MÉTODO ANALÍTICO TOC EM VALIDAÇÕES DE LIMPEZA

O objetivo de um processo de limpeza na indústria farmacêutica é reduzir a possibilidade de contaminação cruzada nas mudanças de fabrico de diferentes produtos, eliminando ou reduzindo a presença de possíveis contaminantes. A validação dos processos de limpeza nestas mudanças apresenta como dificuldade o amplo espectro de impurezas e contaminantes potenciais, bem como as limitações das técnicas analíticas. A análise de **TOC (Carbono Orgânico Total)** mede todos os resíduos orgânicos com base no seu conteúdo em carbono e fornece informação essencial para avaliar o estado validado do processo de limpeza.

A análise de TOC mede todos os resíduos orgânicos em função do seu conteúdo em carbono e fornece informação necessária para avaliar o estado validado do processo de limpeza.

O TOC é um método analítico **específico para carbono** e **inespecífico para moléculas**. Trata-se de uma técnica altamente sensível, com baixo limite de quantificação, capaz de medir qualquer composto que contenha carbono na sua molécula, incluindo múltiplos resíduos potenciais de componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, endotoxinas, bem como princípios ativos, detergentes e degradados do processo de limpeza. Quando utilizamos o método analítico TOC nas atividades de verificação e validação de limpezas, é necessário validar o método com limites de deteção e quantificação adequados.

Aspetos importantes a ter em conta no método analítico TOC

Por vezes não prestamos atenção suficiente a detalhes importantes que afetam e interferem na medição de TOC e que são facilmente evitáveis.

1. Contaminação
Resultados anormalmente elevados na medição dos brancos, ou uma tendência crescente dos valores de TOC em repetições sucessivas, indicam contaminação das amostras, embora as causas possam ser diversas.
Os solventes orgânicos têm um elevado teor de carbono. Deve evitar-se a presença de vapores orgânicos na área de amostragem e preparação de brancos e soluções. Não colocar o analisador TOC próximo de zonas onde se realizem extrações orgânicas ou de equipamentos que utilizem solventes orgânicos.

Os recipientes e vials utilizados na preparação de soluções e na amostragem TOC devem estar limpos. Isto significa que devem ser limpos seguindo um procedimento adequado para TOC ou, em alternativa, utilizar vials com certificado de limpeza que garantam um aporte mínimo de carbono.

Na preparação das soluções para os estudos de exatidão, precisão e linearidade, deve ser utilizado material volumétrico limpo e dedicado especificamente ao TOC.

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

Na amostragem SWAB, as torundas e os vials devem ser de baixo teor de TOC. Deve preparar-se um branco que permita determinar o aporte de carbono de todos os materiais utilizados na amostragem (vial, tampa, torunda, água). É conveniente agitar ou sonicar as amostras para facilitar a libertação dos compostos da superfície da torunda, analisando a amostra sem retirar a cabeça da torunda do vial. A tampa dos vials deve ter a superfície interior teflonada para evitar o aporte de carbono proveniente do elastómero.

Os brancos de TOC para amostragem SWAB, em condições ambientais adequadas, costumam ser inferiores a 200 ppb de carbono.

2. Baixas recuperações na medição dos compostos

Em biotecnologia, onde as amostras de limpeza podem conter diversos componentes celulares, podem ocorrer baixas recuperações devido à adesão de proteínas às superfícies do vial e da torunda. O uso de vials pré-acidificados melhora significativamente as recuperações, facilitando a extração dos swabs e a libertação dos compostos da superfície do vial.
O TOC é um método adequado para a medição de traços de detergentes utilizados na limpeza. É necessário realizar um estudo de recuperação e validar a exatidão e linearidade do método para o detergente. A acidificação das amostras de detergente melhora a recuperação.

A oxidação completa implica a rutura de todas as ligações do carbono até CO_2. Devem otimizar-se as condições de oxidação do analisador TOC para assegurar que a oxidação é completa. A oxidação por radiação UV tem capacidade limitada. É necessário garantir elevada capacidade oxidativa do analisador e validar a recuperação dos produtos no intervalo que abranja o limite de arrastamento. Analisadores que detetam CO_2 por condutividade podem sofrer interferências devido à presença de espécies iónicas geradas durante a oxidação, originando resultados imprecisos ou fora de especificações. Nestes casos, é necessário separar o CO_2 da amostra antes da medição.

3. Instrumentação

Os diferentes analisadores TOC disponíveis no mercado partilham um fundamento comum: oxidação dos compostos orgânicos e medição do CO_2 gerado. No entanto, utilizam tecnologias distintas tanto para a oxidação como para a deteção do CO_2. A qualificação funcional da técnica analítica é necessária para garantir que a oxidação é completa, que não existem interferências na deteção do CO_2, que a recuperação de diferentes compostos é correta e que a alteração de parâmetros como a condutividade ou o pH não afeta a medição do carbono.
A qualificação do equipamento com protocolos IQ, OQ e PQ é imprescindível para cumprir os requisitos GMP e verificar que o analisador é específico para carbono e robusto, de acordo com os requisitos USP, EP e ICH Q2(R1). Devem ser realizados os seguintes testes de verificação funcional:

- Teste de exatidão e precisão
- Teste de linearidade no intervalo de medição
- Teste de idoneidade (system suitability)
- Determinação dos limites de deteção e quantificação
- Teste de robustez, modificando parâmetros da amostra como pH ou condutividade
- Teste de especificidade, verificando a recuperação correta do carbono com diferentes compostos orgânicos

Após a qualificação da técnica analítica, é necessário demonstrar que o método é adequado para medir os produtos de interesse acima e abaixo dos limites de aceitação para arrastamento, através de um estudo de linearidade, exatidão e precisão, preparando diferentes concentrações de produto que abranjam o limite de arrastamento.

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

Determinação dos limites de aceitação para o arrastamento em TOC com base num critério toxicológico

A abordagem convencional para determinar os limites de aceitação dos resíduos de um processo de limpeza parte da premissa de que o princípio ativo (API) permanece química ou funcionalmente intacto após o processo de limpeza. Esta abordagem exige a utilização do conceito de MAC e de valores de referência como a PDE (dose diária permitida).

A necessidade de calcular o valor MAC (Maximum Allowable Carryover) surge da prática de mudança de produtos nas instalações de fabrico. Uma mudança de produto ocorre quando um reator é esvaziado de um produto A e posteriormente é carregado com um produto B. O valor MAC indica quanto produto A do último lote fabricado pode estar presente de forma segura no primeiro lote do produto B, sem representar risco para o paciente.

Os cálculos do MAC começam a partir de valores de referência específicos para cada produto. Alguns destes valores são a dose terapêutica diária, a dose de exposição diária permitida ou dose diária aceitável, e a dose letal para 50% da população.

Os limites de aceitação para o arrastamento de resíduos devem ser estabelecidos com base em critérios toxicológicos, e devem igualmente ser definidos limites para a eliminação dos produtos de limpeza. Partiremos da PDE (dose específica de uma substância que não causa efeitos adversos se um indivíduo estiver exposto a essa dose ou inferior durante todos os dias da sua vida) como valor de referência dos produtos para o cálculo do MAC.

É necessário conhecer a identidade dos produtos, o menor tamanho de lote do produto seguinte B e construir uma matriz baseada nos valores de referência toxicológicos (PDE) dos produtos para determinar o valor MAC. O limite de aceitação será definido com base na matriz de dados para o caso mais desfavorável, para cada equipamento de produção.

O MAC, por si só, não é suficiente para libertar o equipamento para uso. É necessário determinar o limite de aceitação como produto, a partir do valor MAC. Para transformar o MAC em limite de produto (ppm), deve ser considerado o método de amostragem.

Os métodos de amostragem habituais são:

- Amostragem SWAB ou com torunda de uma área determinada do interior do equipamento
- Amostragem da água de enxaguamento

Exemplo de amostragem de superfície com SWAB:

Datos: MAC= 400 mg
Superficie contacto del equipo= 100000 cm2
Área muestreada con torunda= 25 cm2
Volumen de extracción de la torunda = 40 ml

Límite de producto en muestreo SWAB (mg/cm^2) =
MAC (mg)
Superficie equipo (cm2)
Límite de producto =

= 400 mg
100000 cm2 = 0,004 mg/cm2= 4 µg/cm2

4 µg/cm2 x 25 cm2 = 100 µg

100µg/0,004L= 2500 µg/L (ppb)= 2,5 ppm

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

Para converter o limite de produto em limite de TOC, considera-se o teor de carbono da molécula a partir da fórmula química do composto.

Exemplo:

%C= 50% → Límite como TOC = 1,25 ppm (C)

Concluímos que, partindo de valores de referência defensáveis, o valor MAC para o produto A no produto B é de **4 µg/cm²**. Quando utilizamos a tecnologia TOC na validação de processos de limpeza, com base no MAC e no método de amostragem, o valor limite de TOC do produto A no produto B é de **1,25 mg/L (ppm)**.

Determinação do limite de aceitação para limpezas em processos biotecnológicos com base na capacidade do processo de limpeza

O conceito de limite de aceitação de limpezas baseado no produto intacto provém da fabricação de fármacos com moléculas pequenas. No entanto, os produtos utilizados em biotecnologia são moléculas grandes que tendem a degradar-se e a inativar-se nas condições do processo de limpeza. As abordagens alternativas para determinar os limites de aceitação baseiam-se no princípio de que o API se inativa durante o processo de limpeza.

Embora os limites de aceitação sejam habitualmente determinados com base no API intacto, nos processos biotecnológicos os API degradam-se normalmente em produtos farmacologicamente inativos durante as limpezas. Por este motivo, o limite de aceitação deve ser estabelecido com base nos resíduos potenciais do processo, considerando as características do próprio processo de limpeza.

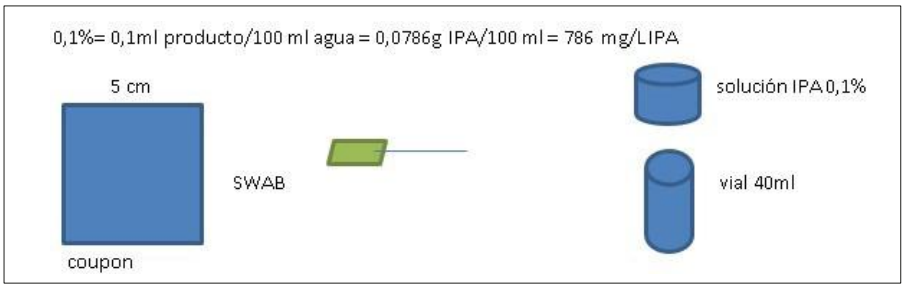
Na biotecnologia trabalha-se com moléculas grandes (anticorpos monoclonais, proteínas com ação terapêutica...) produzidas em reatores por organismos vivos, em vez de serem extraídas de fontes naturais ou sintetizadas. Os ciclos de limpeza dos equipamentos são concebidos para expor as áreas de contacto com o produto à ação de detergentes com pH ácido e alcalino. Nestas condições, os detergentes hidrolisam as ligações peptídicas, gerando produtos biologicamente inativos por degradação e desnaturação, eliminando assim o risco de arrastamento de produto ativo.

A etapa final dos processos de limpeza consiste num enxaguamento com água de qualidade WFI (água para injetáveis). Os volumes e caudais deste enxaguamento final são definidos para garantir a eliminação dos resíduos de detergentes até níveis de TOC e condutividade equivalentes aos da água WFI utilizada. A eliminação, durante o enxaguamento, do produto inativado ou dos seus fragmentos pode ser avaliada através de um estudo de limpeza no qual o produto inativado é aplicado numa superfície e se simula um enxaguamento nas condições reais dos ciclos de limpeza.

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

O estudo de inativação demonstra que o resíduo não é ativo nas condições do processo de limpeza. O estudo de limpeza (cleanability) demonstra que os fragmentos gerados nas condições do processo não apresentam risco de arrastamento.



Preparación de Solución IPA

A maioria dos compostos utilizados em processos biotecnológicos (por exemplo, API, proteínas celulares, meio nutritivo, detergentes) contém carbono na sua composição. A aplicação do método analítico TOC para a deteção de resíduos de produtos é mais exigente do que outros métodos específicos e permite detetar todos os possíveis resíduos que contenham carbono na sua molécula, incluindo compostos potencialmente difíceis de eliminar. O método analítico TOC é sensível (com limites de deteção e quantificação na gama dos ppb) e pode ser utilizado para amostragem de superfícies, águas de enxaguamento e monitorização contínua.

Existem diferentes abordagens alternativas ao cálculo do MAC (que apresenta aplicabilidade limitada para produtos biofarmacêuticos) para a determinação dos limites de aceitação. Desenvolve-se o critério baseado na capacidade do processo de limpeza, assumindo-se a inativação do produto nas condições estabelecidas para o processo de limpeza.

O limite de aceitação é determinado com base na demonstração de que todos os produtos que contêm carbono são eliminados para valores inferiores ao limite da capacidade do processo de limpeza. O TOC é o método analítico mais adequado para demonstrar a eliminação dos resíduos, e o limite da capacidade do processo baseia-se na contribuição de TOC da água WFI utilizada no enxaguamento final. Para o cálculo do limite, consideram-se a superfície do equipamento em contacto com o produto, o menor volume de produto processado no equipamento, o TOC da água WFI e a área friccionada durante a amostragem com torunda.

É importante recordar que o produto ativo não constitui uma preocupação, uma vez que não estará presente após o processo de limpeza. Os fragmentos de produto não proteicos serão eliminados durante o processo de purificação, e os fragmentos proteicos serão facilmente removidos das superfícies durante a limpeza.

$$\text{Límite de residuo como TOC } (\mu g/cm^2) = \frac{\text{Mínimo volumen x TOC agua WFI}}{\text{Superficie del equipo}}$$

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

Para o método de amostragem de superfícies com torunda, tendo em conta a área amostrada e o volume de água utilizado na extração do swab, determina-se o limite de limpeza aceitável como TOC. Os limites calculados segundo este critério são baixos e, por isso, constituem um limite conservador que garante a eliminação de todos os compostos que contenham carbono, bem como dos detergentes de limpeza.

Estudo de recuperação

O estudo de validação desenvolvido para o método analítico TOC deve demonstrar a exatidão, precisão e linearidade no intervalo de medição que abranja o limiar de segurança. A sensibilidade do método será estabelecida através da determinação dos limites de deteção e quantificação.

Exemplo de recuperação para o desinfetante IPA (C_3H_8O), 2-propanol

Densidad IPA= 786 kg/m^3 → 786 x 1000 g/Kg x 1/106m^3/cm^3 = 0,786 g/mL

Prepara-se uma solução-mãe a 0,1% a partir do produto. Adiciona-se uniformemente uma alíquota de 0,1 ml ao *coupon* com uma superfície de 25 cm^2; deixa-se secar nas mesmas condições do processo. Recolhe-se o resíduo com a torunda seguindo um procedimento estabelecido e realiza-se a extração com 40 ml de água.

$$\frac{0{,}1\text{ml} \times 786\text{ mg/l}}{0{,}04\text{L}} = 1{,}96$$

Pureza del IPA= 70%;

%C IPA= 60%

1,96 x 0,7 x 0,6= 825 ppb (µg/L) como C

As torundas, as placas, os vials e a própria água contribuem com TOC. É necessário realizar um branco para determinar o aporte de carbono de todos os materiais que entram em contacto com o produto. A determinação do branco realiza-se enchendo um vial com água purificada e fechando-o com uma tampa com septo de teflon. A torunda humedecida é passada sobre a superfície da placa, fabricada do mesmo material que o equipamento, utilizando uma técnica de fricção definida. Corta-se a cabeça da torunda e introduz-se no vial com água. Agita-se ou sonica-se e mede-se o TOC. Este valor do branco será subtraído ao resultado de TOC das soluções de produto para determinar a recuperação da técnica de amostragem, em relação ao valor esperado de 825 ppb.

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.

Conclusão

Os analisadores de TOC oxidam os compostos orgânicos e medem seletivamente o CO_2 produzido durante a oxidação. Determinam o TOC como a diferença entre o Carbono Total e o Carbono Inorgânico. A técnica apresenta como vantagem a elevada sensibilidade a todos os compostos orgânicos em meio aquoso, incluindo degradados do processo de limpeza e compostos inesperados. É um método simples e aplicável a todas as fases do processo: conceção, validação e verificação contínua.

Referências

(1) "Guidance for Industry. Process Validation: General Principles and Practices". FDA Pharmaceutical Quality/ Manufacturing Standars (CGMP).

(2) Cleaning verification: A five parameter study of a Total Organic Carbon method development and validation for the cleaning assesment of residual detergents in manufacturing equipment. "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analisis".

Artigo elaborado pelo departamento de Farma de INSTRU - Instrumentação Analítica, S.A.

Avenida António Augusto Aguilar, nº19-4 Dto. Sala B
1050-012 Lisboa
Portugal
info@instru.pt

©2026. Todos os direitos reservados.