



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Validação da filtração esterilizante aplicada à produção
do radiofármaco DOT-IPEN-177
Versão original**

VINÍCIUS LIMA TORRES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientadora:
Prof. Dra. Margareth Mie Nakamura
Matsuda

São Paulo
2024

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Validação da filtração esterilizante aplicada à produção
do radiofármaco DOT-IPEN-177
Versão original**

VINÍCIUS LIMA TORRES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

Orientadora:
Prof. Dra. Margareth Mie Nakamura
Matsuda

São Paulo
2024

Fonte de Financiamento: IPEN/CNEN

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Como citar:

OLIVEIRA, V. L. T. d. **Validação da filtração esterilizante aplicada à produção do radiofármaco DOT-IPEN-177**. 2024. 85 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Vinicius Lima Torres de
Validação da filtração esterilizante aplicada à produção do radiofármaco DOT-IPEN-177 / Vinicius Lima Torres de Oliveira; orientadora Margareth Mie Nakamura Matsuda. -- São Paulo, 2024.
85 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde (Medicina Nuclear e Radiofarmácia) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2024.

1. validação. 2. filtração esterilizante. 3. radiofármacos. 4. protocolo. I. Matsuda, Margareth Mie Nakamura, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Vinícius Lima Torres de Oliveira

Título: Validação da filtração esterilizante aplicada à produção do radiofármaco DOT-IPEN-177

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde, pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Data: 30/10/2024

Banca Examinadora

Prof. Dra.: Margareth Mie Nakamura Matsuda

Instituição: IPEN/CNEN -SP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dra.: Patricia de Andrade Martins

Instituição: IPEN/CNEN -SP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Fabio Luiz Navarro Marques

Instituição: FM – USP

Julgamento: Aprovado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e sabedoria que me acompanharam em cada passo desta jornada. À minha mãe e minha irmã, agradeço pelo amor incondicional e pelo apoio constante, fundamentais para o meu crescimento. À minha orientadora, Dra. Margareth, sou eternamente grato pelo ensinamento e pela orientação valiosa durante esta etapa. Agradeço também ao Carlos Felgueiras, cujas aulas na área microbiológica foram inspiradoras e enriquecedoras.

Aos amigos que a instituição me proporcionou conhecer, especialmente Luan e Laura, meu sincero agradecimento pela colaboração e amizade durante o desenvolvimento da pesquisa. Aos meus queridos amigos de Belo Horizonte, Luana, Larissa, Kenedy e Raphael, que estiveram ao meu lado em cada fase, torcendo e vibrando pelo meu sucesso, muito obrigado.

Agradeço a equipe do Laboratório de Microscopia e Microanálise – LMM, especialmente ao Dr. Glauson Machado pelas análises das imagens microscópicas.

Por fim, uma menção especial à minha avó, Valda. Se não fosse por ela, eu não teria conseguido vir para São Paulo e realizar meus sonhos. Seu apoio incondicional é uma fonte de motivação que levarei sempre comigo.

RESUMO

OLIVEIRA, V. L. T. d. . **Validação da filtração esterilizante aplicada à produção do radiofármaco DOT-IPEN-177**. 2024. 85 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo.

Os radiofármacos são definidos como preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica e em geral, possuem dois componentes: um radionuclídeo e um vetor fisiológico que, quando administrado, seja direcionado para um determinado tecido ou órgão. Por ser uma preparação farmacêutica e para ser administrado em seres vivos precisa atender os requisitos de esterilidade. A esterilização de medicamentos pode ser realizada por esterilização terminal ou por filtração asséptica. A filtração esterilizante é o método de escolha para esterilização de radiofármacos e deve ser validado para comprovar que a esterilização do produto nas condições reais de processo (temperatura, pressão, tempo de filtração), que o filtro não causa alterações prejudiciais à composição do produto e que o produto não altera a eficiência do filtro. O objetivo deste trabalho é elaborar o protocolo de validação da filtração esterilizante do radiofármaco octreotato tetraxetana (177 Lu), análogo da somatostatina marcado com lutécio radioativo indicado para o tratamento de tumores neuroendócrinos. O nome comercial de octreotato tetraxetana (177 Lu) produzido no IPEN é DOT-IPEN-177. O protocolo foi desenvolvido de acordo com o relatório técnico da *Parenteral Drug Association*, e testes preliminares microscópicos foram realizados com a membrana filtrante, além da análise da cepa *Brevundimonas diminuta* quanto à sua viabilidade. Os resultados iniciais confirmaram a eficácia dos filtros na retenção microbiológica, ressaltando a importância do protocolo de validação para garantir a segurança do processo.

Palavras-chave: validação, filtração esterilizante, radiofármacos, protocolo, DOT-IPEN-177.

ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are defined as pharmaceutical preparations with diagnostic or therapeutic purposes and generally consist of two components: a radionuclide and a physiological vector that, when administered, is directed to a specific tissue or organ. As a pharmaceutical preparation, and to be administered in living beings, it must meet sterility requirements. The sterilization of medications can be carried out by terminal sterilization or by aseptic filtration. Sterilizing filtration is the method of choice for sterilizing radiopharmaceuticals and must be validated to ensure that the sterilization of the product under real process conditions (temperature, pressure, filtration time) is effective, that the filter does not cause harmful changes to the product's composition, and that the product does not affect the filter's efficiency. The aim of this work is to develop the validation protocol for the sterilizing filtration of the radiopharmaceutical octreotate tetraxetane (^{177}Lu), a somatostatin analogue labeled with radioactive lutetium indicated for the treatment of neuroendocrine tumors. The commercial name of octreotate tetraxetane (^{177}Lu) produced at IPEN is DOT-IPEN-177. The protocol was developed in accordance with the technical report from the Parenteral Drug Association, and preliminary microscopic tests were performed with the filter membrane, along with the analysis of the *Brevundimonas diminuta* strain regarding its viability. Initial results confirmed the effectiveness of the filters in microbiological retention, highlighting the importance of the validation protocol to ensure process safety.

Keywords: validation, sterilizing filtration, radiopharmaceuticals, protocol, DOT-IPEN-177.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do radiofármaco octreotato tetraxetana (^{177}Lu).	11
Figura 2 – Fórmula molecular do Policarbonato.....	15
Figura 3 – Estrutura molecular do Nylon 66.	16
Figura 4 – Fórmula do Acetato de Celulose.	16
Figura 5 – Fórmula molecular da Polietersulfona (PES).	17
Figura 6 – Fórmula molecular do Politetrafluoretileno (PTFE).....	17
Figura 7 – Fórmula molecular do Fluoreto de Polivinilideno (PVDF).....	18
Figura 8 – Filtro <i>Millex® Millipore GV</i> (de 33 mm de diâmetro com membrana PVDF <i>Durapore®</i> de 0,22 μm , número de catálogo: SLGVR33RS).....	19
Figura 9 – Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol.....	26
Figura 10 – Equipamento de Teste de Integridade Palltronic.....	28
Figura 11 – Microscopia da membrana (a) e seu verso (b) antes da filtração do DOT-IPEN-177.....	32
Figura 12 – Microscopia de membrana após filtração do DOT-IPEN-177 (8000X)...	33
Figura 13 – Imagem microscópica da membrana após passagem de <i>Pseudomonas paraeruginosa</i> com ampliação de 5000X e um zoom de 3X da imagem original ao lado.	33
Figura 14 – Microscopia de membrana após passagem de DOT-IPEN-177 e <i>Pseudomonas paraeruginosa</i> $4,5 \times 10^7$ UFC (8000X).	34
Figura 15 – Teste de Integridade (n = 3).....	35
Figura 16 – Triplicata do microrganismo <i>Brevundimonas diminuta</i> em TSA.	36
Figura 17 – Imagem microscópica da membrana após passagem de <i>Brevundimonas diminuta</i> com ampliação de 10000X	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de filtros e características das membranas.....	15
Tabela 2 – Comparativo <i>Brevundimonas diminuta</i> X <i>Pseudomonas paraeruginosa</i> .26	
Tabela 3 – Planilha de Adsorção do DOT-IPEN-177 (n =3).....	36
Tabela 4 – pH do HCl 0,4N.	38
Tabela 5 – Quantidades de materiais utilizados na solução fria.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AC	Acetato de Celulose
API	Água Para Injetáveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CECRF	Centro de Radiofarmácia
C/NC	Conforme/Não Conforme
CG	Cromatografia Gasosa
EU	<i>European Union</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Formulário
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
HCl	Ácido Clorídrico
IN	Instrução Normativa
IT	Instrução de Trabalho
LAL	Lisado de Amebócitos de Limulus (<i>Lyophilized Amebocyte Lysate</i>)
Lu	Lutécio
MDV	Máxima Diluição Válida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NETs	Tumores Neuroendócrinos
PES	Polietersulfona
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
PG	Procedimento Gerencial
pH	potencial Hidrogeniônico
PO	Procedimento Operacional
PMV	Plano Mestre de Validação
psi	<i>Pound-Force per Square Inch</i> (libra-força por polegada quadrada)
PTFE	Politetrafluoretileno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SECQR	Serviço de Controle de Qualidade de Radiofármacos

SEGQR	Serviço de Garantia de Qualidade de Radiofármacos
SEPRF	Serviço de Produção de Radiofármacos
SOPs	Procedimentos Operacionais Padrão
SSTR2	<i>somatostatin receptor 2</i> (receptor de somatostatina tipo 2)
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> (Ágar Triptona de Soja)
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caldo Triptona Soja)
UE	Unidades de Endotoxinas
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
UFC	Unidade Formadora de Colônias
Yb	Itérbio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Radiofármaco	10
1.2	Esterilidade	12
1.3	Métodos de esterilização	12
1.3.1	Autoclavação	13
1.3.2	Irradiação	13
1.3.3	Esterilização a gás (óxido de etileno)	13
1.3.4	Filtração esterilizante	14
1.4	Membranas	14
1.4.1	Membrana de Policarbonato	15
1.4.2	Membrana do Nylon	16
1.4.3	Membrana de Acetato de celulose	16
1.4.4	Membrana de Polietersulfona (PES)	17
1.4.5	Membrana de Politetrafluoretileno (PTFE)	17
1.4.6	Membrana de Fluoreto de polivinilideno (PVDF)	18
1.5	Validação	19
1.5.1	Protocolo e relatório de validação	20
1.5.2	Validação de filtração esterilizante	20
1.5.2.1	Teste de integridade	21
1.5.2.2	Teste de compatibilidade	21
1.5.2.3	Teste de adsorção	21
1.5.2.4	Teste de extraíveis	21
1.5.2.5	Teste de lixiviáveis	21
1.5.2.6	Teste de desafio de retenção bacteriana	22
1.5.2.7	Teste de endotoxinas bacterianas	22
1.6	Microscopia	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Teste preliminar por microscopia: visualização da retenção do microrganismo na membrana filtrante	25
3.2	Desenvolvimento do Protocolo de Validação	27
3.3	Ensaio prévios à execução do Protocolo	27
3.3.1	Teste de integridade	27
3.3.2	Teste de adsorção	28
3.3.3	Teste de desafio retenção microbiológica	28
3.3.3.1	Teste de Viabilidade	29

3.3.3.2	Teste de Retenção Bacteriana da Solução simulada.	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1.	Microscopia das membranas	32
4.2	Protocolo de validação	34
4.3	Testes prévios para o protocolo	34
4.3.1	Teste de integridade	34
4.3.2	Teste de adsorção	35
4.3.3	Teste de viabilidade	36
4.3.4	Teste da solução fria	37
4.3.5	Teste de solução fria com <i>Brevundimonas diminuta</i>	39
5	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
	APÊNCICE A – PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE FILTRAÇÃO ESTERILIZANTE	46

1 INTRODUÇÃO

A validação da filtração esterilizante em radiofármacos é um procedimento essencial para garantir a segurança microbiológica e a qualidade de produtos utilizados na medicina nuclear. Este processo visa à remoção eficaz de microrganismos e contaminantes particulados, fundamentais para garantir a integridade e segurança do radiofármaco. A validação deve seguir normas rigorosas, incluindo a realização de testes de integridade de filtro, avaliações de carga microbiana e estudos de desempenho sob condições controladas. Além disso, a conformidade com diretrizes regulatórias é imprescindível para garantir a eficácia do tratamento e a segurança do paciente. A adoção de boas práticas de fabricação (BPF) e a implementação de um sistema de gestão de qualidade robusto são essenciais para minimizar riscos e assegurar a confiabilidade dos radiofármacos (Jornitz, 2006).

1.1 Radiofármaco

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) se destaca como pioneiro no Brasil na área de radiofármacos, contribuindo significativamente para o avanço da medicina nuclear no país. Desde sua fundação, a instituição dedica-se à pesquisa e desenvolvimento de tecnologias nucleares aplicadas ao diagnóstico e tratamento de doenças, com ênfase na produção de radiofármacos. A produção experimental iniciada em 1959 com o radiofármaco ¹³¹I, usado para diagnóstico e terapia de doenças da tireoide, foi fundamental para a viabilização e consolidação da medicina nuclear no país (Brito, 2024).

Os radiofármacos são definidos como preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica, que quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeo. Os medicamentos radiofármacos podem se apresentar na forma de produtos radioativos prontos para uso, eluato de geradores de radionuclídeos, componentes não radioativos para a preparação de compostos marcados com elementos radioativos e

Fonte: PubChem, 2024.

1.2 Esterilidade

A esterilidade é definida como a condição na qual um ambiente ou produto está completamente livre de todos os microrganismos viáveis, incluindo bactérias, fungos e vírus. Esta condição é fundamental em áreas críticas, da medicina, indústria farmacêutica e alimentícia, onde a segurança e a eficácia dos produtos são primordiais (RDC nº 658, 2022).

A carga microbiana, por sua vez, refere-se à quantidade total de microrganismos presentes em um determinado ambiente ou produto. A quantificação da carga microbiana é frequentemente realizada em unidades formadoras de colônias (UFC), expressando a concentração de microrganismos por mililitro ou por grama, dependendo do contexto de análise. A redução da carga microbiana é um objetivo crucial nos processos de esterilização, uma vez que minimiza o risco de contaminação e contribui para a segurança dos produtos (Cox, 2015).

A redução em log é uma métrica frequentemente utilizada no controle de qualidade para expressar a diminuição da carga microbiana. Em uma escala logarítmica, uma redução de 1 log corresponde a uma diminuição da carga em um fator de 10, enquanto uma redução de 3 logs implica uma diminuição em um fator de 1.000. Esse tipo de medida é essencial para avaliar a eficácia dos métodos de esterilização e desinfecção empregados. Para que um processo de esterilização seja considerado eficaz, a carga microbiana precisa ser reduzida em um fator de 1.000.000, o que corresponde a uma redução de 6 logs. (Pinto, 2015).

1.3 Métodos de esterilização

Os métodos de esterilização podem ser de três tipos: químicos, físico-químicos ou físicos. A eleição do método depende do tipo de artigo a ser esterilizado (MS, 2001).

1.3.1 Autoclavação

A autoclavação é um método que utiliza vapor de água sob pressão para esterilizar equipamentos e materiais. A pressão e a temperatura elevadas são eficazes na destruição de bactérias, esporos e vírus. É um dos métodos mais amplamente utilizados em hospitais e laboratórios devido à sua eficácia e rapidez. No entanto, não é adequado para materiais sensíveis ao calor ou à umidade (Hernández-Navarrete *et al.*, 2014).

1.3.2 Irradiação

A irradiação utiliza radiação ionizante, como raios gama ou feixes de elétrons, para esterilizar produtos sem aumentar a temperatura, o que permite tratar materiais sensíveis ao calor. Embora a radiação destrua microrganismos, ela não torna o material irradiado radioativo, pois a radiação ionizante não causa radioatividade permanente nos objetos. No entanto, a exposição à radiação pode levar à degradação de alguns materiais, como plásticos e alimentos, alterando suas propriedades físicas e químicas (Hasanain *et al.*, 2014).

1.3.3 Esterilização a gás (óxido de etileno)

A esterilização com óxido de etileno é um processo altamente eficaz para materiais sensíveis ao calor e à umidade, como dispositivos médicos e plásticos. A infraestrutura necessária para esse tipo de esterilização inclui uma câmara hermeticamente fechada, onde os produtos são expostos ao gás óxido de etileno em concentrações controladas, com ciclos específicos de tempo, temperatura e umidade ajustados para garantir a eficácia sem danificar os materiais. Após a exposição ao gás, é essencial que o ambiente seja adequadamente ventilado para remover qualquer resíduo de óxido de etileno, que é tóxico e inflamável. Para isso, utilizam-se ventilação forçada e sistemas de absorção química, como filtros de carvão ativado, garantindo que os produtos estejam livres de resíduos de gás antes de serem liberados. Além disso, são implementadas medidas de segurança rigorosas, como

sensores de gás e monitoramento contínuo, para evitar vazamentos e garantir que os níveis de exposição estejam dentro dos limites seguros (Shintani, 2017).

1.3.4 Filtração esterilizante

A filtração esterilizante é uma importante etapa do processamento asséptico de medicamentos e produtos injetáveis. A associação internacional de fabricantes farmacêuticos e biofarmacêuticos PDA (*Parenteral Drug Association*) publicou em 1997 um relatório técnico com recomendações para as boas práticas para filtração de líquidos e de validação da filtração esterilizante, “*Sterilizing Filtration of Liquids*” - PDA *Technical Report* No. 26 de 1997, tendo sua revisão sido realizada em 2008. Este relatório técnico destacou o histórico do uso da filtração esterilizante, explicou como os filtros funcionam, detalhou os critérios de seleção, o método de teste de integridade do filtro e fez considerações sobre como conduzir a validação (PDA *Technical Report* No. 26, 2008).

A filtração esterilizante é o método preferencial para a esterilização de radiofármacos, pois garante a esterilidade de produtos que não podem ser submetidos à autoclavação, devido à degradação das moléculas (IAEA, 2018). A autoclavação não pode ser utilizada na molécula de DOTATATO com a estrutura do peptídeo devido à sua alta sensibilidade a temperaturas acima de 121°C, que é a temperatura padrão utilizada na autoclavação, e umidade, que podem resultar na degradação química do composto, podendo sofrer hidrólise e fragmentação de sua estrutura molecular, levando à formação de subprodutos indesejados e à perda de eficácia terapêutica (Sawle, 2011).

1.4 Membranas

As membranas dos filtros consistem em uma matriz de poros mantidos em uma relação espacial fixa. A filtração é uma técnica de separação utilizada para a remoção de partículas e outras substâncias (Haider, 2006). Existem no mercado vários filtros com membranas de diversos materiais (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos de filtros e características das membranas

Fabricantes	Materiais	Diâmetro (mm)	Tamanho do poro (µm)
Nuclepore	Policarbonato	13, 19, 25, 47	0,015 a 0,8
Futecs	Nylon, AC ¹ , PES ² , PVDF ³ e PTFE ⁴ .	13, 25, 30	0,22 / 0,45
Sartorius	PES/ AC	28	0,22 / 0,45
Pall	PVDF	-	0,2
Millex		4, 13, 25, 33, 50	0,22 / 0,45
Whatman		-	0,22 / 0,45

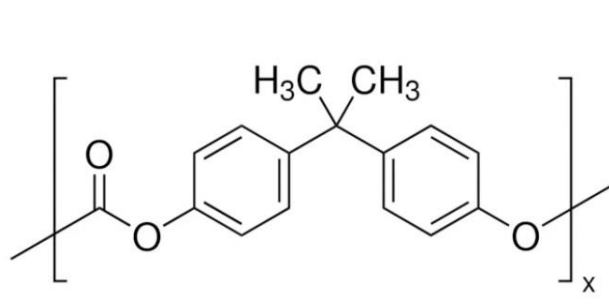
¹AC: Acetato de celulose; ²PES: polietersulfona; ³PVDF: fluoreto de polivinilideno; ⁴PTFE: politetrafluoretileno colocar ref de sites das membranas

Fonte: Autor.

1.4.1 Membrana de Policarbonato

As membranas de policarbonato (Figura 2) são fabricadas a partir de um polímero transparente e são amplamente empregadas em aplicações de filtração microbiológica. Caracterizam-se por apresentarem poros uniformes, sendo eficazes na retenção de microrganismos, como bactérias, e partículas de maior dimensão. A utilização dessas membranas é frequente na microbiologia, especialmente na filtração de amostras de água, ar e soluções biológicas. O policarbonato possui estabilidade térmica e sofre pouca decomposição abaixo de 250°C (Davis, 1969).

Figura 2 – Fórmula molecular do Policarbonato

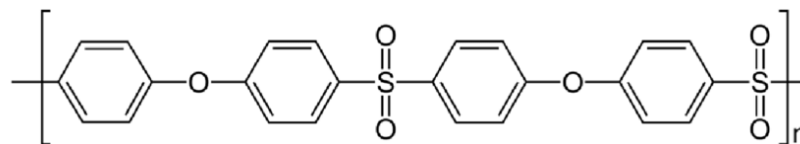


Fonte: <https://pt.alfa-chemical.com/uploads/202235855/cas-25037-45-0-polycarbonate13113424884.jpg>

1.4.4 Membrana de Polietersulfona (PES)

As membranas de polietersulfona são reconhecidas por sua elevada resistência térmica e química. Demonstram eficácia na filtração de líquidos e gases, sendo frequentemente aplicadas em contextos farmacêuticos e biotecnológicos. A PES apresenta uma estrutura porosa que favorece a filtração eficiente, além de manter boa estabilidade em uma ampla faixa de pH (Figura 5). Essa combinação de características torna a PES uma escolha popular para processos que exigem rigor e confiabilidade (Carvalho *et al.*, 2017).

Figura 5 – Fórmula molecular da Polietersulfona (PES)

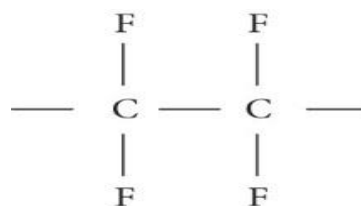


Fonte: Abdul-Majeed *et al.*, 2022

1.4.5 Membrana de Politetrafluoretileno (PTFE)

As membranas de politetrafluoretileno são notáveis por sua extrema resistência a produtos químicos e altas temperaturas (Figura 6). Apresentam características hidrofóbicas, tornando-as adequadas para a filtração de gases e a separação de líquidos em que a umidade não é desejada. Devido à sua resistência a uma ampla gama de solventes, essas membranas são frequentemente empregadas em aplicações exigentes, particularmente nas indústrias química e farmacêutica (Dhanumalayan, 2018).

Figura 6 – Fórmula molecular do Politetrafluoretileno (PTFE)

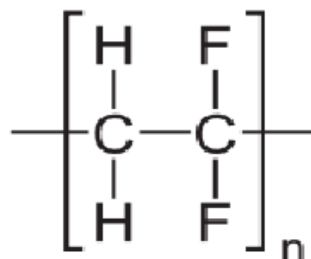


Fonte: Gubanski *et al.*, 2019.

1.4.6 Membrana de Fluoreto de polivinilideno (PVDF)

Algumas membranas comerciais foram amplamente desenvolvidas para serem utilizadas em filtração esterilizante para várias aplicações biológicas, médicas e industriais, incluindo, a utilização na produção de radiofármacos (SPLABOR, 2024). As membranas de PVDF são altamente estáveis e oferecem resistência química superior, sendo frequentemente utilizadas na filtração de líquidos agressivos (Figura 7). Elas apresentam excelente desempenho em aplicações de purificação e desinfecção, além de serem resistentes à umidade e capazes de operar em temperaturas elevadas. Essas propriedades fazem do PVDF um material ideal para uma variedade de processos industriais e laboratoriais (Siddique *et al.*, 2024).

Figura 7 – Fórmula molecular do Fluoreto de Polivinilideno (PVDF)



Fonte: Husain *et al.*, 2023.

O PVDF (polifluoreto de vinilideno) é uma membrana de características hidrofílicas, excelente para filtração de amostras à base de proteínas devido à ampla compatibilidade química, resistência química e estabilidade térmica (Cao *et al.*, 2006 e Merck Millipore, 2020).

Filtros esterilizantes de 0,22 µm são capazes de reter microrganismos, partículas e pós não solúveis de partículas maiores que o poro da membrana das soluções aquosas ou água. Os filtros devem remover a maior parte das bactérias e fungos e ser compatível com o processo, não tóxico, testável quanto à integridade, esterilizável, que não absorva os componentes da

fórmula nem adicione extraíveis ao processo e possa remover a carga biológica associada ao produto (Cao *et al.*, 2006). A figura 8 apresenta a membrana Millipore GV que foi utilizada neste trabalho.

Figura 8 – Filtro *Millex® Millipore GV* (de 33 mm de diâmetro com membrana PVDF *Durapore®* de 0,22 µm, número de catálogo: SLGVR33RS)



Fonte: Merck Millipore, 2020.

1.5 Validação

Validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. As atividades a serem realizadas em uma validação são descritas no protocolo de validação, incluindo-se as responsabilidades, os parâmetros a serem avaliados, os critérios de aceitação do método analítico, entre outros (Anvisa RDC n° 658/2022; Anvisa IN n° 128/2022; Anvisa IN n° 138/2022; Anvisa IN n° 35/2019; Anvisa RDC n° 166/2017).

O Plano Mestre de Validação (PMV) define as políticas, diretrizes e estratégias das atividades de qualificação e validação a serem realizadas, que assegura as validações sejam realizadas de forma eficiente, consistente e atendendo aos requisitos regulatórios exigidos pela ANVISA na legislação vigente no país, dentre elas, a RDC n° 166/2017, RDC n° 658/2022, IN n° 128/2022 e IN n° 138/2022.

O PMV identifica os equipamentos, processos e métodos de análise a serem utilizados, descrevendo detalhadamente as abordagens aplicadas durante a execução. Ele também orienta sobre como planejar, implementar e concluir

os diferentes processos de validação. Além disso, fornece informações sobre os conceitos de validação, organiza a documentação necessária e elabora um protocolo, que culmina em um relatório final (ANVISA, RDC 166/2017).

1.5.1 Protocolo e relatório de validação

O protocolo de validação é um documento que apresenta a descrição do processo, definição de responsabilidades, descrição de equipamentos utilizados, o tipo de validação a ser executada, treinamentos necessários para a realização, descrição dos métodos utilizados, pontos críticos, dentre outros. Por fim, a avaliação dos resultados inclui a análise estatística. Qualquer desvio do protocolo de validação precisa ser documentado, investigado e justificado (ANVISA, RDC 166/2017).

O relatório de validação deve conter os resultados da validação de forma compilada, com os critérios de aceitação, os cálculos obtidos com a validação analítica, assim como avaliação dos dados e o tratamento estatístico. Os dados brutos necessários para compor o relatório de validação e outros dados brutos devem estar disponíveis para possíveis inspeções (ANVISA, RDC 166/2017).

1.5.2 Validação de filtração esterilizante

A validação do processo de filtração esterilizante é um procedimento crítico para assegurar a eficácia da esterilização do produto sob condições reais de operação, incluindo variáveis como temperatura, pressão, tempo de filtração e a flora microbiana presente. É essencial garantir que o filtro não induza alterações adversas na composição do produto, como a adsorção ou liberação de substâncias indesejadas, e que o próprio produto não comprometa a eficiência do filtro (PDA TR nº 26/2008).

Para efetivar a validação do processo de filtração esterilizante, são necessários os seguintes testes: verificação da integridade do filtro utilizando água ou solventes apropriados, avaliação da integridade do filtro em contato direto com o produto, análise da compatibilidade entre o filtro e o produto,

investigação da adsorção de componentes do produto, avaliação de substâncias extraíveis e lixiviáveis, além de testes de retenção microbiológica e de ausência de endotoxinas bacterianas (PDA TR nº 26/2008).

1.5.2.1 Teste de integridade

O teste de integridade de um filtro esterilizante é um teste não destrutivo que serve de controle de processo para assegurar que o sistema de filtração não apresente qualquer irregularidade que possa comprometer o processo de filtração (PDA TR nº 26/2008).

1.5.2.2 Teste de compatibilidade

A compatibilidade química do dispositivo de filtro deve ser avaliada para evitar possíveis danos ou alterações no filtro e para evitar a contaminação do produto (PDA TR nº 26/2008).

1.5.2.3 Teste de adsorção

A adsorção é um processo pelo qual o produto se liga à superfície da membrana, o que pode impactar sua composição e concentração. O teste de adsorção é um ensaio utilizado para avaliar a retenção do produto no filtro, permitindo quantificar a perda durante esse processo (PDA nº 26/2008).

1.5.2.4 Teste de extraíveis

Extraíveis são produtos químicos que são removidos de um material de processamento pela aplicação de uma força exagerada, como solventes, temperatura ou tempo prolongado (Reifsnyder, 2011).

1.5.2.5 Teste de lixiviáveis

Lixiviáveis são componentes químicos que migram de uma superfície de contato para o produto farmacêutico ou fluxo de processos durante o uso ou armazenamento normal (Reifsnyder, 2011). Potenciais lixiviáveis devem ser identificados pelo usuário do filtro e avaliados para garantir que não comprometam o produto a ser filtrado (PDA TR nº 26/ 2008).

1.5.2.6 Teste de desafio de retenção bacteriana

Os testes de desafio bacteriano validam a classificação da membrana do filtro e demonstram a remoção microbiana de produtos, usando um microrganismo de desafio representativo. Durante a validação da filtração esterilizante, o filtro de grau esterilizante foi definido como um filtro que reterá 10^7 UFC (unidade formadora de colônia) de *Brevundimonas diminuta* (*B. diminuta*) ATCC 19146 por cm^2 de área de superfície efetiva do filtro sob condições de processo, produzindo um efluente estéril (PDA TR nº 26/2008).

1.5.2.7 Teste de endotoxinas bacterianas

A detecção de endotoxinas bacterianas (pirogênio) é de vital importância aos pacientes, pois agentes de origem exógena ou endógena podem causar elevação de temperatura corporal. É de extrema importância a ausência de endotoxinas bacterianas no produto, como parte da validação. O método Gel-Clot consiste em determinar o aparecimento de um gel e a gelificação ocorre pela coagulação das proteínas na presença de endotoxinas. O limite de detecção dos ensaios depende de fabricante do reagente LAL (Lisado de amebócitos de *Limulus*) (Fukumori, 2008). É importante destacar que a detecção de endotoxinas bacterianas deve ser realizada ao longo do processo produtivo, e não no teste de retenção bacteriana, que tem como objetivo avaliar a capacidade do filtro em reter microrganismos (PDA TR nº 26/2008).

1.6 Microscopia

A microscopia é uma ferramenta fundamental na investigação científica, permitindo a visualização de estruturas em escala microscópica. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica em que um feixe de elétrons incide sobre a superfície de uma amostra, interage com os átomos gerando elétrons secundários, que são então coletados para formar imagens tridimensionais de alta resolução (Maliska, 2024). Uma limitação do uso da MEV em alguns materiais, especialmente em amostras não condutoras (como plásticos, tecidos ou materiais biológicos), é que elas

podem carregar-se eletricamente durante a análise, comprometendo a qualidade da imagem. Para resolver esse problema, é comum recobrir a amostra com uma fina camada de ouro ou outro metal condutor, como carbono ou platina (Maliska, 2024). O recobrimento com ouro é feito por técnicas como evaporação a vácuo ou *sputtering* (pulverização catódica). Nesse processo, o ouro é vaporizado ou bombardeado sobre a amostra, criando uma fina camada metálica sobre a superfície para melhorar a condutividade elétrica das amostras, uma vez que muitos materiais, tanto biológicos quanto não biológicos, não são condutores elétricos. Essa melhoria na condutividade previne o acúmulo de carga elétrica que pode distorcer as imagens, evitando a formação de artefatos e permitindo uma melhor resolução e clareza (Dedavid, 2007).

A microscopia pode ser utilizada para analisar a eficiência dos filtros esterilizantes e garantir que o processo de filtração esteja removendo adequadamente os contaminantes (PDA TR nº 26/2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de microscopia, a viabilidade de diferentes microrganismos e a integridade das membranas filtrantes, além de elaborar o Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante para o DOT-IPEN-177.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar testes preliminares por microscopia eletrônica de varredura da membrana do filtro e de microrganismos.
- Definir os parâmetros necessários para a validação e seus critérios de aceitação;
- Realizar testes de viabilidade, quantificação e de filtração da cepa *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146 no filtro com membrana PVDF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Teste preliminar por microscopia: visualização da retenção do microrganismo na membrana filtrante

Esperou-se o decaimento da atividade residual do Lu-177, que possui meia-vida física de 6,71 dias, em filtros utilizados na filtração esterilizante de DOT-IPEN-177, para proceder à microscopia.

Para a realização da microscopia da membrana do filtro esterilizante, foi necessário remover o invólucro de acrílico modificado da membrana, um processo realizado mecanicamente com cautela com o uso de uma esmerilhadeira, a fim de evitar danos físicos à membrana.

Utilizou-se a bactéria *Pseudomonas paraeruginosa* durante a fase de espera da aquisição do microrganismo *Brevundimonas diminuta*, pois seus tamanhos são semelhantes (Tabela 2).

O crescimento da *Pseudomonas paraeruginosa* foi realizado por incubação do microrganismo de em forma de *bioball*, da marca biomérieux, em placa de *Tryptic Soy Agar* (Ágar Triptona de Soja). Com uma alça bacteriológica, foi retirada uma colônia e transferida para um frasco de 10 mL de NaCl 0,9%. Em seguida, foi realizada análise visual por turbidimetria (0,5 de *McFarland* = 10^8 células/mL) para verificar a faixa de concentração ideal para a validação da filtração esterilizante.

Tabela 2 – Características da *Brevundimonas diminuta* X *Pseudomonas paraeruginosa*

Microrganismos		
Característica	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Forma	Bastonetes (cilíndricos)	Bastonetes (cilíndricos)
Gram	Gram-negativa	Gram-negativa
Dimensão	0,5–0,7 µm de largura, 1,2–2,0 µm de comprimento	0,5–0,8 µm de largura, 1,5–3,0 µm de comprimento

Fonte: Adaptado de SEGERS (1994) e NCTC (2007).

Foi filtrado o volume igual ao utilizado em produção do DOT-IPEN-177 como comparativo, volume esse de 5 mL; filtração realizada através de uma seringa e o processo manual dentro de um fluxo laminar. Após a filtração, de $4,5 \times 10^7$ UFC de suspensão de *Pseudomonas paraeruginosa* pelo filtro o microrganismo foi fixado com etanol PA e as membranas foram secas em temperatura ambiente por 60 minutos. Após a secagem foi feita a abertura da parte acrílica do filtro e enviado para análise microscópica.

Utilizou-se equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo modelo SEM-FEG JSM-6701F da marca Jeol (Figura 9).

Figura 9 – Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol.



Fonte: Foto obtida pelo autor

Foram obtidas imagens MEV na escala de aumento de 5000X e 8000X de membrana não utilizada em filtração, após a filtração do radiofármaco DOT-IPEN-177, após a filtração de $4,5 \times 10^7$ UFC de suspensão de *Pseudomonas paraeruginosa* NCTC 12924 (BioBall, marca: bioMérieux) e após filtração de DOT-IPEN-177, decaimento da radioatividade e passagem da *Pseudomonas paraeruginosa* no mesmo filtro.

3.2 Desenvolvimento do Protocolo de Validação

O desenvolvimento do protocolo foi baseado em uma revisão bibliográfica, na qual se destacou o Guia de Filtração Esterilizante: *Sterilizing Filtration of Liquids* da Parenteral Drug Association (PDA) e a tese de doutorado intitulada "*Validation of bacterial retention by membrane filtration: a proposed approach for determining sterility assurance*" (de 1983), servindo como referência para a definição dos testes de validação. O protocolo foi elaborado segundo a formatação padronizada de protocolos do Centro de Radiofarmácia (CECRF) do IPEN.

3.3 Ensaios prévios à execução do Protocolo

Foram realizados ensaios prévios para avaliação dos parâmetros do protocolo para prospecção da validação da filtração esterilizante. A execução do protocolo não foi possível devido ao atraso na aquisição do microrganismo *Brevundimonas diminuta*.

3.3.1 Teste de integridade

Os materiais empregados neste teste são: Instrumento de teste de integridade de filtro, Pall (Figura 10). Glove Box; Manômetro. Filtro Esterilizante, Merck; Água para Injetáveis (API), Isopharma.

Figura 10 – Equipamento de Teste de Integridade Palltronic



Fonte: Pall, 2024

Neste teste foram relacionados alguns resultados do teste de integridade de membrana (teste de bolha) de lotes de produção de DOT-IPEN-177 no ano de 2024. O teste de integridade consiste em molhar a membrana com líquido adequado e aplicar uma pressão de gás suficiente para expulsar o líquido dos poros da membrana. Ao atingir esta pressão, o gás que está pressurizando a membrana molhada consegue atravessá-la, podem ser visualizadas bolhas na saída do filtrado, o equipamento faz o registro da pressão e gera um relatório com gráfico (Pall, 2024).

3.3.2 Teste de adsorção

Os materiais empregados neste teste foram: Filtro esterilizante SLGVR33RS, Merck; DOT-IPEN-177, IPEN. Calibrador de Dose (Curiômetro), Capintec; Água para Injetáveis (API), Isopharma.

Foi realizado um estudo para analisar os procedimentos relacionados aos testes de adsorção sob a perspectiva da radiação. O objetivo foi determinar a quantidade de radiação retida, por meio de medições realizadas antes e após a filtração do produto DOT-IPEN-177 (n = 3).

3.3.3 Teste de desafio retenção microbiológica

Os materiais empregados neste teste foram:

- Filtro esterilizante, Merck;

- Cepa *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146) Custom Made 10^8 UFC, Microbiologics;
- Solução Tampão fosfato pH 7,2 (código de produto: PL 8056), Plastlabor
- Cepa *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146) < 100 UFC One Step, Microbiologics.
- Fluido Hidratante, Microbiologics;
- TSA, Plastlabor;
- TSB, Plastlabor;
- Alça Bacteriológica, Cralplast;
- Alça Drigalski, Cralplast;
- Agitador Shaker, Solab;
- Agitador Vortex, IKA;
- Fluxo Laminar, Pachane;
- Estufa $32 \pm 2^\circ\text{C}$, Lobov/Panasonic;
- Estufa $34 \pm 2^\circ\text{C}$, Sanyo
- Kit Gram, Sigma;
- Microscópio Óptico, Belphotonics;
- Óleo de Imersão, Sigma;
- Ponteiras 250 e 1250 μL , Vistalab;
- Micropipeta 200 μL e 1000 μL , Eppendorf.
- Álcool Isopropílico 70%, Anios;
- Luvas cirúrgicas, Descarpack;
- Óleo Mineral Esterilizado, Needs.
- Água para Injetáveis, Isopharma.

Foi realizado o teste de viabilidade da cepa Custom Made, teste esterilização da solução fria após a passagem do filtro em estudo e o teste de esterilização da solução desafiada com a concentração superior a 10^7 UFC/mL do microrganismo *Brevundimonas diminuta* indicada para validação.

3.3.3.1 Teste de Viabilidade

O teste de viabilidade foi realizado com a Cepa *Custom Made* da bactéria

Brevundimonas diminuta em meio de ágar tripticaseína soja (TSA) segundo a instrução do fabricante. O frasco de 9 mL de fluido de hidratação composto por solução tampão pH 7,2, adquirido pronto para uso da Plastlabor, foi aquecido em temperatura entre 34 e 38 °C. O frasco contendo os pellets liofilizados foi retirado do armazenamento refrigerado e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, um pellet foi transferido para o fluido de hidratação utilizando uma pinça estéril. O frasco contendo a suspensão do microrganismo foi incubado em temperatura de 34 a 38 °C por 30 minutos para garantir a completa hidratação. Após essa etapa, o material foi agitado até a homogeneização completa. Uma alíquota da solução foi anexada em lâmina e realizada o teste de Gram e microscopia óptica.

Uma alíquota (100 µL) do microrganismo foi transferido para um frasco de 10 mL contendo solução salina a 0,9% (NaCl), seguida de agitação para promover a homogeneização. Em seguida, 5 mL da suspensão contendo *Brevundimonas diminuta* foram filtrados através de um filtro esterilizante. Após essa etapa, foi adicionado 1 mL de etanol PA com o objetivo de fixação. As membranas filtrantes foram então secas à temperatura ambiente por 60 minutos. Após o processo de secagem, a parte acrílica do filtro foi cuidadosamente removida e o conjunto foi encaminhado para análise microscópica.

Alíquotas com 100 µL de suspensão foram pipetadas, em triplicata, em placas de TSA e incubadas em estufa em temperatura de 34 °C a 38 °C por um período de 36 a 48 horas. O crescimento microbiano foi monitorado diariamente e após 48 horas foram registradas as imagens das placas.

3.3.3.2 Teste de Retenção Bacteriana da Solução simulada.

Os testes foram realizados utilizando uma solução contendo apenas os excipientes. Esta solução foi composta por uma solução salina (NaCl 0,9%), tampão com ácido genticônico e DTPA, excluindo-se a solução de cloreto de Lu-177 e o radiofármaco. 3 mL da solução de HCl 0,4 M foi utilizada para

ajustar o pH da solução para as condições de acidez da matéria-prima utilizada na produção do radiofármaco (IT-CR-P03.24.01: Produção DOT-IPEN-177: Marcação e Envase). O pH da solução final após a adição de 1, 2 e 3 mL de HCl 0,4 M à solução preparada.

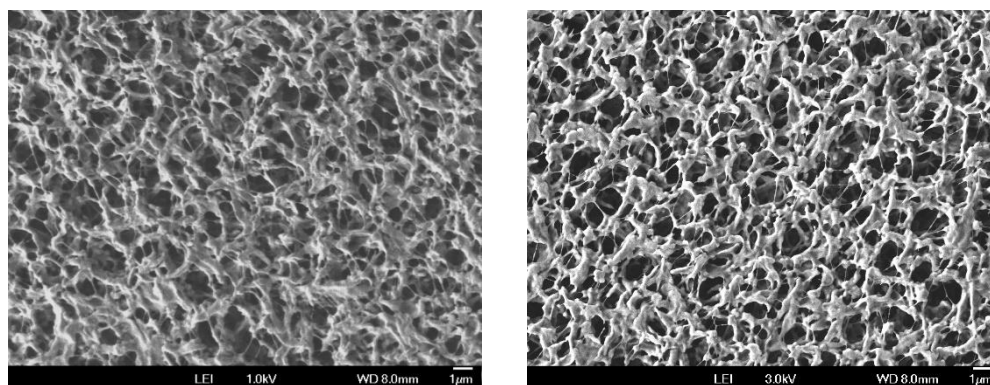
Antes da adição do HCl 0,4 M à solução simulada, foi realizado um teste de pH para garantir que, ao combinar os componentes, o valor se mantivesse dentro dos parâmetros estabelecidos para o produto. Para a produção de DOT-IPEN-177, utilizou-se até 3 mL de cloreto de lutécio, e o pH foi analisado em concentrações de 1, 2 e 3 mL de HCl para fins de referência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microscopia das membranas

O conhecimento visual da membrana forneceu uma maneira adicional de confirmar o tamanho dos poros de até 0,22 μm . Na Figura 11, as imagens foram obtidas com ampliações de 5000X e confirmam a integridade da superfície e o tamanho dos poros conforme especificado, além da adequação para uso em filtração esterilizante.

Figura 11 – Microscopia da membrana (a) e seu verso (b) antes da filtração do DOT-IPEN-177



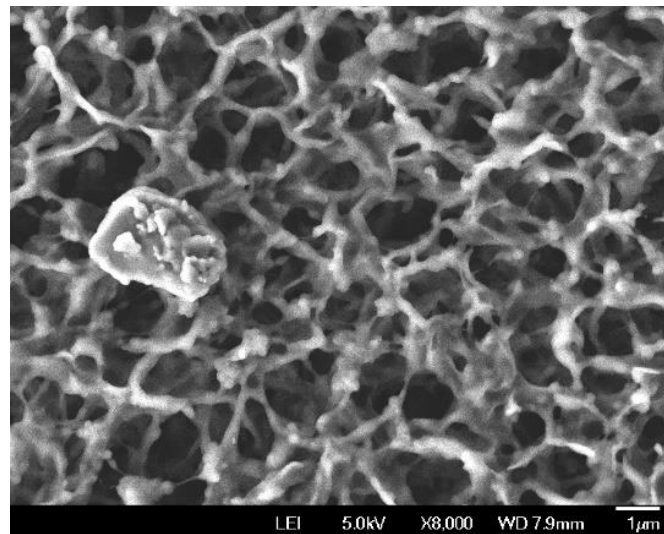
a (5000X)

b (5000X)

Fonte: Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (LMM/CCTM – IPEN).

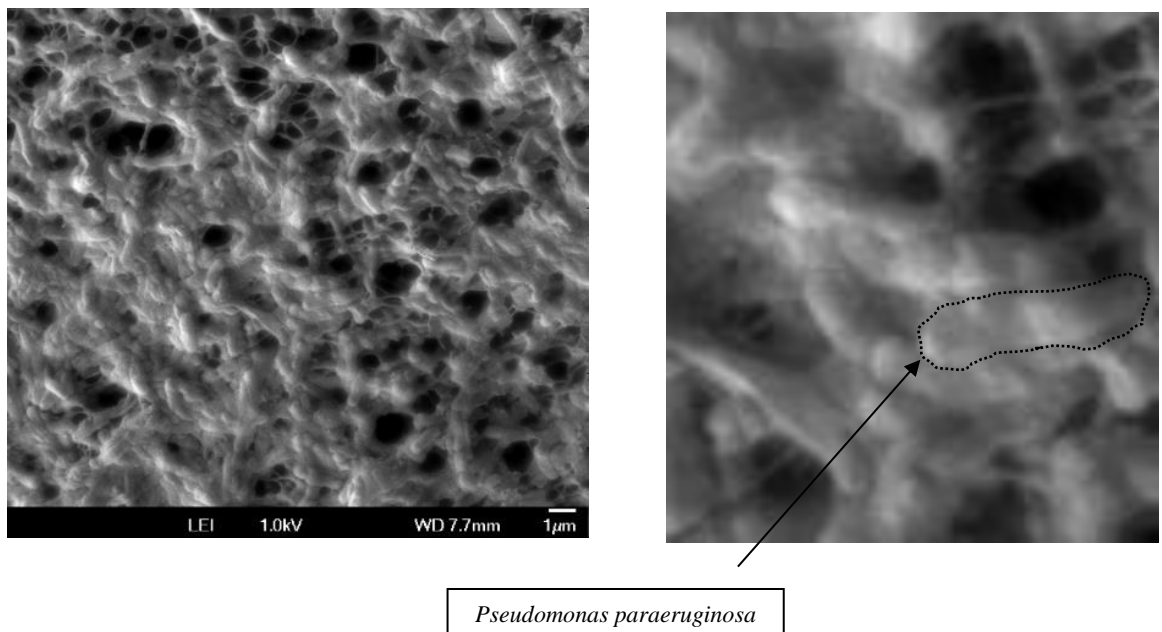
Após filtração com DOT-IPEN-177, foi observada deposição de algum material na membrana na Figura 12. Na Figura 13, após a passagem da *Pseudomonas paraeruginosa*, a superfície da membrana indicou retenção do microrganismo de tamanho semelhante ao *Brevundimonas diminuta*. Na Figura 14 observa-se deposição do material e do microrganismo.

Figura 12 – Microscopia da membrana após filtração do DOT-IPEN-177 (8000X).



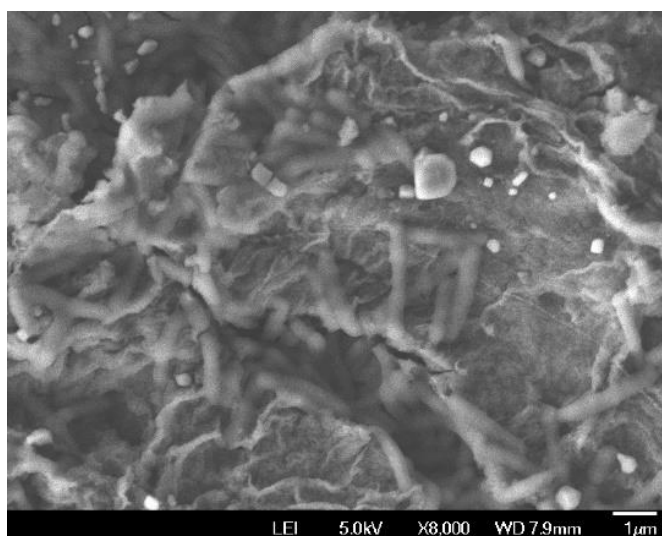
Fonte: Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (LMM/CCTM – IPEN).

Figura 13 – Imagem microscópica da membrana após passagem de *Pseudomonas paraeruginosa* com ampliação de 5000X e um zoom de 3X da imagem original ao lado.



Fonte: Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (LMM/CCTM – IPEN).

Figura 14 – Microscopia da membrana após passagem de DOT-IPEN-177 e *Pseudomonas paraeruginosa* $4,5 \times 10^7$ UFC (8000X).



Fonte: Laboratório de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (LMM/CCTM – IPEN).

4.2 Protocolo de validação

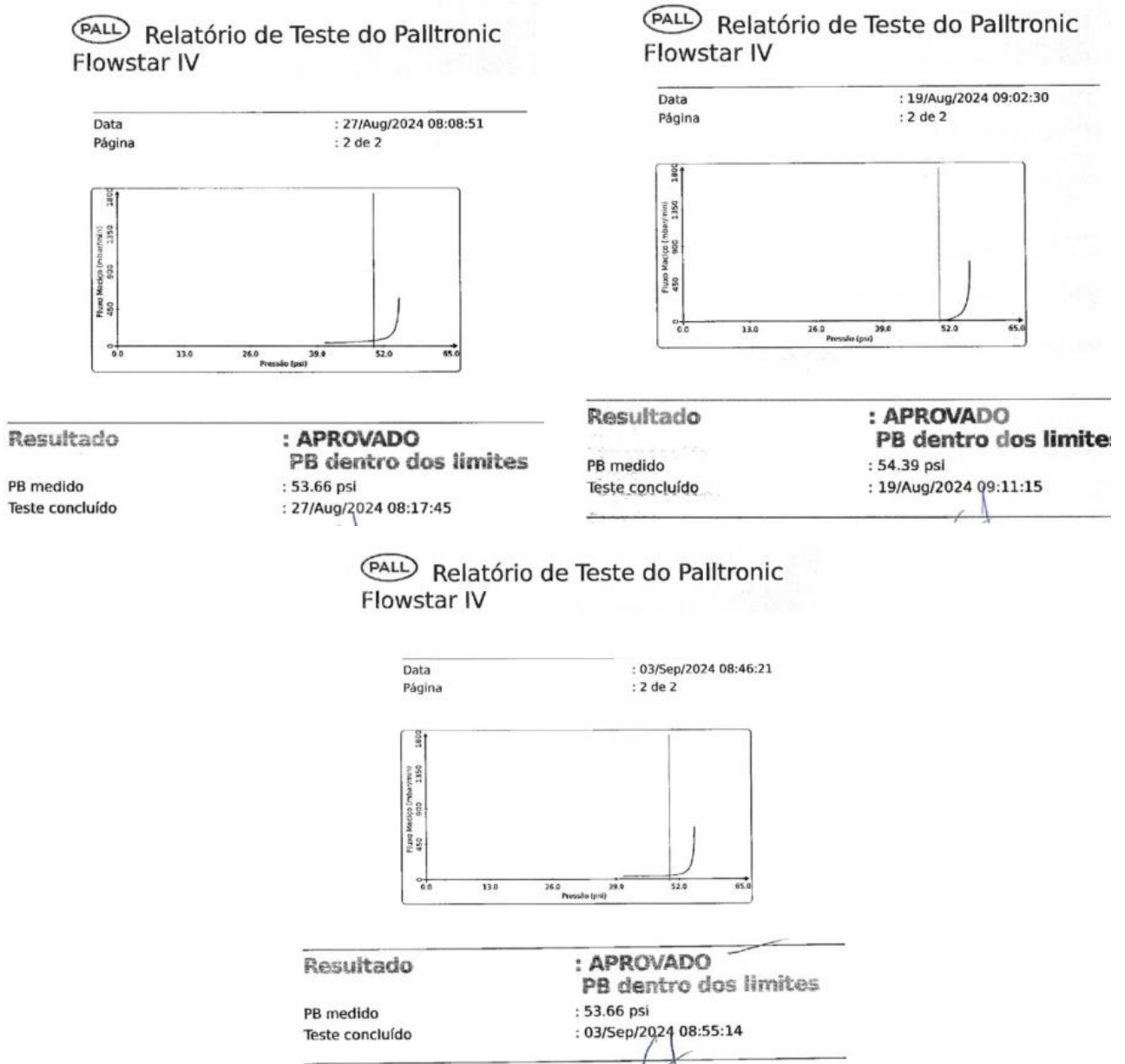
O protocolo de validação da filtração esterilizante está incluído como Apêndice 1 deste documento.

4.3 Testes prévios para o protocolo

4.3.1 Teste de integridade

Foram analisados lotes de DOT-IPEN-177 (Figura 15), com foco na avaliação do teste de integridade. Os testes de bolha foram realizados de acordo com as especificações do fabricante do equipamento, com a umidificação prévia do filtro com água para injetáveis, e os resultados foram aprovados por estarem acima do limite de 50 *psi*.

Figura 15 – Teste de Integridade, n =3.



Fonte: Lote 1 (superior esquerdo), 2 (superior direito) e 3 (inferior), 2024.

4.3.2 Teste de adsorção

Dados foram coletados de 3 lotes produzidos de 2024. Com base nas informações, foi desenvolvido um parâmetro a ser seguido na execução do protocolo de validação (Tabela 3).

Tabela 3 – Planilha de Adsorção do DOT-IPEN-177 (n =3)

Adsorção DOT-IPEN-177			
Lote	Atividade do filtrado (mCi)	Atividade retida no filtro (mCi)	Atividade do filtrado/ atividade retida no filtro (%)
1	2.939,00	4,93	0,17%
2	2.630,00	3,69	0,14%
3	2.089,79	2,90	0,14%

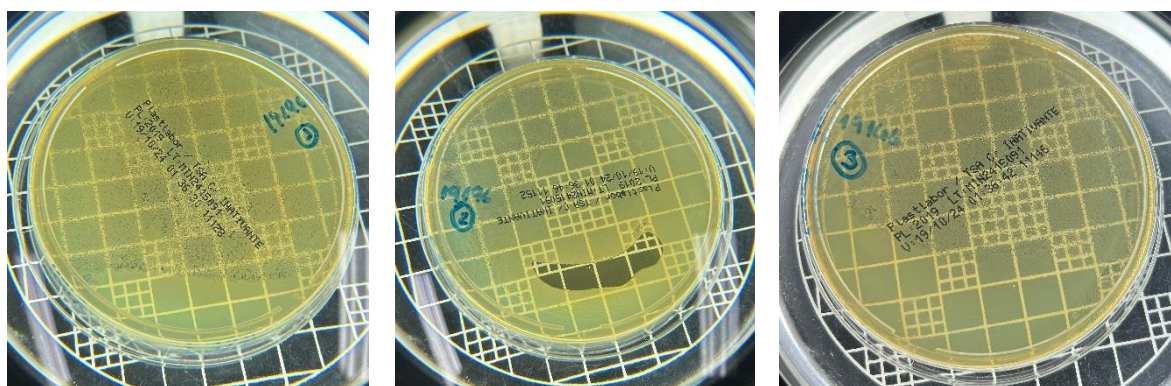
Fonte: autor

O parâmetro registrado em forma de planilha mostra a relação entre a contabilização da atividade radioativa filtrada e atividade retida no filtro que resulta em um valor percentual baixo não afetando a distribuição do produto para o paciente.

4.3.3 Teste de viabilidade

O resultado do teste de Gram do microrganismo *Brevundimonas diminuta* diminuta comprovou por forma de coloração que o microrganismo é Gram negativo. O teste de viabilidade foi aprovado, mostrando crescimento do microrganismo em triplicata em placa de TSA (Figura 16).

Figura 16 – Triplicata do microrganismo *Brevundimonas diminuta* em TSA

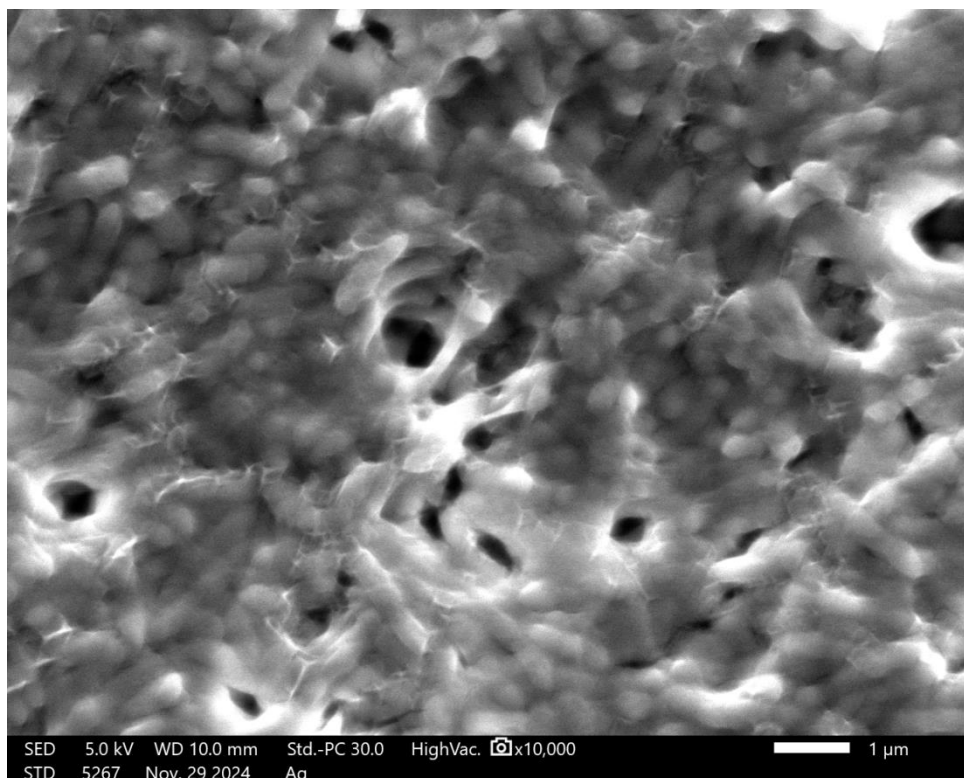


Fonte: autor.

A análise microscópica do microrganismo *Brevundimonas diminuta* (Figura 17) revelou o acúmulo de bactérias sobre o filtro. A alta concentração de

microrganismos observada ($< 10^8$ UFC/cm²) corresponde às especificações para esse microrganismo, confirmando seu formato e características morfológicas típicas.

Figura 17 – Imagem microscópica da membrana após passagem de *Brevundimonas diminuta* com ampliação de 10000X.



Fonte: Centro de Análises – IPEN, 2024.

4.3.4 Teste da solução fria

Como descrito na metodologia, devido à natureza radioativa do produto, os testes foram realizados utilizando uma solução fria para evitar contaminações. A substituição do cloreto de lutécio 177 se deu pela troca por ácido clorídrico 0,4 N, e antes da adição do HCl à solução fria, foi realizado um teste de pH para garantir que, ao combinar os componentes, o valor se mantivesse dentro dos parâmetros estabelecidos para o produto. Para a produção de DOT-IPEN-177, utiliza-se até 3 mL de cloreto de lutécio, e o pH foi analisado em concentrações de 1, 2 e 3 mL de HCl para fins de referência.

O resultado mostrou nos 3 volumes que o pH medido era entre 1,0 e 2,0 (Tabela 4).

Tabela 4 – pH do HCl 0,4N.

Simulação pH com HCl 0,4N	
Quantidade (mL)	pH medido
1 mL	2,0
2 mL	2,0
3 mL	1,0

Fonte: autor

Na solução fria foi utilizado então 3 mL de HCl, simulando o cloreto de lutécio, e, ao ser adicionada, manteve o pH dentro dos limites estabelecidos para o controle do produto radioativo. A quantidade máxima de cada insumo foi utilizada para analisar as condições limites do produto a ser esterilizado em um filtro (Tabela 5). Após a passagem dessa solução fria, uma alíquota foi incubada em placa de TSA para verificar a esterilidade do teste, o que foi confirmado pelo resultado negativo de crescimento microbiológico após o período de análise.

Tabela 5 – Quantidades de materiais utilizados na solução fria

Solução Fria		
Soluções	Valores	pH final da Solução
HCl *	3,0 mL	entre 4,0 e 5,0
DTPA 0,4 % em álcool benzílico	1,0 mL	
Solução tampão	8,0 mL	
NaCl 0,9% (salina)	8,0 mL	
Total (mL)	20,0 mL	

* utilizado como parâmetro para o cloreto de lutécio 177.

Fonte: autor

4.3.5 Teste de solução fria com *Brevundimonas diminuta*

Para o desafio microbiológico com a solução fria foram utilizados os mesmos valores listados na Tabela 5, com a adição de uma concentração de $4,52 \times 10^7$ UFC/mL de *Brevundimonas diminuta*. Após a passagem da solução pelo filtro esterilizante, foram retiradas alíquotas que foram pipetadas em placas de TSA, utilizando o método em triplicata. Os resultados obtidos após o período de incubação indicaram a ausência de crescimento microbiológico, corroborando a eficácia do processo de esterilização.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo investigar as etapas da execução do protocolo de validação de filtração esterilizante.

Durante a revisão da literatura, examinamos os requisitos regulatórios pertinentes, incluindo as diretrizes do PDA (TR número 26, 2008) e ANVISA (RDC 658, 2022), que estabelecem as expectativas para a validação de processos de filtração esterilizante e identificamos a complexidade e a importância da validação da filtração esterilizante na indústria farmacêutica.

Na abordagem da validação, na elaboração do protocolo foram considerados os parâmetros de integridade do filtro, e retenção microbiana para serem avaliados. Destaca-se que o filtro Millex GV 0,22 mm PVDF resultou em produto estéril em produto simulado.

Imagens de microscopia SEM-FEG após a passagem da solução radiofarmacêutica, da suspensão de *Pseudomonas paraeruginosa* e da suspensão de *Brevundimonas diminuta* pelas membranas de PVDF 0,22 µm indicaram que a filtração esterilizante do radiofármaco DOT-IPEN-177 é eficaz e os resultados deste estudo preliminar serão úteis para a validação de filtração esterilizante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MAJEED, M. et al. Effect of adding Arabic Gum and Zinc Oxide Nanoparticles to MBR Membranes Supported by Carbon Nanotubes for Ultrafiltration Process of Dairy Wastewater. **Pollution**, v. 8, n. 4, p. 1233–1249, 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°166, de 24 de JULHO de 2017**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 25 ago. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa - IN n°35, de 21 de agosto de 2019**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/IN_35_2019_COMP.pdf/bf4ab3da-b130-43ab-913d-243fd2efb86f>. Acesso em: 25 ago. 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa - IN N° 128, de 30 de MARÇO de 2022**. Disponível em: <<https://in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-128-de-30-de-marco-de-2022-389839399>>. Acesso em: 25 ago. 2022a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°658, de 30 de MARÇO de 2022**. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/64151119/RDC_658_2022_.pdf/aff5cd d7-4ad1-40e8-8751-87df566e6424>. Acesso em: 25 ago. 2022b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Instrução Normativa IN N 138, de 30 de Março de 2022**. Disponível em: <<https://in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-138-de-30-de-marco-de-2022%20389932120>>. Acesso em: 25 ago. 2022c.

AL-SHAWABKEH, A. F. Optoelectronic investigation and spectroscopic characteristics of polyamide-66 polymer. **e-Polymers**, v. 22, n. 1, p. 858–869, 2022.

ANTONSEN, H. R. K. et al. Sterilizing filtration of liquids. Technical report no. 26 (revised 2008). **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 62, n. 5 Suppl TR26, p. 2–60, 2008.

ARAÚJO, E. B. DE et al. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2008.

BOWMAN, F. W.; CALHOUN, M. P.; WHITE, M. Microbiological methods for quality control of membrane filters. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 56, n. 2, p. 222–225, 1967.

BRITO, R. **A História da Produção de Radiofármacos no IPEN**. Disponível em: <https://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?secao_id=632>. Acesso em: 24 nov. 2024.

CAO, X. et al. Effect of TiO₂ nanoparticle size on the performance of PVDF membrane. **Applied surface science**, v. 253, n. 4, p. 2003–2010, 2006.

CAVALHO, T. C. DE et al. Membranas de poliétersulfona/argila e sua permeabilidade à água. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 2, 2017.

CERQUEIRA, D. A. et al. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por ¹H-RMN. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 85–91, 2010.

CHEMICAL, A. **Fórmula do Policarbonato**. , 2009. Disponível em: <<https://pt.alfa-chemical.com/uploads/202235855/cas-25037-45-0-polycarbonate13113424884.jpg>>

COX, L. A. (TONY). Food microbial safety and animal antibiotics. Em: **Antimicrobial Resistance and Food Safety**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 303–323.

DAVIS, A.; GOLDEN, J. H. Stability of polycarbonate. **Journal of Macromolecular Science, Part C**, v. 3, n. 1, p. 49–68, 1969.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura- Aplicações e preparação de amostras**. <https://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/22337>: EDUPUCRS, [s.d.].

DHANUMALAYAN, E.; JOSHI, G. M. Performance properties and applications of polytetrafluoroethylene (PTFE)—a review. **Advanced composites and hybrid materials**, v. 1, n. 2, p. 247–268, 2018.

ELFORD, W. J. The principles of ultrafiltration as applied in biological studies. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)**, v. 112, n. 778, p. 384–406, 1933.

FDA. **Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing Center for Drugs and Biologics and Office of Regulatory Affairs. Food and Drug Administration**. Bethesda, MD: [s.n.].

FUKUMORI, N. T. O. **Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

GUBANSKI, A. et al. Application of the electret in alpha radiation sensor to measure the concentration of radon in selected ambient conditions. **Journal of sensors**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

HAIDER, S. I. **Validation standard operating procedures: A step by step guide for achieving compliance in the pharmaceutical, medical device, and biotech industries**. 2. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2019.

HASANAIN, F. et al. Gamma sterilization of pharmaceuticals--A review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product

formulations. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 68, n. 2, p. 113–137, 2014.

HERNÁNDEZ-NAVARRETE, M.-J. et al. Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 32, n. 10, p. 681–688, 2014.

HUSAIN, M.; SINGH, R.; PABLA, B. S. On PVDF composite as partially absorbable smart implants. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, v. 237, n. 4, p. 517–526, 2023.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Quality control in the production of radiopharmaceuticals**. Viena, Austria: IAEA, 2018.

IPEN. **DOT-IPEN-177 octreotato tetraxetana (177 Lu) Bula Profissional de Saúde**. Disponível em: <https://www.ipen.br/portal_por/conteudo/centro_de_radiofarmacia/bulas/DOT-IPEN-177_bula_profissional_saude.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2023.

JOHNSTON, P. R.; MELTZER, T. H. Comments on Organism Challenge Levels in Sterilizing Filter Efficiency Testing. **Pharmaceutical Technology**, v. 3, n. 11, 1979.

JORNITZ, M. W. (ED.). **Sterile filtration**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

LACERDA, A. E.; SILVA, J. **Preparation and evaluation of Brevundimonas diminuta for validating the sterilizing filtration of radiopharmaceuticals**. Brazil, 2012.

LEAHY, T. J. **Validation of bacterial retention by membrane filtration: a proposed approach for determining sterility assurance**. [s.l.] University of Massachusetts, 1983.

LEAHY, T. J.; SULLIVAN, M. J. Validation of Bacterial Retention Capabilities of Membrane Filters. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 11, 1978.

LEE, S.-H.; LEE, S.-S.; KIM, C.-W. Changes in the cell size of Brevundimonas diminuta using different growth agitation rates. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 56, n. 2, p. 99–108, 2002.

LIM, H. **Brevundimonas diminuta**. Disponível em: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Brevundimonas_diminuta>. Acesso em: 9 out. 2023.

MADSEN, R. E. Filter validation. Em: **Advances in Biochemical Engineering**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 125–141.

MALISKA, A. M. **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**. Disponível em: <https://www.usp.br/nanobiodev/wp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2024.

MAT NAWI, N. I. et al. Improved nylon 6,6 nanofiber membrane in A tilted panel filtration system for fouling control in microalgae harvesting. **Polymers**, v. 12, n. 2, p. 252, 2020.

MILLIPORE, M. **Millex®-GV Filter Unit (Sterile)**. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Millex-GV-Syringe-Filter-Unit-0.22m-PVDF-33mm-gamma-sterilized,MM_NF-SLGV033RS>. Acesso em: 25 ago. 2022.

NCTC. **Pseudomonas paraeruginosa**. Disponível em: <<https://www.culturecollections.org.uk/nop/pseudomonas-paraeruginosa>>. Acesso em: 3 dez. 2024.

O que são Membranas de Filtração - Saiba Mais Aqui. SPLABOR - Equipamentos para Laboratórios - Equipamentos para Laboratórios, Materiais para Laboratório e Produtos para Laboratório em geral SPLABOR - Equipamentos para Laboratórios, , 15 set. 2014. Disponível em: <<https://www.splabor.com.br/blog/membrana-de-filtracao/aprendendo-mais-membranas-de-filtracao/>>. Acesso em: 28 nov. 2024

OLSON, W. P. Validation and Qualification of Filtration Systems for Bacterial Removal. **Pharmaceutical Technology**, v. 3, n. 11, 1979.

PALL, D. B. Quality Control of Absolute Bacterial Removal Filters. **Bulletin of Parenteral Drug Association**, v. 29, 1975.

PALL, D. B.; KIMBAUER, E. S. Bacterial Removal Prediction in Membrane Filters. Em: **52nd Colloid and Surface Symposium**. Knoxville; Glencove, NY 11542: [s.n.].

PINTO, T. et al. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos**. Barueri: Manole, 2015.

PRICE, J. M.; PAULI, W. A. Utilization of new integrity test for membrane filter cartridges. **Bulletin of the Parenteral Drug Association**, v. 30, n. 1, p. 45–48, 1976.

PUBCHEM. **Lutetium Lu 177 Dotatate**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=76966897&t=l>>. Acesso em: 8 out. 2024.

REIFSNYDER, D. H.; MCKNIGHT, N. L.; KELLEY, B. Process validation. Em: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 511–519.

RETI, A. R.; LEAHY, T. J. Filter validation. III. Validation of bacterially retentive filters by bacterial passage testing. **Journal of the Parenteral Drug Association**, v. 33, n. 5, p. 257–272, 1979.

SAWLE, L.; GHOSH, K. How do thermophilic proteins and proteomes withstand high temperature? **Biophysical journal**, v. 101, n. 1, p. 217–227, 2011.

SEGATTO, M. **Validação da filtração esterilizante**. Disponível em: <<https://www.linkedin.com/pulse/validação-da-filtração-esterilizante-marcelo-segatto/>>. Acesso em: 6 out. 2024.

SEGRS, P. et al. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. **International journal of systematic bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 499–510, 1994.

SIDDIQUE, A. et al. PVDF-based piezo-catalytic membranes-A net-zero emission approach towards textile wastewater purification. **Polymers**, v. 16, n. 5, p. 699, 2024.

Sterilizing filtration of liquids. Technical report no. 26. Parenteral Drug Association. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 52 Suppl 1, p. 1–31, 1998.

SUNDARAM, S. et al. Application of membrane filtration for removal of diminutive bioburden organisms in pharmaceutical products and processes. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 53, n. 4, p. 186–201, 1999.

VARGAS, D. **Process to Cultivate Brevundimonas Diminuta for Filtration Validation**. Patent, 10 jun. 2006.

VATANPOUR, V. et al. Cellulose acetate in fabrication of polymeric membranes: A review. **Chemosphere**, v. 295, n. 133914, p. 133914, 2022.

.

**APÊNCICE A – PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE FILTRAÇÃO
ESTERILIZANTE**

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

1 Objetivo

Comprovar por meio de testes e evidências documentadas, que o processo de filtração esterilizante utilizado na produção do radiofármaco DOT-IPEN-177 garante consistentemente a esterilidade necessária do produto. Além disso, verifica-se que o filtro utilizado não compromete a qualidade do produto, assegurando sua conformidade com as normas regulatórias aplicáveis.

2 Campo de Aplicação

	Quem	Quando	Onde
CECRF	Técnico / Tecnologista	Validação de filtração esterilizante	Produção e Controle de Qualidade

3 Definições

Critério de aceitação: critério que estabelece os limites de aceitação de especificações de matérias-primas, produtos ou processos/sistemas.

Desvio de qualidade: qualquer ocorrência verificada no momento da validação que tenha afastamento dos parâmetros de qualidade estabelecidos para um produto ou processo. Considera-se que estes desvios/não conformidades estejam documentados no TNCMC.

Especificações: documento descrevendo em detalhes os requisitos a que devem atender os produtos ou materiais usados ou obtidos durante a fabricação. As especificações servem como base para a avaliação da qualidade.

Validação: Ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduz aos resultados esperados.

Revalidação: Repetição parcial ou total das validações de processo para assegurar que esses continuam cumprindo com os requisitos estabelecidos.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Protocolo de Validação: documento da Radiofarmácia específico para cada atividade que descreve os procedimentos a serem realizados na validação, incluindo os critérios de aceitação para a aprovação de um processo de produção ou de parte dele.

Relatório de Validação: documento no qual estão reunidos os registros, resultados e avaliação de um processo ou sistema de validação concluído.

4 Abreviaturas

%	Porcentagem
API	Água Para Injetáveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CECRF	Centro de Radiofarmácia
C/NC	Conforme/Não Conforme
CG	Cromatografia Gasosa
EU	<i>European Union</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Formulário
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
IN	Instrução Normativa
IT	Instrução de Trabalho
LAL	Lisado de Amébócitos de Limulus (<i>Lyophilized Amebocyte Lysate</i>)
Lu	Lutécio
MDV	Máxima Diluição Válida
mL	Mililitros
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
PG	Procedimento Gerencial
PO	Procedimento Operacional
Psi	<i>Pound-Force per Square Inch</i> / libra-força por polegada quadrada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

SECQR	Serviço de Controle de Qualidade de Radiofármacos
SEGQR	Serviço de Garantia de Qualidade de Radiofármacos
SEPRF	Serviço de Produção de Radiofármacos
EU	Unidades de Endotoxinas
UFC	Unidade Formadora de Colônias
Yb	Itérbio

5 Documentos relacionados

Farmacopeia Brasileira, sexta edição, 2022

ANVISA RDC nº 658 de 30 de março de 2022

IN nº 128 de 30 de março de 2022

IN nº 138 de 30 de março de 2022

IN nº 35 de 22 de agosto de 2019

Anexo 1 EU GMP de 22 de agosto de 2022

PDA TR nº26/2008 *Sterilizing filtration of liquids*

ASTM F838-20 *Standard test method for determining bacterial retention of membrane filters utilized for liquid filtration*

PG-DIRF-0903 Plano Mestre de Validação

PO-DIRF-0903.07 Validação de Métodos Analíticos

PO-IPN-1302.02 Controle radiológico nas áreas de trabalho

PO-CR-P03.24 Produção de DOT-IPEN-177

IT-CR-P03.24.01 Produção DOT-IPEN-177: Marcação e Envase

IT-CR-0907.07 Limpeza e Sanitização de Áreas Limpas

IT-CR-C01.23 Descarte de materiais e resíduos gerados no controle de qualidade

IT-CR-C01.26 Coloração de Gram

IT-CR-C01.34 Procedimentos gerais para uso de *Brevundimonas Diminuta* em validação de filtração esterilizante

IT-DIRF-0901.23 Operação do Microscópio

6 Responsabilidades

Garantia de Qualidade

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

- Aprovar o protocolo e relatório de validação baseado em especificações pré- determinadas
- Agendar as atividades de validação em conjunto com os departamentos envolvidos.
- Monitorar/Verificar as etapas críticas do processo de fabricação.
- Coordenar a investigação e documentação dos desvios de processo e resultados de testes que não atingiram os critérios de aceitação.
- Acompanhar a execução deste protocolo de validação.
- Avaliar os resultados.

Produção

- Revisar o protocolo de validação em conjunto com a Garantia da Qualidade.
- Providenciar e identificar os materiais a serem utilizados para a retirada das amostras relativas aos testes de validação, acompanhar as respectivas amostragens e encaminhá-las para o controle de qualidade.
- Providenciar equipamentos, pessoal e supervisão necessária para a realização dos testes de validação.
- Executar esse protocolo de validação em conjunto com a Garantia da Qualidade.

Controle de Qualidade


- Elaborar o protocolo de validação em conjunto com a Produção e Garantia da Qualidade
- Assegurar que todos os métodos analíticos possuam precisão e confiabilidade através da validação apropriada ou verificação.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

- Analisar as amostras conforme descrito nos procedimentos, emitindo laudos de análise.
- Notificar a Garantia da Qualidade quando houver desvios.
- Investigar e documentar todos os resultados fora de especificação e reportar à Garantia da Qualidade.

7 Esterilização por Filtração

A produção de DOT-IPEN-177 no CECRF utiliza o processo de esterilização por filtração (membrana de 0,22 µm) dentro de cela. As informações sobre o filtro empregado estão descritos na tabela a seguir:

Catálogo	Descrição	Características	Imagem ilustrativa
SLGVR33RS	Millex [®] Millipore GV Merck Millipore	Filtro fluoreto de polivinilideno- PVDF, hidrofílico, não tóxico e estéril com 0,22 µm de tamanho do poro, 33 mm de diametro e 4,52 cm ² de área.	

7.1 Estratégia de Validação de Processo

A validação do processo de filtração do DOT-IPEN-177 será do tipo concorrente e considerando a fabricação do produto na maior atividade (em torno de 3 Ci) visando verificar se a atividade radioativa pode afetar a integridade da membrana, conforme testes descritos no apêndice 5 e 7 deste protocolo.

Será realizada em duas etapas: a primeira etapa compreende a qualificação do filtro, onde se demonstra que a unidade filtrante não interfere na composição do produto através dos ensaios físicos como: teste de integridade; teste de compatibilidade

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

filtro/membrana e produto; teste de adsorção, teste de extraíveis e teste de lixiviáveis.

Na segunda etapa, são verificadas a esterilidade e apirogenicidade do filtrado e é demonstrado que o mesmo é capaz de reter bactérias, através de um desafio bacteriológico com a filtração de uma suspensão de *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146), devendo resultar em filtrado estéril.

7.1.1 Testes a serem realizados

Cada item será avaliado individualmente quanto a sua conformidade, de forma que todos os itens devem estar em conformidade. Todos os pontos críticos levantados devem ter o seu critério de aceitação definido. O campo “como encontrado” sempre deve estar conforme o critério de aceitação definido. Os resultados dos testes devem ser registrados nos apêndices correspondentes. O processo de validação será realizado de acordo com os testes descritos na Tabela 1, que deverão ser realizados e verificados para cada lote de validação.

Tabela 1 – Testes para Validação do Processo de Filtração Esterilizante

	Testes
I	Teste de Integridade
II	Teste de Compatibilidade
III	Teste de Adsorção
IV	Teste de Extraíveis
V	Teste de Desafio de Retenção Bacteriana
VI	Teste de Endotoxinas Bacterianas

I. Teste de Integridade

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

O teste de integridade de um filtro esterilizante é um teste não destrutivo que serve de controle de processo para assegurar que o sistema de filtração não apresente qualquer irregularidade que possa comprometer o processo de filtração. Uma das formas de se avaliar a integridade da membrana consiste em molhar o filtro com líquido adequado e aplicar uma pressão de gás suficiente para expulsar o líquido de dentro dos maiores poros da membrana. Ao atingir esta pressão, o gás que está pressurizando a membrana molhada consegue atravessá-la e pode ser visualizado na saída do filtrado.

Procedimento: O teste deverá ser realizado utilizando o fluido umidificador e o produto separadamente, que no caso, por recomendação do próprio fabricante, o fluido poderá ser alguns mililitros da própria solução produto ou água para injetáveis (API). Filtrar o fluido umidificador e posteriormente o radiofármaco DOT-IPEN-177.

- É necessário medir o ponto de bolha em ambos os casos e estabelecer a relação entre os resultados
- A integridade da membrana filtrante é avaliada a partir do teste de bolha, que consiste na visualização de bolhas após a aplicação de uma determinada pressão sobre o filtro.
 - a. Realizar a passagem de 5 mL de água API e realizar o teste de bolha. Executar o ensaio em três lotes diferentes do filtro.
 - b. Realizar a passagem de DOT-IPEN-177 e realizar o teste de bolha. Executar o ensaio em três lotes diferentes do filtro.
 - c. Antes de Realizar o teste de bolha do produto DOT-IPEN-177 umidificar o filtro com a passagem de 5 mL de água API.
 - d. Calcular a média para o ponto de bolha após a filtração da água e ponto de bolha após a filtração do volume total do radiofármaco nos três lotes de filtros;

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

- e. Calcular a razão entre a média do ponto de bolha após filtração da água e média do ponto de bolha após filtração do radiofármaco.

Fórmula:

$$\text{Razão} = \frac{\text{média ponto de bolha do produto}}{\text{média ponto de bolha da água}}$$

Critério de aceitação: O ponto de bolha encontrado na leitura do manômetro durante o teste deve atender ao critério específico do fabricante (pressão mínima de 3,45 bar/ 50 psi). Não deve haver uma diferença menor ou igual a 10,0% entre a relação das médias do ponto de bolha após a filtração da água e a média do ponto de bolha após a filtração total da amostra do produto.

II. Teste de Compatibilidade

O mecanismo primário pelo qual os filtros de membrana grau esterilizante removem partículas e microrganismos é exclusão por tamanho. Se o produto não for quimicamente compatível com o polímero da membrana, a exposição ao produto poderá potencialmente alterar o tamanho de poro e, portanto, alterar a capacidade de retenção. Portanto, é importante comprovar que o produto não interfere no tamanho de poro do filtro.

O teste de compatibilidade é projetado para estudar a ocorrência de alteração nas características físicas do produto e da membrana, antes e após exposição ao produto. Realizar os testes em três lotes diferentes do filtro, conforme descritos abaixo:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Procedimento: Avaliar através de blindagem da célula de produção, o aspecto da solução do produto e filtro antes e depois da filtração e submeter a ensaios de controle de qualidade, descritos a seguir:

- a. Realizar a inspeção visual do filtro e membrana. Não deve haver alteração física de cor da membrana, descamação do filtro, inchaço do filtro ou qualquer outra alteração observável.
- b. Na cela de produção, realizar a inspeção visual da solução de DOT-IPEN-177 antes da filtração. Verificar a presença de partículas visíveis na solução do produto. Retirar uma alíquota de 0,2 mL antes da filtração e enviar para análise.
- c. Nos laboratórios de Controle de Qualidade, submeter aos ensaios de controle de qualidade físico-químico: descrição, determinação do pH, determinação da pureza radioquímica e da pureza radionuclídica.
- d. Na cela, proceder à filtração esterilizante do lote de DOT-IPEN-177.
- e. Na cela, após a filtração do radiofármaco pela membrana, deve-se realizar a inspeção visual. Verificar a presença de partículas visíveis. Não deve haver alteração física de cor, descamação, inchaço ou qualquer outra alteração observável na membrana ou no produto devem estar ausentes.
- f. Retirar uma alíquota de 0,2 mL após a filtração e submeter aos ensaios de controle de qualidade físico-químico: descrição, determinação do pH, determinação da pureza radioquímica e da pureza radionuclídica.
- g. As mesmas análises deverão ser realizadas para o produto não filtrado. Os resultados das análises deverão ser comparados para verificação de qualquer interferência do filtro sobre a qualidade do produto.
- h. O teste deve ser realizado para três lotes de filtro e três lotes do produto.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Critério de Aceitação: Os resultados analíticos do produto devem estar dentro da faixa de especificação, deverá haver uma diferença igual ou menor que 10% e não sofrer alteração dentro em ambos os casos.

III. Teste de Adsorção

O Estudo da Adsorção é um ensaio que serve para avaliar a retenção do produto no filtro (perda).

Procedimento: filtrar o produto conforme operações de rotina na membrana a ser validada e após a filtração medir a atividade que ficou retida na membrana. Calcular a porcentagem da atividade retida na membrana em relação à atividade do lote de produção. Realizar os testes em três lotes diferentes do filtro.

Critério de Aceitação: diferença menor ou igual a 10,0% entre as medias dos valores obtidos para cada lote com as amostras de DOT-IPEN-177 filtrado e não filtrado.

IV. Teste de Extraíveis

Filtros esterilizantes podem liberar materiais chamados de extraíveis, entre os quais podemos citar agentes umectantes e surfactantes, aditivos componentes de plásticos, resíduos de fabricação, e materiais constituintes das membranas. Diante disso é importante demonstrar que o produto, em condições extremas (pior caso) de composição química, não afeta a membrana filtrante podendo levar à extração de componentes.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Procedimento: realizar o processo de filtração esterilizante utilizando as duas soluções teste (solução fria simulada – “*solvent model*”) conforme IT-CR-P03.24.01 (Produção de DOT-IPEN-177: Marcação e Envase). Realizar o ensaio em três lotes diferentes de filtro e produto. O teste de extraíveis será realizado em três avaliações:

- a. **Inspeção visual das soluções:** Após o processo de filtração das soluções deverão ser realizadas as inspeções dos filtrados, para pesquisa de possíveis partículas extraídas do filtro. Para avaliação as soluções devem ser mantidas em repouso por 1 hora. Após este período, agitar os frascos e realizar a inspeção em local com luminosidade e condições adequadas. Para aumentar a sensibilidade, uma lente de aumento pode ser utilizada. A inspeção nas soluções testes deve ser comparada com a inspeção de uma solução livre de partículas.
- b. **Integridade da Membrana:** após a filtração realizar o teste de integridade da membrana.
- c. **Esterilidade do Produto Simulado:** realizar o ensaio de esterilidade do produto simulado conforme descrito na IT-CR-C01.01 – Controle Microbiológico: Ensaio de Esterilidade e registrar em formulário específico.

Critério de Aceitação:

- a. **Inspeção Visual:** Alterações físicas de cor ou qualquer outra alteração observável no produto devem estar ausentes.
- b. **Integridade da Membrana:** O ponto de bolha encontrado na leitura do manômetro durante o teste deve atender ao critério especificado pelo fabricante ≥ 50 psi.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

- c. **Esterilidade:** O resultado do teste de esterilidade do produto simulado filtrado deve ser estéril (ausência de crescimento de microrganismos). Anexar o resultado do ensaio no relatório.

V. Teste do Desafio de Retenção Bacteriana

Durante a validação da filtração esterilizante, o filtro deve ser submetido a um teste de desafio bacteriológico com a cepa de escolha *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146), produzindo um efluente estéril sem alterar as características do produto filtrado.

Procedimento para o teste da retenção bacteriana: como forma de investigar a capacidade esterilizante da membrana de filtração, realizar o teste de retenção bacteriana em três lotes diferentes de filtro.

Preparo do inóculo: Preparar um inóculo da bactéria *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146) com concentração final no pré-filtrado de no mínimo 10^7 UFC/cm² de superfície de membrana (ou seja, mínimo de $4,52 \times 10^7$ UFC) calculada a partir da concentração descrita no certificado, conforme IT-CR-C01.34 – Procedimentos Gerais para Uso de *Brevundimonas diminuta* em Validação de Filtração Esterilizante.

Para a realização do teste da retenção bacteriana, devem ser realizados pelo controle de qualidade os testes preliminares e os paralelos, conforme descritos abaixo:

Testes Preliminares: Estes testes são realizados antes da execução do processo principal de filtração esterilizante. O objetivo é verificar se o filtro e o

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

sistema estão funcionando corretamente antes de expor o produto final ao processo.

- **Viabilidade:** inocular a cepa $4,52 \times 10^7$ UFC diretamente no produto simulado antes da filtração (pré-filtrado), aguardar o tempo equivalente ao transcorrido entre a contaminação do pré-filtrado e o início da análise do pós-filtrado, e verificar se a carga não é reduzida, dessa maneira demonstrando que o produto não afetará a carga de microrganismos no pré filtrado. Realizar em três lotes de produto e registrar em formulário específico. Seguir a IT- CR-C01.34 – Procedimentos Gerais para o Uso de *Brevundimonas diminuta* em Validação de Filtração Esterilizante.
- **Controle da Cepa:** Deve-se realizar a identificação, caracterização e quantificação da bactéria através dos ensaios de morfologia da colônia, exame microscópico, caracterização bioquímica e *spread plate*, conforme os documentos IT-CR-C01.34 – Procedimentos Gerais para o Uso de *Brevundimonas diminuta* em Validação de Filtração Esterilizante e IT-CR-C01.26 – Coloração de Gram.

Testes Paralelos: Estes testes são realizados simultaneamente com o processo de filtração esterilizante real. O objetivo é monitorar continuamente o desempenho do filtro durante a operação. São essenciais para detectar qualquer desvio ou problema no filtro durante o processo real de filtração esterilizante.

- **Controle Negativo:** deve-se executar o teste de esterilidade da membrana filtrante com a filtração de solução salina estéril, ou seja, é um pré-requisito para a execução deste protocolo que o controle negativo (teste de esterilidade da membrana filtrante) tenha sido executado e esteja

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

em conformidade. Anexar certificado de esterilidade da membrana filtrante com a filtração de solução salina estéril, conforme FM-CR-C01.01 – Formulário Geral de Controle de Qualidade.

- **Controle Positivo:** inocular carga reduzida de *B. diminuta* (< 100 UFC) no pós-filtrado, para demonstrar que não ocorre redução na viabilidade do microrganismo e que o método de quantificação é adequado, e registrar em formulário específico. Seguir a IT-CR-C01.34 – Procedimentos Gerais para o Uso de Brevundimonas diminuta em Validação de Filtração Esterilizante.

VI. Teste de Endotoxinas Bacterianas

A detecção de endotoxinas bacterianas (pirogênio) é de vital importância aos pacientes, pois agentes de origem exógena ou endógena podem causar elevação de temperatura corporal. É de extrema importância a ausência de endotoxinas bacterianas no produto, como parte da validação. O método Gel-Clot consiste em determinar o aparecimento de um gel e a gelificação ocorre ao coagularem-se as proteínas por presença de endotoxinas. O limite de detecção dos ensaios depende do fabricante do kit que contém o reagente LAL (lisado de amebócitos de *Limulus*).

Procedimento: Abaixo da concentração de $0,125 \text{ UE mL}^{-1}$ de endotoxinas bacterianas não ocorre a formação de um gel sólido que permanece no tubo de ensaio quando é movimentado. Um critério utilizado no método de gelificação é virar o tubo de ensaio até um ângulo de 180° e comprovar que o gel se mantém intacto. O método Gel-Clot pode ser utilizado de maneira qualitativa, dando resultados positivo ou negativo caso não se forme o gel, e semiquantitativa. O resultado deve ser registrado no formulário como < 10 ou 12,5 UE/mL. A concentração limite de endotoxina no radiofármaco é calculada multiplicando-se a diluição da amostra

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

vezes a sensibilidade declarada. Por exemplo, uma amostra diluída **100 vezes**:
Concentração Máxima de Endotoxinas bacterianas no Radiofármaco = $100 \times 0,125$
 $\text{UE mL}^{-1} = 12,5 \text{UE mL}^{-1}$.

Critério de aceitação: O resultado é interpretado como positivo ou negativo na sensibilidade de $\lambda = 0,125 \text{UE mL}^{-1}$. O resultado POSITIVO apresenta a formação de um gel firme capaz de manter sua integridade quando o tubo for invertido a 180° . O resultado NEGATIVO se caracteriza pela ausência do gel ou pela formação de uma massa viscosa que não adere ao fundo quando o tubo é invertido. Os resultados do teste só são válidos quando os controles positivos da água e das amostras forem positivos na concentração de 2λ , e os controles negativos não mostrarem a formação do gel.

8 Não conformidade

Todo desvio relacionado ao não cumprimento dos critérios de aceitação do protocolo em questão deve ser tratado conforme PG-CR-0801 – Gerenciamento de Desvios da Qualidade.

9 Registro e Avaliação dos Resultados

Os resultados de cada teste de validação devem ser analisados de forma individual através da comparação destes resultados com os critérios de aceitação, e de forma coletiva pela comparação dos resultados de todos os testes de validação.

Todos os dados obtidos durante a validação, a avaliação dos resultados das análises individuais e comparativas de cada teste, bem como a conclusão final, constarão no Relatório de Validação do Processo.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

10 Revalidação

Uma vez validado, o processo de filtração esterilizante não necessita ser revalidado por tempo. Somente deverá ser revalidado após alterações no produto, na membrana filtrante, equipamentos ou processo, que possam comprometer a qualidade do produto e sua esterilidade.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

11 Apêndices

Para o início da validação do método de análise, os pré-requisitos relacionados nos apêndices a seguir devem ser verificados:

Apêndice	Teste/Ensaio	Nº de repetições
Apêndice 1	Verificação dos Procedimentos e Instruções de Trabalho	
Apêndice 2	Verificação de Equipamentos	
Apêndice 3	Verificação dos Reagentes/Soluções	

A validação da filtração esterilizante será executada de acordo com os apêndices a seguir:

Apêndice	Teste/Ensaio	Nº de repetições
Apêndice 4	Teste de Integridade	
Apêndice 5	Teste de Compatibilidade	
Apêndice 6	Teste de Adsorção	
Apêndice 7	Teste de Extraíveis	
Apêndice 8	Teste de Desafio de Retenção Bacteriana	
Apêndice 9	Teste de Endotoxinas Bacterianas	
Apêndice 10	Lista de Não Conformidades	
Apêndice 11	Lista de Assinaturas	

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

12 Relatório

Os dados obtidos e os resultados devem ser registrados nos apêndices correspondentes conforme PO-CR-C01 analisados e comparados com os critérios de aceitação previamente estabelecidos. Um relatório final deve ser elaborado para a conclusão da validação da metodologia analítica, levando em consideração os seguintes itens:

- Os resultados devem atender aos critérios de aceitação;
- Não conformidades e resultados fora dos limites devem ser investigados;
- Se não conformidades forem aceitas, devem ser justificadas;
- Quando necessário, devem ser conduzidos estudos adicionais.

O método analítico de filtração esterilizante do produto DOT-IPEN-177, será considerado validado se os resultados de todos os parâmetros de validação estiverem conforme os critérios de aceitação para cada um dos parâmetros selecionados.

13 Referências

RDC nº 658, de 30 de março de 2022, ANVISA - Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

IN nº 128, de 30 de março de 2022, ANVISA - Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Radiofármacos.

IN nº 138, de 30 de março de 2022, ANVISA Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação complementares às atividades de qualificação e validação.

IN nº 35, de 22 de agosto de 2019, ANVISA. Dispõe sobre as Diretrizes de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Estéreis do Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica.

EU GMP Annex 1: Manufacture of Sterile Medicinal Products, 22 de agosto de 2022.

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

PDA Technical Report No. 26 (TR 26) Revised 2008, Sterilizing Filtration of Liquids.
ASTM F838-20 - Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration.

PG-DIRF-0903 - Plano Mestre de Validação do Centro de Radiofarmácia

PO-DIRF-0903.10 - Validação de Processo de Filtração Esterilizante

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 1 Verificação dos Procedimentos e Instruções de Trabalho

Os procedimentos e instruções de trabalho devem estar vigentes e em conformidade com o método a ser validado. Os analistas devem ter sido treinados nos documentos.

Código	Revisão	Nome do Documento	Status*
IT-CR-P03.24.01		Produção de DOT-IPEN-177: marcação e envase	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-DIRF-0909.07		Teste de Integridade de Membrana Filtrante Utilizando Equipamento Palltronic Flowstar Iv	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.01		Controle microbiológico: ensaio de esterilidade	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.02		Controle de endotoxinas bacterianas pelo método <i>in vitro</i> LAL	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.03		Controle físico-químico: descrição de produto	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.05		Controle Físico-Químico: Determinação de pH	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.07		Controle Físico: Determinação de identidade e pureza radionuclídica	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.21		Controle Radioquímico de Radiofármacos Pronto para Uso	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
IT-CR-C01.34		Procedimentos Gerais para Uso de <i>Brevundimonas diminuta</i> em Validação de Filtração Esterilizante	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

*C = Conforme / NC = Não Conforme

Observações:	
Resultado:	
Realizado por:	Data:
Verificado por:	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 2 Verificação de Equipamentos

Item	Código / Documento	Status*
Identificação		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Manual		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Marca		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Certificado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

Item	Código / Documento	Status*
Identificação		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Manual		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Marca		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Certificado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

* C = Conforme / NC = Não Conforme

Observações:	
Resultado:	
Realizado por:	Data:
Verificado por:	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 3 Verificação dos Reagentes/Soluções

Item	Código / Documento	Status*
Lote		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Validade		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Certificado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

Item	Código / Documento	Status*
Lote		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Validade		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Certificado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

Item	Código / Documento	Status*
Lote		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Validade		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
Certificado		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

*C = Conforme / NC = Não Conforme

Observações:	
Resultado:	
Realizado por:	Data:
Verificado por:	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 4 Teste de Integridade

Produto: DOT-IPEN-177					
Valores de pressão – Ponto de bolha - Avaliação entre o mesmo lote de filtro					
Amostra	1º Lote do filtro			Média	Razão
Lote do filtro					
Lote do produto					
Ponto de bolha da água					
Ponto de bolha do radiofármaco					

Produto: DOT-IPEN-177					
Valores de pressão – Ponto de bolha - Avaliação entre o mesmo lote de filtro					
Amostra	2º Lote do filtro			Média	Razão
Lote do filtro					
Lote do produto					
Ponto de bolha da água					
Ponto de bolha do radiofármaco					

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
--------	----------------	------	--------------------------

Título **Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177**

Produto: DOT-IPEN-177					
Valores de pressão – Ponto de bolha - Avaliação entre o mesmo lote de filtro					
Amostra	3º Lote do filtro			Média	Razão
Lote do filtro					
Lote do produto					
Ponto de bolha da água					
Ponto de bolha do radiofármaco					

Valor de pressão – Ponto de bolha – Avaliação entre Lotes Diferentes do Filtro			
Amostra	1º Lote do filtro	2º Lote do filtro	3º Lote do filtro
Diferença entre as relações deve ser < 10,0%			

Observações:			
Resultado:			
Realizado por:	Data:	Verificado por	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 5 Teste de Compatibilidade

Teste de Compatibilidade			
1º Lote do Filtro:			
Lote do Produto:		Lote do Filtro:	
	Antes da Filtração	Depois da Filtração	Diferença percentual (%)
Avaliação Visual do Filtro/membrana	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	-
Avaliação visual do Produto	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	-
pH			
Pureza Radioquímica			
Pureza Radionuclídica			

Teste de Compatibilidade			
2º Lote do Filtro:			
Lote do Produto:		Lote do Filtro:	
	Antes da Filtração	Depois da Filtração	Diferença percentual (%)
Avaliação Visual do Filtro/membrana	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	-
Avaliação visual do Produto	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	-
pH			
Pureza Radioquímica			
Pureza Radionuclídica			

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
--------	----------------	------	--------------------------

Título **Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177**

Teste de Compatibilidade			
3º Lote do Filtro:			
Lote do Produto:		Lote do Filtro:	
	Antes da Filtração	Depois da Filtração	Diferença percentual (%)
Avaliação Visual do Filtro/membrana	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	N.A.
Avaliação visual do Produto	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	N.A.
pH			
Pureza Radioquímica			
Pureza Radionuclídica			

*C = Conforme/NC = Não Conforme

N.A. = Não Aplicado.

Ensaio	Especificação
pH	4,0 – 5,5
Pureza radioquímica	≥ 95%
Pureza radionuclídica	≥ 99,9 %
	$^{177m}\text{Lu} \leq 0,07\%$
	$^{175}\text{Yb} \leq 0,1\%$
	outras impurezas: $\leq 0,01\%$

Observações:

Resultado:

Realizado por:	Data:	Verificado por	Data:
----------------	-------	----------------	-------

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 6 Teste de Estudo de Adsorção

Corrida	Lote do Filtro	Lote Produto
1°		
2°		
3°		

Corrida	Atividade do lote	Atividade retida no filtro	% de retenção de atividade no filtro
1°			
2°			
3°			

Observações:			
Resultado:			
Realizado por:	Data:	Verificado por	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 7 Teste de Extraíveis

	Lote do Filtro	Teste de Integridade da Membrana - simulação	Avaliação Visual do Produto Simulado	Teste de esterilidade do produto simulado
1º		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> Ausência de crescimento microbiano (estéril) <input type="checkbox"/> Presença de crescimento microbiano
2º		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> Ausência de crescimento microbiano (estéril) <input type="checkbox"/> Presença de crescimento microbiano
3º		<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	<input type="checkbox"/> Ausência de crescimento microbiano (estéril) <input type="checkbox"/> Presença de crescimento microbiano

Observações:

Resultado:

Realizado por:	Data:	Verificado por	Data:
----------------	-------	----------------	-------

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 8 Teste de Desafio de Retenção Bacteriana

Lote do Filtro	Lote do Produto	Lote de <i>B. diminuta</i>	Teste da retenção bacteriana realizado adequadamente?	Teste de integridade de Membrana
			<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	____psi <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
			<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	____psi <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC
			<input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC	____psi <input type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> NC

* C= Conforme/NC= Não Conforme

Observações:	
Resultado:	
Realizado por:	Data:
Verificado por	Data:

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 9 Teste de Endotoxinas Bacterianas

DOT-IPEN-177 – Método Gel	
Volume Máximo de Marcação (mL)	30
Limite de Endotoxinas (UE/mL)	35
Máxima Diluição Válida (MDV)	280

1º LOTE: _____ DATA: ___/___/___			
Nº Analise			
ID amostra:			
Diluição da amostra:			
Resultado (P1): _____ UE/mL			
Resultado: _____ UE/mL			

2º LOTE: _____ DATA: ___/___/___			
Nº Analise			
ID amostra:			
Diluição da amostra:			
Resultado (P1): _____ UE/mL			
Resultado: _____ UE/mL			

3º LOTE: _____ DATA: ___/___/___			
Nº Analise			
ID amostra:			
Diluição da amostra:			
Resultado (P1): _____ UE/mL			
Resultado: _____ UE/mL			

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

Apêndice 10 Lista de Não Conformidades

Lista de Não Conformidade				
Nº Apêndice	Nº da NC	Breve descrição	Ação estabelecida?	NC encerrada?
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
			<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

14 Histórico de Análise Crítica e Alterações

Rev.	Data	Descrição
00	Vide Cabeçalho	•

Código	Rev. 00	Data	Classif. Restrito
Título Protocolo de Validação do Processo de Filtração Esterilizante – DOT-IPEN-177			

15 Elaboração, Análise e Aprovação.

	Nome (do responsável ou órgão colegiado)	Setor
Elaborado/Revisado		
Analisado		
Aprovado		
Homologado		

16 Assinaturas Eletrônicas

	Nome (do responsável ou órgão colegiado)
Elaborado/Revisado	
Analisado	
Aprovado	
Homologado	

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária - CEP: 05508-000
Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572
São Paulo – SP – Brasil
<http://mprofissional.ipen.br>

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal