descrever o fenômeno de passagem da água através de membranas semipermeáveis. Quando duas soluções estão separadas por uma membrana deste tipo, a água começa a fluir do lado menos concentrado para o lado mais concentrado. Este fluxo pode ser invertido, aplicando-se do lado mais concentrado, uma pressão superior à pressão

osmótica sendo este o mecanismo da osmose reversa. Desta forma na osmose reversa a água é purificada por passagem através de membranas semipermeáveis contra gradiente de concentração por ação da pressão (GOMERZANO, 2007).

Idealmente as membranas de osmose reversa deveriam ser permeáveis a água, mas impermeáveis a sólidos, resistir as elevadas pressões de trabalho, tolerar uma ampla escala de pH e temperatura e resistir ao ataque de produtos como cloro livre e bactérias. Mas as membranas de celulose foram as primeiras utilizadas para osmose reversa, pois possuem custo muito baixo, mas tinham grandes limitações em termos de pH, temperatura, hidrólise e resistência aos ataques biológicos. As membranas de poliamida aromática foram desenvolvidas para melhorar estes inconvenientes, mas embora possuam melhores propriedades, são danificadas pelo cloro (GOMERZANO, 2007). Por este motivo, é de suma importância a decoloração da água durante as etapas do "pré-tratamento".

O sistema de distribuição da água padrão API para os setores de produção, é denominado "looping" (BRASIL, 2013). O material de construção de uma rede de distribuição de água para injetáveis deve ser em aço inoxidável, conforme recomendação do Guia de sistema de tratamento de água da Anvisa.

A obrigatoriedade da utilização do aço inoxidável é a possibilidade de sanitização com água quente ou vapor, pois a utilização de materiais poliméricos, por exemplo tubos de PVC, implica normalmente na necessidade de uma sanitização química, o que não é viável para qualificação de água para injetáveis (ANSEL, 2000).

De acordo com o autor, o reservatório de armazenagem representa um grande risco de contaminação. Para prevenir esta contaminação pode-se adotar as seguintes estratégias:

- Entrada da água por spray ball;
- O reservatório não deve esvaziar muito rapidamente e nem muito lentamente;
- A entrada de ar no tanque se dá através de um vent filter 0,2 micras.

Os pontos após osmose reversa (PCC5) e os pontos localizados na tubulação de distribuição da água (PCC6), são realizadas as seguintes análises: teste de contagem máxima de microrganismos através de filtração por

membrana e teste de detecção de endotoxina bacteriana. Utiliza-se a mesma metodologia de amostragem dos pontos de coleta de água do "pré-tratamento".

Para resultado satisfatório para o teste de detecção de endotoxina, é permitido o fornecimento de água para o tanque de formulação. Quando reprovado, o sistema é interrompido imediatamente e é realizada sanitização química ou térmica. A sanitização química é realizada no sistema com peróxido de hidrogênio 2% e ácido peracético 2%. A sanitização térmica é realizada com aumento da temperatura da água, acima de 80°C, do sistema de armazenamento e distribuição e esta é descartada.

É de suma importância e estratégico a realização das análises no sistema de distribuição (PCC6), pois são os últimos pontos que qualificam a água para injetáveis antes do fornecimento para o setor de produção de medicamentos.

Uma vez finalizada o processo de tratamento de água de forma que a mesma atende as especificações API, inicia-se a etapa de produção do medicamento.

Na linha de produção, desde o tanque de formulação (1º equipamento da linha de produção após sistema de tratamento de água) até o bico de envase (último material da linha de produção), deve-se comprovar a eficiente sanitização e esterilização da linha e dos materiais, em seguimento com as Boas Práticas de Fabricação (RDC nº 17, 2010).

As Boas Práticas de Fabricação é ferramenta crucial na identificação, controle de contaminantes e para rastreabilidade de processos industriais.

Abaixo está representado o fluxograma de forma esquemática da linha de produção de medicamentos injetáveis veterinários da indústria em questão com a indicação dos possíveis pontos críticos de contaminação microbiana. Pequenas adequações podem ser realizadas a fim de atender as especificações e natureza do produto desejado.

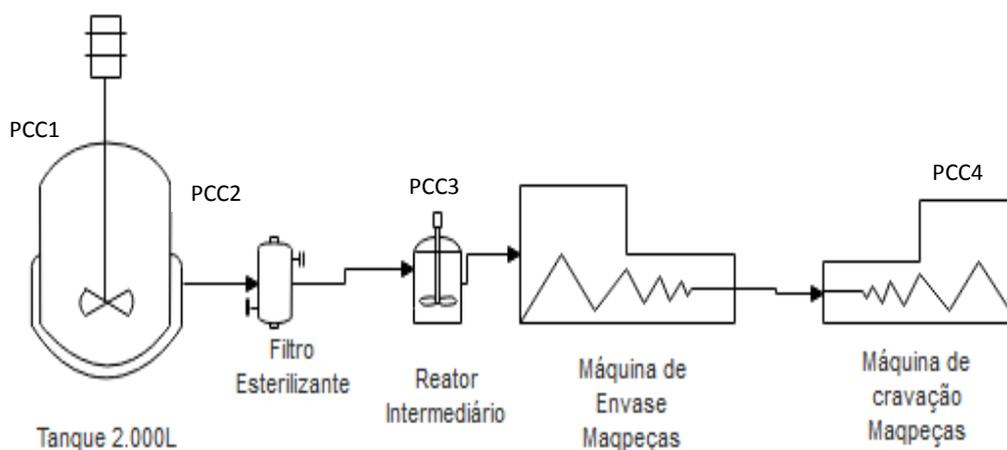


FIGURA 03 - Fluxograma da linha de produção de medicamentos veterinários injetáveis de uma indústria localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Fonte: Próprio autor

O primeiro equipamento do fluxograma é o tanque de formulação de 2000 litros (PCC1). Após o recebimento de água padrão API através do "looping", considera-se ponto crítico de controle de detecção de endotoxina bacteriana, pois é possível comprovar a eficiência da limpeza e sanitização deste tanque para receber um novo produto. A sanitização do tanque é realizada com hidróxido de sódio na concentração de 5,6%.

Para resultado satisfatório para o teste de detecção de endotoxina, é permitido o processo de formulação do medicamento. Para resultado insatisfatório, toda água do tanque deve ser descartada e o tanque novamente sanitizado com hidróxido de sódio na concentração de 5,6%.

Na indústria em questão, as matérias-primas fornecidas por indústrias que ainda não sofreram o processo denominado por qualificação de fornecedor, são submetidas ao teste de detecção de endotoxinas. A natureza da matéria-prima também é fator para avaliação da aplicabilidade deste teste.

Após formulação completa do medicamento, o tanque é pressurizado com nitrogênio gasoso previamente filtrado em filtro hidrofóbico 0,22 micras, com pressão de aproximadamente 2 bar. Esta pressão é necessária para possibilitar a transferência do medicamento até o reator intermediário.

É considerado ponto crítico de controle o medicamento formulado, após o recebimento de todas as matérias-primas (PCC2). O teste de detecção de endotoxina bacteriana é realizado em uma amostra antes de todo medicamento passar pelo filtro esterilizante, conforme demonstra no fluxograma.

Para resultado satisfatório para o teste de detecção de endotoxina, é permitido o processo de filtração e envase do medicamento. Para resultado insatisfatório, é impedido a continuação do medicamento no fluxograma e todo conteúdo do tanque deve ser descartado.

Entre a transferência do medicamento do tanque de formulação até o reator intermediário, ocorre a filtração deste, em filtro esterilizante 0,22 micras, que garante a esterilidade do produto.

O reator intermediário (PCC3) deve ser esterilizado previamente antes do recebimento do medicamento, e tem a função de abastecer a máquina de envase. O monitoramento deste ponto não está incluído na rotina de controle, pois afetaria diretamente no tempo de produção do medicamento e impossibilitaria a finalização do envase e crava até o fim do expediente diário dos colaboradores.

Tanto o reator intermediário como a máquina de envase permanecem sob fluxo laminar unidirecional, que garante a qualidade do ar ideal para produtos estéreis.

Através de pistão mecânico, o produto é transferido do reator intermediário diretamente para os frascos destinados ao medicamento. É importante ressaltar que estes frascos passaram por um processo de despirogenização.

Após o envase do produto nos frascos, imediatamente é realizado "batoque". O "batoque" é o primeiro processo de fechamento dos frascos, onde estes recebem a rolha ou tampa também despirogenizada.

O segundo processo de fechamento dos frascos ocorre na máquina de crava, último equipamento do fluxograma. Neste equipamento o frasco recebe um selo de alumínio que é cravado sobre a rolha ou tampa, possibilitando o fechamento total do frasco.

Esta última etapa garante a estanqueidade do frasco, impossibilitando qualquer risco de contaminação deste produto (PCC4).

Após todo o processo de formulação, filtração, envase do medicamento e crava dos frascos, é realizado o teste de detecção de endotoxina bacteriana nas amostras do produto considerado "acabado". Juntamente com o teste de detecção de endotoxinas é realizado teste de esterilidade por filtração em membrana. Estes são os testes aprobatórios ou reprobatórios para este medicamento.

6.0 CONCLUSÃO

A apresentação do sistema de tratamento de água e da linha de produção de medicamentos veterinários injetáveis na forma de fluxograma, proporcionou uma visão sistêmica do processo permitindo identificar os possíveis pontos de contaminação microbiana;

Uma vez identificado os pontos críticos de contaminação no sistema de tratamento de água (PCC1 ao PCC6) e na linha de produção (PCC1 ao PCC4), foi possível estabelecer um plano de gestão de risco com tomadas de decisão capazes de controlar ou mesmo eliminar as fontes de contaminação por endotoxinas bacterianas sem que comprometesse o processo produtivo;

O mapeamento e a avaliação de risco dos pontos críticos de contaminação contribuem para o desenvolvimento de processos produtivos mais robustos, diminuindo assim o potencial risco de contaminação, gerando menor perda econômica para a indústria e garantindo níveis aceitáveis de qualidade microbiológica do produto final.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Farmacotécnica. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. São Paulo, Premier, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil, Relatório Anual 2016. **APEXBRASIL**, São Paulo, 2016.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **ANVISA**, 546p, 2010.

BRASIL. Guia de Qualidade para Sistemas de Purificação de Água para Uso Farmacêutico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**, Brasília-DF, 2013.

BRASIL. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996. Normas Técnicas de Fabricação e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirábico. **Ministério da Saúde**, 11 de novembro de 1996.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade. Ministério da Saúde, **Diário Oficial da União**, 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N.º 17, de 16 de abril de 2010, dispõem sobre as Boas Práticas de Fabricação. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 19 de abril de 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº. 210, de 4 de agosto de 2003. Regulamento Técnico das Boas Práticas pra a Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, 14 de agosto de 2003.

BRITISH PHARMACOPOEIA, London, **Her Majesty's Stationery Office**, Volume II; 2005.

BUGNO, A. Esterilização: Validação de metodologia e propostas de otimização de resultados. 161p. **Dissertação (Mestrado em Área de Produção e Controle Farmacêuticos)** – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GOMERZANO, L. Produção de água para indústria farmacêutica, **Revista Controle de Contaminação**. 36(9): 23 – 39 , 2007.

KONEMAN E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 5a edição, ed. Medsi, São Paulo, 2001.

MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebócito de Lymulus. **Revista Cubana de Farmacia**, V.38, 2004.

MURPHY K.; TRAVERS P.; WALPORT M.; Imunologia de Janeway. 7a edição, ed. Artmed, Porto Alegre, 2010.

PERSONS, F. C. Pyrogens Endotoxins, LAL Testing and Depyrogenation. New York, NY: Marcel Decker, p. 3-44, 1985.

PINTO, T. J. A. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2a ed. São Paulo: **Atheneu**, 325p. 2003.

SCHINDLER, S. et al. Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, Germany, v.26, p. 265-277, 2009.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL - SINDAN. Mercado; Disponível em: www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8, acesso em 19/11/2016.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA - USP Nº 39. The United States Pharmacopeial Convention. 2016.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10a edição, ed. **Artmed**, Porto Alegre, 2012.