



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Desenvolvimento de procedimento para avaliação de extraíveis e lixiviáveis presentes em embalagens primárias de produtos cosméticos: uma abordagem preliminar**

**“Versão final após defesa pública”**

**Iris Alexandra González de Passos**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Ana Palmeira de Oliveira  
Co-orientadoras: Mestre Lígia Borges  
Prof. Doutora Albertina Amaro

**Covilhã, agosto de 2019**



# Agradecimentos

A realização desta dissertação contou com inúmeros incentivos e apoios aos quais estarei eternamente grata.

À Professora Albertina Amaro, pela sua total disponibilidade, orientação, opinião e colaboração para a realização desta dissertação.

À Engenheira Lúcia Borges, por todo o apoio, confiança e partilha de conhecimento durante a realização da dissertação.

À professora Ana Palmeira de Oliveira, por ter acreditado, confiado em mim para abordar este tema e por ter permitido a realização de um estágio nas suas instalações, durante a dissertação.

A todos os elementos da *Labfit-HPRD Lda.*, por me terem acolhido e feito sentir em “casa”, por toda a ajuda e disponibilidade. Em especial, à Joana pelo tempo que me disponibilizou a ensinar incontáveis técnicas.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo incondicional ao longo destes anos.

Ao meu irmão, por me ter ensinado a ter força e a nunca desistir dos meus sonhos.

Um agradecimento especial à minha irmã, pela sua paciência, companheirismo e apoio durante o percurso académico e ao longo destes anos.

Ao Jaime, pela capacidade de me fazer rir em momentos de exaustão e por todo o carinho e amor que tem tido.

À Inês (Capitã) e à Micas, pelo seu companheirismo e amizade durante este percurso.



# Resumo

Grande parte dos sistemas de embalagem, entrega, administração e processamento dos produtos farmacêuticos, alimentares e cosméticos, são feitos a partir de materiais plásticos, como elastómeros e polímeros, podendo ainda ser adicionados aditivos químicos. Estes sistemas, necessitam de ser adequados ao uso pretendido e devem apresentar certos atributos, tais como ter a capacidade de proteger e ao mesmo tempo serem compatíveis com o produto farmacêutico, alimentar ou cosmético.<sup>1</sup>

De forma a comprovar a compatibilidade destes sistemas, são realizados estudos de extraíveis e lixiviáveis. Estão disponíveis diferentes Normas Internacionais e protocolos, para a realização destes estudos e apesar de existirem diferenças entre estudos de extraíveis em embalagens de produtos farmacêuticos e estudos de embalagens em contacto com os alimentos, a estratégia de avaliação é comum e tem em consideração três fases do estudo: a primeira fase tem como objetivo reunir informações atualizadas do fornecedor, sobre a composição dos materiais plásticos e das suas especificações de controlo de qualidade; a segunda fase consiste na avaliação da migração global; a terceira fase baseia-se na avaliação dos extraíveis, ou seja, é realizada uma migração específica com o intuito de identificar os extraíveis e avaliar os seus potenciais riscos. Estes são avaliados recorrendo a processos de extração agressivos e a métodos de identificação com base em múltiplas metodologias analíticas. Caso os compostos observados estejam acima do limite de segurança, é necessário recorrer à identificação e avaliação da toxicidade e é necessário realçar que, para muitos aditivos não existem dados toxicológicos.<sup>2</sup>

Quando se realiza pela primeira vez um estudo sobre os extraíveis, pode-se ter uma ideia limitada do que procurar e quais as técnicas de extração e os métodos analíticos que devem ser usados para a identificação e avaliação de possíveis lixiviáveis.<sup>3</sup> Assim, com a realização deste projeto pretende-se implementar ensaios otimizados e validados para estudos de extração e de lixiviação.

## Palavras chave

Lixiviáveis, Extraíveis, Cromatografia, Embalagens, Migração global

# Abstract

Much of the packaging, delivery, administration and processing systems for pharmaceuticals, food and cosmetics are made from plastic materials, as elastomers and polymers, and may also present chemical additives. These systems need to be suitable for the intended use and should have certain attributes, such as being able to protect and at the same time being compatible with the pharmaceutical, food or cosmetic product.<sup>1</sup>

In order to prove the compatibility of these systems, extractable and leachable studies are carried out. Different International Standards and protocols are available to carry out these studies and even though, there are differences in the studies of extractables in packages of pharmaceuticals with the packages in contact with food, the evaluation strategy is common and takes into account three phases of the study: the first phase aims at gathering the most updated information from the provider, on the composition of the plastic materials and its quality control specifications. The second aim consists in the evaluation of the overall migration. The third aim is based on the evaluating of extractables, that is, a specific migration is performed in order to identify extractables and evaluate their potential risks. These are evaluated using aggressive extraction process and multiple analytical methodologies. If the compounds are present above the safety limit, identification and toxicity evaluation is necessary, and it should be highlight that for several additives there is no toxicological data available.<sup>2</sup>

When a study on extractables is carried out for the first time, one can have a limited idea of what to look for and which extraction techniques and analytical methods should be used for the identification and evaluation of possible leachables.<sup>3</sup> Thus, with the accomplishment of this project we intend to implement optimized and validated tests for extraction and leaching studies.

## Keywords

Leachable, Extractable, Chromatography, Packaging, Global migration

# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Palavras chave .....	v
Abstract .....	vi
Keywords .....	vi
Índice.....	vii
Lista de Figuras .....	xi
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Acrónimos .....	xvii
Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
1.1. Enquadramento do tema.....	1
1.1.1. Avaliação da compatibilidade de cosméticos com a embalagem primária .....	4
1.1.2. Extraíveis e lixiviáveis em medicamentos .....	5
1.1.3. Migração em materiais em contacto com os alimentos.....	8
1.2. Objetivos.....	9
1.3. Estrutura da dissertação .....	9
Capítulo 2.....	11
Extraíveis e Lixiviáveis .....	11
2.1. Conceitos.....	11
2.2. Limites de segurança de extraíveis e lixiviáveis em embalagens farmacêuticas .....	14
2.3. Recomendações e pontos críticos em extraíveis e lixiviáveis de embalagens farmacêuticas .....	16
2.4. Regulamentação e limites relacionados com as embalagens em contacto com alimentos.....	19
2.5. Recomendações no estudo de migração em embalagens em contacto com alimentos.....	23
2.6. Análise Toxicológica.....	27
Capítulo 3.....	29
Metodologia .....	29

3.1. Migração global.....	29
3.2. Ensaio de extraíveis .....	32
3.3. Técnicas analíticas.....	34
Capítulo 4.....	37
4.1. Embalagens em estudo.....	37
4.2. Migração Global .....	37
4.3. Ensaio de extraíveis .....	39
4.4. Determinação dos Compostos Orgânicos Voláteis dos extraíveis .....	41
4.5. Resultados Migração.....	42
4.6. Resultados da análise dos extraíveis .....	45
Capítulo 5.....	49
Conclusões e perspetivas futuras .....	49
Capítulo 6.....	51
Estágio .....	51
6.1. Apresentação da <i>Labfit-Health Products Research and Development e Ensaio realizados</i> .....	51
6.2. Teste de qualidade microbiológica:.....	52
6.2.1. Teste de QM de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0 .....	52
Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos .....	52
Eficácia do neutralizante .....	53
Procedimento.....	54
Cálculo QM.....	55
Interpretação de resultados.....	55
6.2.2. Teste de QM de acordo com a ISO 21149:2017 e ISO 16212:2017 .....	55
Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos .....	56
Eficácia do neutralizante .....	56
Procedimento.....	56
Cálculo QM.....	57
Interpretação de resultados.....	58
6.3. Challenge Test .....	58
6.3.1. CT de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0 .....	59
Soluções, reagentes e microrganismos.....	59
Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos .....	59

Eficácia do neutralizante .....	60
Ensaio Eficácia do conservante .....	61
Inoculação das amostras no tempo inicial ( $t_0$ ) .....	61
Leituras em tempos específicos.....	61
6.3.2. CT de acordo com a ISO 11930:2019 .....	62
Soluções, reagentes e microrganismos.....	62
Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos.....	63
Eficácia do neutralizante .....	63
Ensaio Eficácia do conservante .....	64
Inoculação das amostras em $T_0$ .....	64
Leituras em tempos específicos.....	64
6.4. Cálculos do ensaio CT .....	65
6.4.1. Contagem nas suspensões de trabalho .....	65
6.4.2. Contagem dos microrganismos em cada tempo de análise.....	66
6.4.3. Redução logarítmica .....	66
6.5. Critérios para a interpretação de resultados e classificação da formulação	67
6.5.1. Critérios de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0 .....	67
6.5.2. Critérios de acordo com a ISO 11930:2019 .....	68
6.6. Resultados das amostras .....	69
Bibliografia .....	71
Anexo I .....	75
Composição das embalagens usadas para o estudo de Extraíveis e Lixiviáveis.....	75
Anexo II .....	80
Registo das massas usadas para o cálculo da migração global (subcapítulo 4.2).....	80
Anexo III.....	85
Preparação das soluções e reagentes utilizados no capítulo 6.....	85



# Lista de Figuras

Figura 1: Caracterização de produtos extraíveis e lixiviáveis em produtos farmacêuticos de via parenteral. <sup>6</sup> .....	1
Figura 2: Fatores de conformidade para recipientes de medicamentos pela FDA. <sup>9</sup> .....	3
Figura 3: Tipos de plástico. <sup>10</sup> .....	4
Figura 4:Relação entre extraíveis e lixiviáveis. <sup>9</sup> .....	11
Figura 5: Esquema para os estudos de extração, adaptado da diretriz dos materiais plásticos para embalagens imediatas. <sup>16</sup> .....	13
Figura 6: Processo de desenvolvimento farmacêutico para a avaliação de extraíveis e lixiviáveis em OINDP. <sup>3</sup> .....	17
Figura 7: Abordagem generalizada dos métodos analíticos para análise de amostras de Extraíveis e Lixiviáveis. <sup>8</sup> .....	35
Figura 8:Exemplo da amostra com a tampa e da amostra com o frasco para 30 minutos.....	41
Figura 9: Exemplo da amostra com a tampa e da amostra com o frasco para 60 minutos.....	41



# Lista de Tabelas

Tabela 1: Dose diária aceitável para impureza individual (adaptação de <i>Broschard, T. H. et al</i> <sup>7</sup> ) .....	7
Tabela 2: Limite de preocupação associado com a via de administração em função da probabilidade de interação entre componente de embalagem e forma de dosagem <sup>8</sup> .....	8
Tabela 3: Identificação das categorias para elucidação da estrutura de extraíveis e lixiviáveis por GC-MS e LC-MS.....	19
Tabela 4: Lista de simuladores alimentares <sup>26</sup> .....	30
Tabela 5: Condições de ensaio normalizadas <sup>26</sup> .....	31
Tabela 6: Condições de ensaio alternativas <sup>26</sup> .....	32
Tabela 7: Lista de material em função do solvente de extração (adaptado do protocolo experimental do grupo de trabalho PQRI <sup>27,29</sup> ).....	34
Tabela 8: Método de extração em função do solvente de extração (adaptado do protocolo experimental do grupo de trabalho PQRI <sup>29</sup> ) .....	34
Tabela 9: Condições de teste e embalagens utilizadas .....	38
Tabela 10:Parâmetros de Sonicação .....	40
Tabela 11: Exemplo de Parâmetros Operacionais, Análise de GC dos Extratos. ....	42
Tabela 12:Resultados da Migração Global para a condição de 20 °C a 10 e 30 dias .	44
Tabela 13: Resultados da Migração Global para a condição de 40 °C a 10 e 30 dias	44
Tabela 14: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes no solvente n-Hexano .....	45
Tabela 15: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Branco de extração de Isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação .....	46
Tabela 16: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Branco de extração de Isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação.....	46
Tabela 17: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Frasco com isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação .....	47
Tabela 18: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Frasco com isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação .....	47

Tabela 19: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente a Tampa com isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação. ....	48
Tabela 20: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente a Tampa com isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação. ....	48
Tabela 21: Condições de incubação, meios de cultura, tempo e temperatura dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo .....	54
Tabela 22: Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo .....	56
Tabela 23: Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo .....	60
Tabela 24: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais .....	62
Tabela 25: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações orais .....	62
Tabela 26: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais .....	63
Tabela 27: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais .....	65
Tabela 28: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante nas preparações tópicas e locais (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior) .....	67
Tabela 29: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante nas preparações orais (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior).....	68
Tabela 30: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante da formulação cosmética (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior) .....	69
Tabela 31: Aeróbios totais, bactérias e fungos-leveduras (UFC) e Pesquisa de microrganismos específicos .....	69
Tabela 32: Contagens de UFC g <sup>-1</sup> de formulação e respetiva variação logarítmica (Δlog) tendo por referência a concentração do inóculo inicial na amostra; .....	70

Tabela 33: Composição quantitativa do frasco.....	75
Tabela 34: Composição quantitativa da tampa. ....	75
Tabela 35: Substâncias utilizadas no produto com os LME do Regulamento N° 10/2011, aplicado a 1 de maio de 2011. ....	76
Tabela 36: Substâncias usadas no produto e respetivo LME.....	76
Tabela 37: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 20°C durante 10 dias .....	80
Tabela 38: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 20°C durante 10 dias .....	81
Tabela 39: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 20 °C durante 30 dias .....	81
Tabela 40: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 20 °C durante 30 dias .....	82
Tabela 41: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 10 dias .....	82
Tabela 42: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 40 °C durante 10 dias .....	83
Tabela 43: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 30 dias .....	83
Tabela 44: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 30 dias .....	84



# Lista de Acrónimos

AET	Limite Analítico
BHA	Terc-Butil-4-hidroxianisolo
BHT	2,6-Di-terc-butil-p-cresol
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CCAH	Comité Científico da Alimentação Humana
CE	Comunidade Europeia
CFR	Código de Regulações Federais
CMR	Substâncias cancerígenas, mutagénicas, tóxicas para a reprodução
CoE	Conselho da Europa
CT	<i>Challenge Test</i>
Da	Dalton
DoC	Declaração de Conformidade
DMF	Dimetil fumarato
DPIs	Inaladores de pó seco
EN	Normas Europeias
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrometria de Massa
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICP-MS	Espetrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
IPA	2-propanol
ISO	Organização Internacional para Padronização
ITX	Isopropil tioxantono
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espetrometria de Massa
LDPE	Polietileno de Baixa Densidade
LME	Limite de Migração Específico
LME(T)	Limite de Migração Específico Total
LMG	Limite de Migração Global
LQ	Limite de Quantificação
MDIs	Inaladores de Dose Média
OCDE	Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico
OINDP	Medicamentos Nasais e Inalados Oralmente
OM	<i>Overall Migration</i> ou Migração Global
PC	Policarbonato
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>

PE	Polipropileno
PET	Politereftalato de Etileno
PP	Polietileno
PQRI	Instituto de Pesquisa em Qualidade de Produtos
PVC	Policloreto de Vinilo
QM	Qualidade Microbiológica
QMA	Quantidade Residual por Área superficial em contacto com o alimento
QT	Limite de Qualificação
SAR	Relação Estrutura-Atividade
SCCS	Comité Científico da Segurança dos Consumidores
SCT	Limite de Preocupação de Segurança
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SNIA	Substâncias Não Intencionalmente Adicionadas
TBBA	Tetrabromobisfenol A
TDI	Dose Diária Total
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1. Enquadramento do tema

Os desenvolvimentos tecnológicos e os avanços na área da ciência dos materiais permitiram a fabricação de plásticos com um conjunto de propriedades desejadas, que proporcionam uma reposição conveniente e com menos custos, para os materiais de embalagem tradicionais, como vidro ou o metal. Contudo, muitas das propriedades desejadas são alcançadas através de modificações. Na Figura 1, é possível verificar que as modificações são conseguidas através da adição de diferentes aditivos químicos que desempenham as funções de estabilizadores de UV, antioxidantes, plastificantes, agentes de vulcanização, entre outros. Muitos destes aditivos apresentam alta toxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade, mas mais relevante que estas características é que muitos não tem uma base de dados de avaliação toxicológica disponível, apesar de *Jenke et al*<sup>1,4</sup> ter tentado por várias vezes disponibilizar informação toxicológica para uma larga quantidade de compostos.<sup>5</sup>

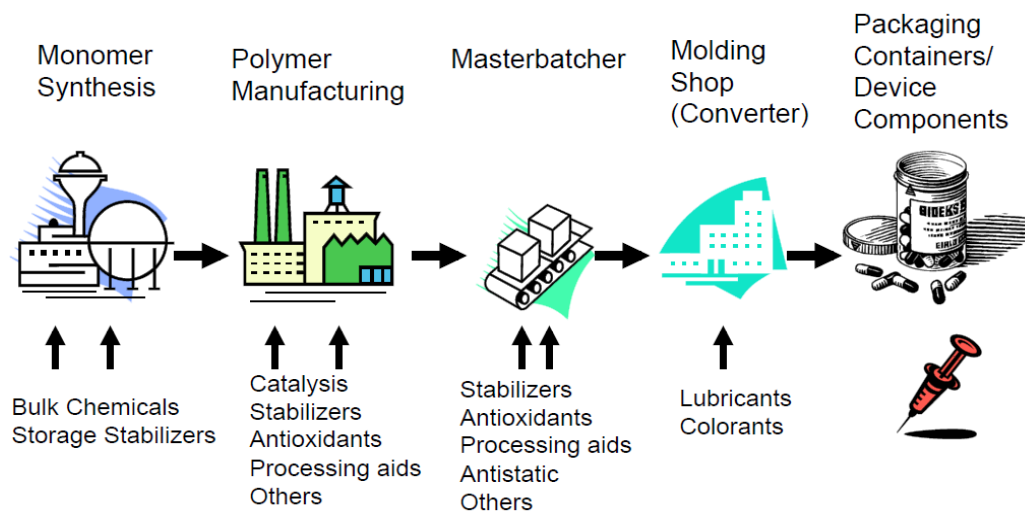


Figura 1: Caracterização de produtos extraíveis e lixiviáveis em produtos farmacêuticos de via parenteral.<sup>6</sup>

Nas embalagens, existem entidades orgânicas e inorgânicas que podem ser libertadas sob condições controladas de laboratório, conhecidas como extraíveis; e para além destas, existem os lixiviáveis, que são entidades químicas orgânicas e inorgânicas desconhecidas que

migram de um sistema para o produto, sob condições normais de armazenamento e uso.<sup>7</sup> Estas entidades, podem afetar o desempenho do produto farmacêutico, podendo também afetar a sua segurança.<sup>1</sup>

Para que as embalagens utilizadas na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética sejam de qualidade, é necessário ter em conta certos pontos de vista de desenvolvimento, fabricação, distribuição e venda de produtos. A *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* define 2 processos críticos como parte da estratégia de controlo de impurezas nos fármacos, a qualificação e a especificação. A qualificação está relacionada com o processo de aquisição e avaliação de dados que, estabelecem a segurança biológica de impurezas individuais ou de produtos de degradação. Termos como “avaliação de segurança” e “avaliação de risco” são usadas em geral, para descrever aspetos do processo de qualificação.<sup>7</sup>

É dado como exemplo de uma avaliação de riscos, pelos investigadores, a relação entre estrutura-atividade ou avaliação da literatura e avaliação da exposição. Estas avaliações podem ser realizadas em extraíveis de recipientes, ou em casos mais comuns, em lixiviáveis presentes nos produtos finais dos fármacos. Por outro lado, o processo de especificação destina-se ao estabelecimento de limites ou critérios de avaliação, de forma a controlar as impurezas ou produtos de degradação, nos fármacos finais, garantido assim a qualidade do produto e a segurança do paciente. A especificação consiste num conjunto de testes, referências, procedimentos analíticos e de critérios de aceitação apropriados para uma determinada substância ou fármaco.<sup>7</sup>

Torna-se determinante identificar e avaliar a segurança de compostos que possam migrar dos sistemas de fabricação e das embalagens para o produto final, ao longo do seu processo de fabrico e da sua vida útil, contaminando-o e por conseguinte, constituindo um potencial fator de risco para o consumidor.<sup>5,8</sup>

Os dados obtidos vão permitir uma avaliação toxicológica de todos os lixiviáveis encontrados, garantindo assim a segurança do paciente ou consumidor.<sup>8</sup>

De acordo com a FDA os recipientes de medicamentos devem respeitar certos fatores, estes estão representados resumidamente na Figura 2. Relativamente a proteção, a FDA afirma que um sistema de fecho ou embalagem deve fornecer a forma de dosagem com os fatores de proteção adequados, como por exemplo, deve proteger da temperatura e da luz, pois estes podem provocar a degradação da qualidade dos medicamentos durante a sua vida útil.<sup>9</sup>

Para o parâmetro da segurança, a FDA indica que os componentes da embalagem devem ser construídos com material que não lixivie substâncias em quantidades que sejam prejudiciais para o paciente, quando exposto ao medicamento.<sup>9</sup>

Em relação à compatibilidade, um sistema de embalagem que seja compatível com o medicamento, não deve interagir o suficiente de forma a causar alterações inaceitáveis na qualidade do medicamento ou nos componentes do recipiente.

Algumas das alterações são<sup>9</sup>:

- Perda do potencial devido à adsorção ou absorção do fármaco ativo;
- Perda do potencial devido à degradação da substância ativa do fármaco/medicamento, induzida por uma substância química que tenha lixiviado do sistema de embalagem;
- Redução da concentração de excipiente por consequência de fenômenos de adsorção, absorção ou de degradação induzida por lixiviação;
- Precipitação;
- Alterações no pH do fármaco/medicamento;
- Descoloração do fármaco/medicamento ou no recipiente;
- Aumento da fragilidade do componente da embalagem.

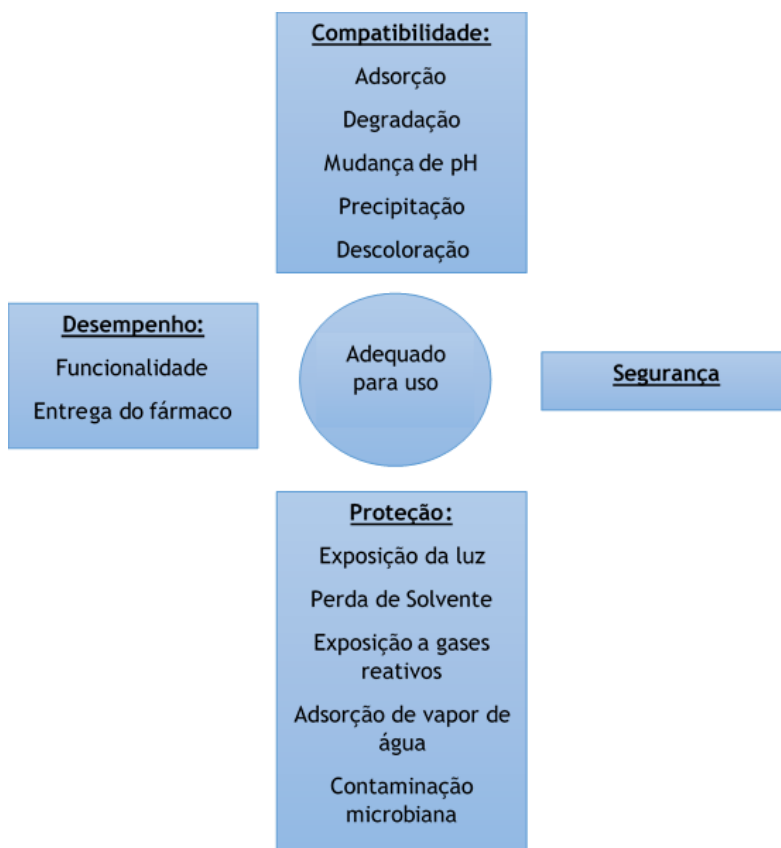


Figura 2: Fatores de conformidade para recipientes de medicamentos pela FDA.<sup>9</sup>

Por último e relativamente ao desempenho, este refere-se à capacidade da embalagem funcionar da forma para a qual foi projetada e são identificadas duas considerações principais por parte da FDA.<sup>9</sup>

A primeira, reflete o conceito de que, o sistema pode executar uma função diferente da óbvia, devido ao design ou à construção da embalagem. A segunda, refere-se à capacidade que a embalagem tem em fornecer o medicamento, na quantidade ou taxa, descrita no folheto informativo.<sup>9</sup>

Existem diferentes tipos de embalagens dependendo do tipo de plástico, como é possível observar na Figura 3. Nos termoplásticos, as moléculas são mantidas juntas por forças intermoleculares relativamente fracas, assim quando é exposto ao calor amolece e volta à sua condição original quando arrefece. A maior parte dos polímeros lineares e ligeiramente ramificados são termoplásticos. Os principais termoplásticos são produzidos por polimerização em cadeia. Os termofixos são caracterizados como fortes e duradouros. Não podem ser derretidos, de tal modo que não é possível alterar a fabricação. Contém aditivos adicionais para a obtenção de uma qualidade superior. Por último, os elastómeros são polímeros de borracha de cadeia longa, que possuem propriedade elástica.

Neste trabalho pretende-se estudar embalagens plásticas, sendo que tanto a tampa como a embalagem, pertencem à classe de plásticos termoplásticos semi-cristalinos.

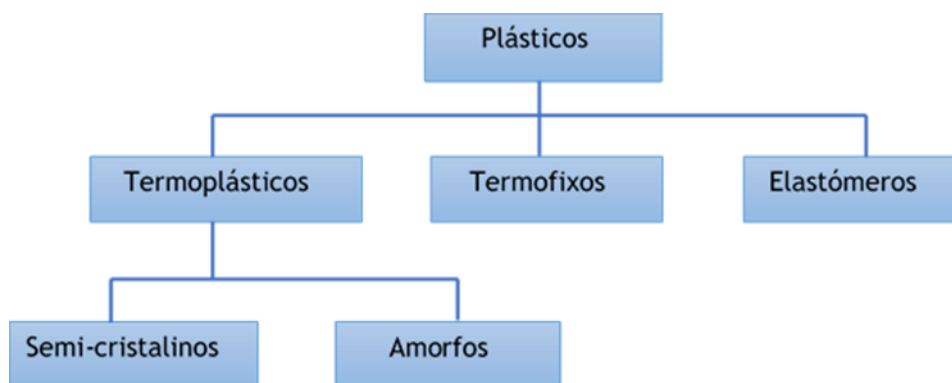


Figura 3: Tipos de plástico.<sup>10</sup>

### 1.1.1. Avaliação da compatibilidade de cosméticos com a embalagem primária

De acordo com a Diretiva de Cosméticos da União Europeia<sup>11</sup> entende-se que, cosmético é “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais”.<sup>11</sup>

Embora este tema seja considerado relevante em todo o sector farmacêutico, incluindo o dos produtos cosméticos, ainda se encontram por definir protocolos de estudos de ensaios de extraíveis e lixiviáveis adaptados para esta tipologia de produtos. Efetivamente e de acordo com o Regulamento 1223/2009<sup>12</sup> dos produtos cosméticos bem como a opinião do Comité Científico da Segurança dos Consumidores (SCCS)<sup>13</sup>, as embalagens comercializadas para o embalamento primário de produtos cosméticos devem evidenciar segurança com base no critério de “*Food grade*”, ou seja, de compatibilidade alimentar.

De tal modo que, a seleção do material para estes sistemas é frequentemente baseada nas recomendações dos fabricantes das embalagens, que confirmam estes de acordo com as normas alimentares.

Neste sentido, a avaliação de segurança desta tipologia de embalagens não foi ainda definida com base em critérios específicos e alinhados com as características físico-químicas de produtos cosméticos.

### **1.1.2. Extraíveis e lixiviáveis em medicamentos**

Qualquer ação que modifique a composição da formulação pode afetar negativamente o benefício terapêutico derivado do medicamento, direta ou indiretamente.

Uma dessas ações é o contacto que ocorre entre o produto e o sistema a que está associado, o que possibilita a ocorrência de interações entre o produto e os materiais de construção do sistema. Como resultado desta interação podem ocorrer mudanças significativas no produto, ou até mesmo no sistema, sendo esta última menos frequente. Uma mudança no produto farmacêutico pode-se manifestar de diferentes maneiras, mas na maioria dos casos, a principal causa da interação é a modificação da composição do produto. Esta alteração pode afetar a capacidade de produzir o resultado terapêutico desejado. As alterações na composição podem ser aditivas, como é o caso da acumulação de uma substância no produto farmacêutico, ou então podem ser redutivas, como é o caso da absorção de um ingrediente do produto farmacêutico pelo sistema. No caso da interação aditiva, a substância adicionada pode exercer uma influência indesejável, como por exemplo<sup>9</sup>:

- Redução na estabilidade do produto;
- Alteração do perfil de impureza do produto;
- Inativação de ingredientes ativos;
- Falha na adequação dos padrões de qualidade estabelecidos para o produto;
- Desenvolvimento de efeitos estéticos indesejáveis, como por exemplo, cheiro, sabor, descoloração;
- Aumento do risco para a saúde ou para o bem-estar do paciente;
- Interferência no teste do produto.

Existem dois aspetos a considerar relacionados com a interação reductiva. Caso o ingrediente perdido tenha sido a substância ativa do medicamento, então considera-se relevante para o seu uso a adaptabilidade, a potência e a eficiência do produto. Contudo, caso a perda seja de um excipiente (componente do produto que não produz o efeito terapêutico), deve-se ter em conta a estabilidade química e física do produto.<sup>9</sup>

Como forma de avaliar a compatibilidade do material com o medicamento ou com a substância ativa procede-se ao estudo de extraíveis e lixiviáveis. A extensão e a conceção destes estudos dependem, respetivamente do estado físico da substância ativa e da forma farmacêutica do medicamento. Para substâncias ativas sólidas e formas de dosagem sólidas, o risco de interação é baixo e geralmente não requer um estudo de interação entre o conteúdo e a embalagem. Para formas de dosagem sólidas destinadas a inalação ou ao uso parenteral, e a produtos liofilizados, pode ser necessário realizar estudos de interação entre o material de embalagem e os componentes da formulação. Quando são substâncias ativas não sólidas e formas farmacêuticas líquidas, o risco de interação requer estudos abrangentes e adequados especificamente para cada substância ativa ou formulação.<sup>14</sup>

Os estudos de extraíveis e lixiviáveis devem avaliar as características funcionais críticas do sistema de embalagem ou de entrega e assegurar que não ocorrem alterações significativas, de forma a evitar uma menor qualidade da substância ativa ou do medicamento. Estes estudos baseiam-se na exposição de uma amostra do material a um solvente apropriado, sob condições de stress, de forma a aumentar a taxa de extração. A natureza e a quantidade das substâncias extraídas devem ser listadas na especificação do material de embalagem.<sup>14</sup>

Assim, os principais pontos a serem considerados neste estudo são: o número de componentes e tipos de materiais que devem ser testados, e os solventes que devem ser usados nas extrações. As amostras que são estudadas, quanto aos lixiviáveis, incluem as espécies identificadas durante o estudo de extração e quaisquer novas espécies encontradas durante o estudo de lixiviáveis.<sup>8</sup>

Os estudos de migração durante o desenvolvimento das embalagens são necessários quando existe uma ou mais espécies de extraíveis resultantes dos estudos de extração. Nestas situações, deve ser demonstrado que, em condições representativas da utilização prevista, as substâncias não migrarão em quantidades que alterem a eficácia e a estabilidade da substância ativa ou do medicamento ou que apresentem um risco toxicológico. Os testes devem ser realizados em pelo menos um lote da substância ativa ou do medicamento, conforme apropriado.<sup>14</sup>

As impurezas elementares são analisadas e quantificadas por métodos analíticos, como por exemplo, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).<sup>8</sup>

Normalmente, a viabilidade do método só precisa de ser demonstrada antes de iniciar os estudos. Esta viabilização vai garantir que o produto farmacêutico, sob investigação, não provoca efeitos de matriz inibitória, e que os extraíveis poderão ser recuperados da matriz da amostra, evitando assim um novo estudo e consequentemente uma nova validação do método.<sup>8</sup>

Devem ser fornecidos dados toxicológicos para os extraíveis e lixiviáveis de todo o material plástico utilizado em sistemas de fecho de recipientes, para substâncias ativas ou medicamentos, dependendo do seu nível e da sua estrutura química. Poderão não ser necessários dados toxicológicos, caso o material plástico ou os aditivos utilizados estejam descritos na Farmacopeia Europeia, na Farmacopeia de um Estado-Membro ou se tiverem sido aprovados para a utilização em embalagens de alimentos. São necessárias informações toxicológicas para materiais plásticos não registados/publicados e para aditivos utilizados em sistemas de fecho de recipientes de medicamentos destinados à inalação, ou à administração parenteral ou oftálmica, mesmo quando estes são aprovados para o uso em embalagens de alimentos.<sup>14</sup>

Para que seja possível avaliar toxicologicamente os extraíveis e lixiviáveis, é necessário determinar o limite de preocupação de segurança (SCT) para o produto sob investigação. Dois fatores que têm um impacto significativo no SCT são: a via de administração e o grau de contato entre a embalagem e o produto.<sup>8</sup>

Uma dose diária total (TDI) de  $0,15 \mu\text{g dia}^{-1}$  é usada como o SCT para formas de dosagem de medicamentos nasais e inalados oralmente (OINDP) tal como indicado na Tabela 1, sendo consistente com a recomendação do grupo PQRI, que corresponde ao SCT de alto risco. Enquanto uma TDI de  $1,5 \mu\text{g dia}^{-1}$  é usado frequentemente para as formas parentais, oftálmicas e outras formas de dosagem, que corresponde ao SCT de baixo risco. Desta forma podem-se encontrar limites mais elevados, devidamente justificados em casos onde os medicamentos não são usados para usos crónicos, com base na orientação da norma ICH M7.<sup>7</sup>

Tabela 1: Dose diária aceitável para impureza individual (adaptação de *Broschard, T. H. et al*<sup>7</sup>)

Duração do tratamento	< 1 mês	>1-12 meses	>1-10 anos	>10 anos
Dose diária [ $\mu\text{g dia}^{-1}$ ]	120	20	10	1,5

Como se verifica na Tabela 2, para atribuir o risco de espécies lixiviáveis ao produto farmacêutico sob investigação, a *Food and Drug Administration* (FDA) desenvolveu a seguinte matriz: produtos farmacêuticos como aerossóis e injetáveis têm o maior risco associado, enquanto comprimidos e cápsulas orais têm o menor risco associado.<sup>8</sup>

Tabela 2: Limite de preocupação associado com a via de administração em função da probabilidade de interação entre componente de embalagem e forma de dosagem<sup>8</sup>

Limite de preocupação associado à via de administração	Probabilidade de interação entre o componente da embalagem e a forma de dosagem		
	Alto	Médio	Baixo
Mais elevado	Aerossóis e soluções de inalação Injeções e suspensões injetáveis	Pós esterilizados Pós de injeção Pós de inalação	--
Elevado	Soluções e suspensões oftálmicas Pomadas e adesivos transdérmicos Aerossóis e sprays nasais	--	--
Baixo	Soluções e suspensões tópicas Aerossóis tópicos e linguais Soluções e suspensões orais	Pós tópicos Pós-orais	Comprimidos orais Cápsulas orais Cápsulas de gelatina mole oral

### 1.1.3. Migração em materiais em contacto com os alimentos

A qualidade dos produtos alimentares está diretamente relacionada com fatores químicos, físicos e biológicos, que atuam no alimento durante o intervalo de tempo entre a sua produção e o consumo. De forma a manter a qualidade dos produtos alimentares, as embalagens devem possuir a capacidade de atuarem como barreira física de proteção para o produto, contra o contacto direto com o meio ambiente, de modo a evitar possíveis contaminações, manuseamentos inadequados e até perdas de características próprias do produto. Para além desta capacidade, a embalagem deve também ser resistente e evitar a cedência de elementos da sua composição (monómeros, aditivos, corantes, tintas de impressão e vernizes) ao alimento durante o processamento e/ou armazenamento do mesmo. O critério utilizado para garantir a segurança dos produtos alimentares embalados está relacionada com as interações entre a embalagem e o produto, durante o período anterior ao uso final pelo consumidor.<sup>15</sup> A preocupação relativa aos problemas tóxicos que resulta da

interação da embalagem com o alimento aumentou a partir do momento em que a população começou a ingerir mais alimentos embalados.<sup>15</sup>

Quando se trata de exposições a curto prazo, a migração de componentes da embalagem apresenta níveis baixos, de tal forma que não se observa qualquer resposta biológica. Porém, após longos períodos de ingestão de alimentos contaminados, poderão ocorrer manifestações tóxicas, sendo estas, às vezes de difícil detecção.<sup>15</sup>

A maior parte dos testes que são efetuados nas embalagens de alimentos são designados como testes de migração, e estes permitem avaliar a quantidade de substâncias que poderão migrar da embalagem para o alimento, podendo também permitir a determinação de algumas dessas substâncias. Desta forma, os testes de migração tentam simular, ao máximo, as condições às quais as embalagens e os alimentos poderão ser submetidos, em função do tipo de alimento, tempo de contacto e temperatura. Os estudos de migração devem avaliar a substância química que migrou da embalagem para o alimento, de forma qualitativa e quantitativa.<sup>15</sup>

## **1.2. Objetivos**

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um procedimento para avaliação de extraíveis e lixiviáveis presentes numa embalagem de produtos cosméticos. Para a implementação deste, recorreu-se a metodologias utilizadas habitualmente em embalagens alimentares e em embalagens de produtos farmacêuticos.

Como tal, foi necessário recorrer a uma revisão bibliográfica das principais normas usadas para a avaliação da migração em materiais em contacto com os alimentos, dos principais princípios e metodologias usadas em estudos de extraíveis e lixiviáveis em embalagens farmacêuticas.

O protocolo experimental foi baseado nos protocolos padrão utilizados em embalagens farmacêuticas e alimentares.

## **1.3. Estrutura da dissertação**

A presente dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos, os quais são descritos em seguida.

No Capítulo 1 é efetuado o enquadramento do tema, dando ênfase aos desenvolvimentos tecnológicos dos materiais e objetos de matéria plástica na indústria farmacêutica e na indústria alimentar. É também feita uma introdução aos estudos de extraíveis e lixiviáveis

efetuados na primeira e aos estudos de migração relativos à indústria alimentar. São mencionadas algumas características, formas de avaliação e critérios, finalizando com os objetivos do trabalho e a respetiva estrutura da dissertação.

No Capítulo 2, fez-se um desenvolvimento teórico, pormenorizado aos extraíveis e lixiviáveis das embalagens, e é feita uma abordagem aos seus limites de segurança em materiais e objetos em contacto com produtos farmacêuticos. Desenvolve-se ainda os estudos de migração efetuados em embalagens em contacto com alimentos. O desenvolvimento é realizado, tendo em conta as normas internacionais, onde são abordadas várias recomendações e pontos críticos a ter em consideração nestes estudos.

Os métodos analíticos e materiais utilizados na parte laboratorial, são descritos no Capítulo 3 desta tese. Inicialmente, estudou-se a embalagem tendo em conta as normas utilizadas nas embalagens em contacto com os alimentos. Desta forma, fez-se um estudo de migração global, no qual se estudou a quantidade de componentes que são transferidos do material em estudo para o solvente ou para o simulador alimentar. A segunda parte, consistiu no estudo de extraíveis na embalagem, ou seja, na identificação e avaliação dos compostos que são transferidos da embalagem, com recurso a técnicas analíticas. Assim, neste capítulo é feita uma compilação de métodos e condições usadas em estudos de migração em materiais e objetos em contacto com alimentos e estudos de extração em embalagens e materiais farmacêuticos.

O caso de estudo e a metodologia utilizada, encontra-se no Capítulo 4, onde é feita uma descrição das características da embalagem. Neste capítulo estão presentes os materiais e métodos utilizados na avaliação da migração global e do estudo de extraíveis. Também é feita uma breve análise dos resultados obtidos.

No capítulo 5, encontra-se as conclusões e perspetivas futuras onde estão incluídos os resultados e a discussão dos mesmos.

Por último, no capítulo 6, é realizada uma breve apresentação do trabalho desenvolvido na empresa *Health Products Research and Development, Lda*, durante o estágio.

## Capítulo 2

### Extraíveis e Lixiviáveis

#### 2.1. Conceitos

A FDA define extraíveis como compostos que podem ser extraídos de componentes plásticos, elastoméricos ou de revestimentos do recipiente e do sistema de fecho quando estão na presença de um solvente(s) apropriado(s), enquanto que os lixiviáveis são compostos que derivam de componentes elastoméricos, componentes plásticos ou de revestimentos do recipiente e do sistema de fecho, como resultado direto do contacto com a formulação.<sup>9</sup>

Em suma, os extraíveis são entidades químicas que derivam do recipiente e/ou dos componentes do dispositivo, sob condições laboratoriais; enquanto, os lixiviáveis são entidades químicas que derivam da embalagem e/ou dos componentes do dispositivo, sendo que estas pertencem ao produto final do medicamento, e sob condições de uso do paciente. Portanto, e como podemos observar na Figura 4, os lixiviáveis, podem ser um subconjunto de extraíveis ou podem estar correlacionados indiretamente com os mesmos, como por exemplo, através de reações químicas. Com isto, é possível afirmar que todos os extraíveis podem ser potenciais lixiviáveis.<sup>9</sup>

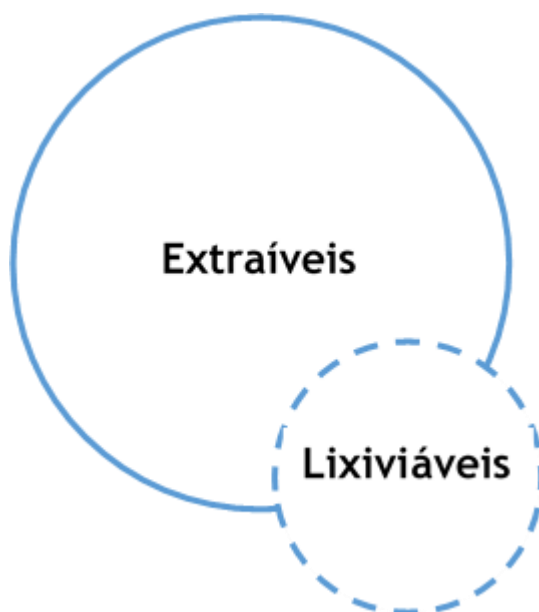


Figura 4:Relação entre extraíveis e lixiviáveis.<sup>9</sup>

Por norma os extraíveis não estão presentes no fármaco, pois existem barreiras físicas, como é o caso da embalagem primária e secundária, que impendem a migração destas entidades. O componente primário da embalagem, é um componente de embalagem que está em contacto direto ou pode vir a estar em contacto com o produto (por exemplo, o saco intravenoso). E o componente secundário da embalagem, é um componente que está em contacto direto com o componente primário da embalagem e que pode fornecer uma proteção adicional para o produto (ex. invólucro protetor para um saco intravenoso).<sup>9</sup>

Em geral, os extraíveis e lixiviáveis podem ser divididos nos seguintes grupos: não voláteis, voláteis e semi-voláteis, e inorgânicos/elementares.<sup>8</sup> Apresentam-se exemplos de fontes presentes nas embalagens que podem conter espécies lixiviáveis, segundo Alan Wood<sup>8</sup>, são os seguintes:

Fabricação:

- Filtros;
- Sacos de uso único;
- Tubo.

Componentes externos da embalagem primária:

- Sistema de fecho de containers (frascos, tampas);
- Sistemas de uso único (seringas e bolsas intravenosas).

Componentes internos da embalagem primária:

- Junta e anel *O-ring*;
- Válvulas;
- Molas.

Embalagem secundária e terciária:

- Etiquetas e adesivos;
- Tintas e corantes.

Segundo Alan Wood<sup>8</sup>, as espécies lixiviáveis que devem ser consideradas como parte de um estudo de extraíveis e lixiviáveis incluem:

- Antioxidantes e estabilizadores;
- Revestimentos anti estáticos;
- Lubrificantes, agentes deslizantes e emulsificadores;
- Tintas e corantes;
- Agentes vulcanizadores;
- Monómeros residuais, espécies poliméricas e oligoméricas;

- Ftalatos, nitrosaminas e hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs);
- Elementos tóxicos (mercúrio, chumbo, arsénico, cádmio).

De forma a permitir a avaliação da segurança de extraíveis e lixiviáveis, existem diversas etapas que devem ser seguidas. Na Figura 5, está representado um esquema onde é possível verificar quais são os parâmetros decisivos para um estudo de extração e lixiviação.

Por norma, podem ser realizados dois tipos de estudos. Um estudo relativo aos extraíveis, que avalia o perfil de extraíveis dos componentes usados na fabricação, armazenamento e na entrega dos fármacos. O outro relacionado com os lixiviáveis, que avalia as substâncias químicas que lixiviam para o produto, durante o processo de fabricação, armazenamento ou de entrega.<sup>7</sup>

A dimensão da realização destes estudos baseia-se no nível de risco associado aos componentes utilizados na fabricação da embalagem e à forma farmacêutica de um determinado produto. Em alguns casos, pode-se usar a qualificação de extraíveis para justificar a redução ou até mesmo a não realização de estudos de lixiviáveis.<sup>7</sup>

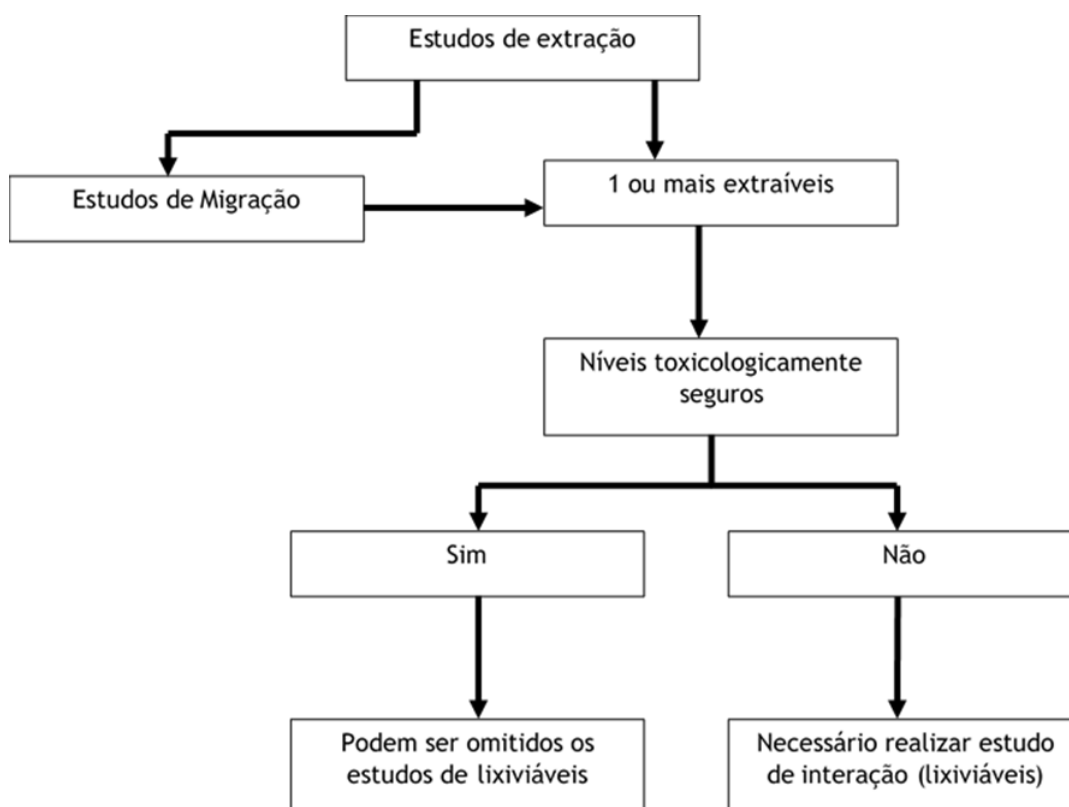


Figura 5: Esquema para os estudos de extração, adaptado da diretriz dos materiais plásticos para embalagens imediatas.<sup>16</sup>

## 2.2. Limites de segurança de extraíveis e lixiviáveis em embalagens farmacêuticas

Em setembro de 2006, o PQRI submeteu um relatório à FDA dos Estados Unidos, intitulado “*Safety Thresholds and Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and Nasal Drug Products*”, que disponibiliza um raciocínio científico e uma metodologia que permite identificar, quantificar e estabelecer a segurança de lixiviáveis e/ou extraíveis em OINDPs. Este relatório é o resultado da colaboração e do consenso entre cientistas da FDA e tem como foco, os OINDP, que incluem MDIs, DPIs, soluções de inalação, suspensões e sprays nasais. As recomendações deste relatório, vão desde a seleção de componentes, estudos de extração controlada, estudos de lixiviáveis, estudos de rotina de extraíveis e desenvolvimento e aplicação de um limite analítico (o AET), baseado no limite de segurança (o SCT).<sup>3</sup>

O SCT é o limite mínimo para o qual se considera que o extraível ou lixiviável apresenta uma concentração tão baixa considerando-se insignificante o nível de preocupação de segurança, no que diz respeito aos efeitos tóxicos carcinogénicos e não carcinogénicos e é universalmente aplicado a um extraível ou lixiviável não identificado. Assim, um composto que tenha um nível abaixo do SCT não precisa de ser identificado. O limite de qualificação (QT) é o limite mínimo de um certo extraível ou lixiviável conhecido ao qual a dose terá um impacto mínimo e aceitável de segurança, e o qual não será necessário ser considerado para a avaliação toxicológica, a não ser que este apresente uma relação estrutura-atividade (SAR) preocupante.<sup>7,17</sup>

Estes limites foram desenvolvidos com base no reconhecimento de que (i) os limites de segurança baseados na ciência aplicáveis a diferentes classes de produtos químicos podem de facto ser desenvolvidos e utilizados em outras configurações (por exemplo, contato com alimentos, e com o meio ambiente) e (ii) a tecnologia analítica atual permite a detecção de níveis vestigiais de químicos, da ordem do pico-grama.<sup>7</sup>

Os limites analíticos permitem orientar o usuário para que este saiba quais os compostos presentes no perfil lixiviável que devem ser considerados para avaliação química e do potencial de segurança. O SCT está, portanto, diretamente ligado ao AET, mas não é um limite de qualificação de segurança. O AET, é o oposto do QT, ou seja, é um limite de identificação para um extraível desconhecido. O objetivo do desenvolvimento do SCT foi com o intuito de ser aplicado como uma ferramenta para iniciar um processo de identificação e pesquisa.<sup>7</sup>

O AET para extraíveis, é determinado pela conversão do SCT de exposição diária, para quantidade por unidade. Tal pode ser feito através da configuração do fármaco, como por

exemplo, pode ser usada a dose máxima recomendada por dia. O valor resultante irá corresponder ao “AET Esperado”, o qual para o caso de extraíveis, é necessário ser ajustado, através de um fator de incerteza, de forma a conceber o “AET Final”. Este fator de incerteza tem em ponderação dois aspetos: a resposta analítica para cada composto, tendo em conta o método que irá depender da natureza do composto; e que não é possível determinar a concentração de cada composto individualmente no perfil, com os padrões de referência autênticos. O processo recomendado para a determinação do AET é o seguinte<sup>3</sup>:

- Conversão do SCT ( $0,15\mu\text{g dia}^{-1}$  para um lixiviável orgânico) para um AET Esperado (por exemplo,  $\mu\text{g}$  de vaselina por um lixiviável orgânico no MDI) tendo em conta a dose e outros parâmetros específicos;
- Conversão do AET Esperado de lixiviáveis para o AET Esperado de extraíveis (por exemplo,  $\mu\text{g g}^{-1}$  de elastómero para um extraível orgânico), tendo em consideração os parâmetros do recipiente;
- Localização do AET Esperado dentro de um perfil de extraíveis ou lixiviáveis, utilizando, por exemplo, como auxílio o cromatograma obtido por GC-MS de ionização;
- Avaliação da incerteza da técnica analítica;
- Conversão do AET Esperado para o AET Final.

Os limites baseados nas informações estruturais têm sido tipicamente desenvolvidos pelos princípios estabelecidos por *Cramer*. Com base nas relações quantitativas entre SRA, a classificação de *Cramer* é um processo que classifica os compostos em três classes<sup>1</sup>:

- Classe I: são estruturas químicas simples com modos eficientes de metabolismo, sugerindo um baixo grau de toxicidade;
- Classe II: são substâncias intermediárias às classes I e III;
- Classe III: correspondem às substâncias que não possuem indícios fortes de segurança, ou indicação positiva de toxicidade.

Assim, os extraíveis podem ser classificados em dois grupos, “extraíveis para os quais existem suficientes dados toxicológicos úteis e credíveis publicados, que permite realizar uma avaliação de segurança rigorosa”, e “aqueles extraíveis para os quais não existem dados toxicológicos suficientes e credíveis para realizar uma avaliação de segurança rigorosa”.<sup>1</sup>

A caracterização dos extraíveis e lixiviáveis destes materiais é necessária para a determinação da segurança dos medicamentos. Como forma de ajudar a caracterização, as diretrizes regulatórias incluem recomendações relativas à análise e avaliação da segurança toxicológica dessas substâncias.<sup>18</sup>

Contudo, existe pouca consistência na conceção e execução destes estudos e, embora sejam guiados pelos bons princípios gerais da ciência, ainda não se sabe quais são os princípios e as práticas que refletem e estabelecem bons métodos e processos científicos.<sup>18</sup>

## 2.3. Recomendações e pontos críticos em extraíveis e lixiviáveis de embalagens farmacêuticas

Um dos pontos críticos, que o grupo do PQRI referiu e que é de extrema importância, é que quando se realiza pela primeira vez um estudo sobre os extraíveis, pode-se ter uma ideia limitada do que procurar e quais as técnicas de extração e os métodos analíticos que devem ser usados para a identificação e avaliação de possíveis lixiviáveis. Isto porque, em alguns casos, o fornecedor do sistema de embalagem pode não fornecer toda a informação referente à composição e ao processamento da embalagem.

O grupo PQRI providenciou um exemplo geral de um processo de desenvolvimento farmacêutico que se encontra ilustrado na Figura 6. Vários aspetos deste fluxograma são importantes, em primeiro lugar, o selecionamento informado de materiais é uma parte crítica do processo de desenvolvimento. Quem for desenvolver OINDP deve entender, sempre que possível, a composição dos materiais e dos componentes do sistema de fecho de embalagem e estar ciente das preocupações de segurança representadas pelos potenciais lixiviáveis. De forma a obter o conhecimento da composição de materiais é necessário construir e manter relações fortes e eficazes de comunicação com os fornecedores de materiais e componentes.<sup>3,7</sup> Em segundo lugar, a Figura 6 mostra que o estabelecimento da segurança deve ser uma parte integral de cada estágio do processo, tendo início na seleção do material. A implicação de testes toxicológicos por técnicos especializados era, em tempos, um processo limitado para a avaliação e qualificação de lixiviáveis. O grupo de trabalho PQRI conclui, contudo, que as informações sobre a segurança devem começar a ser reunidas nos primeiros estágios e devem continuar integradas ao longo do processo. Esta abordagem irá permitir um conhecimento prévio das potenciais preocupações de segurança nos estágios de escolha de material e irá permitir que os fabricantes tomem decisões baseadas no conhecimento, em relação aos tipos de materiais a serem usados nos seus produtos. Essa abordagem irá também diminuir o risco potencial de preocupação de segurança em estágios tardios do desenvolvimento do produto.<sup>3</sup>

Em terceiro, a Figura 6 mostra os limites analíticos e de segurança que podem ser usados no processo de desenvolvimento farmacêutico, e que podem ser aplicados na avaliação da segurança de extraíveis e lixiviáveis. Por último, os estudos controlados de extração são de grande importância para o processo de desenvolvimento farmacêutico, pois permitem o conhecimento inicial de potenciais lixiviáveis, de preocupações de segurança e do estabelecimento de uma correlação de extraíveis e lixiviáveis, que pode ser usada para gerir a qualidade do produto final por via de testes de rotina de extraíveis com as especificações e critérios de aceitação apropriados.<sup>3</sup>

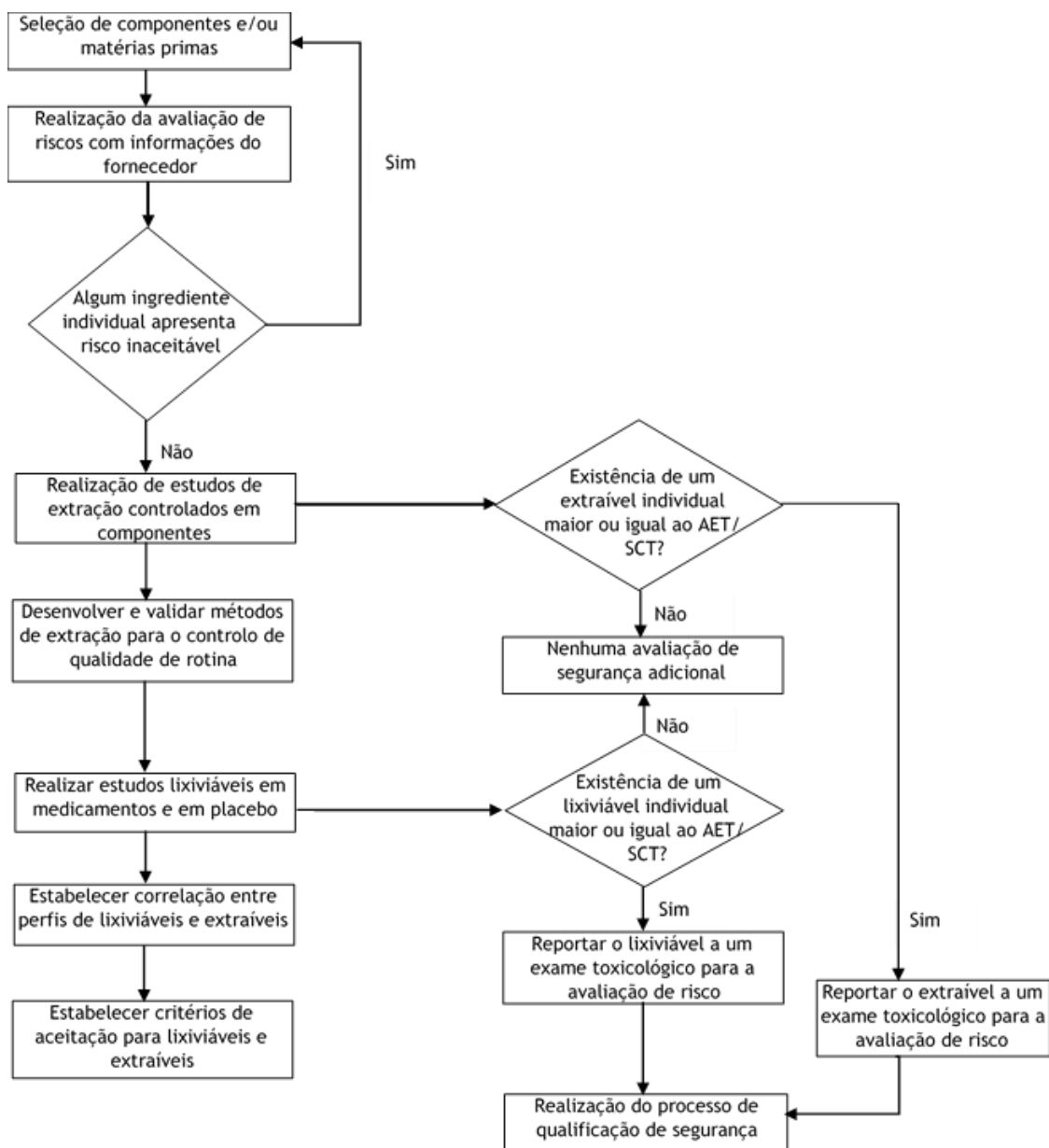


Figura 6: Processo de desenvolvimento farmacêutico para a avaliação de extraíveis e lixiviáveis em OINDP.<sup>3</sup>

O mesmo grupo de trabalho PQRI, realizou estudos de extração controlada baseados em protocolos e simularam estudos de lixiviação usando artigos de teste de elastómeros e de plástico, especialmente formulados e fabricados para uso deste grupo. Fizeram ainda a otimização e a validação dos métodos analíticos para os estudos quantitativos de extração controlada, e também recolheram e avaliaram os dados produzidos a partir dos estudos de extração e de lixiviação. Os detalhes do processo de desenvolvimento farmacêutico para lixiviáveis e extraíveis de OINDP são diferentes entre empresas. No entanto, o processo geralmente consiste na seleção de materiais para sistemas de embalagens, estudos de extração controlada, estudos de lixiviação, classificação da segurança de lixiviáveis, e às

vezes de extraíveis, e testes de rotina de extraíveis com estabelecimento de especificações e de critérios de aceitação para extraíveis e lixiviáveis. Dentro da seleção dos componentes dos sistemas de embalagem dos medicamentos OINDP, existem componentes de embalagem primária, que são definidos como aqueles que estão, ou podem estar, em direto contato com a formulação, e componentes de embalagem secundária, que são definidos como aqueles que não estão ou não estarão em contato direto com a formulação.<sup>3,7</sup>

Existem diversas e potenciais fontes de extraíveis e lixiviáveis para os OINDP, portanto, é crucial que uma equipa de desenvolvimento farmacêutico obtenha o máximo de informação sobre a composição e sobre os processos de fabricação para os componentes “críticos” do OINDP. Estes componentes “críticos” são definidos como sendo aqueles que estão em contato direto com a formulação, como por exemplo a boca do paciente, ou que possam afetar a funcionalidade do dispositivo. Dessa forma, os fabricantes devem trabalhar em estreita colaboração com os fornecedores dos componentes e das embalagens para alcançar o devido entendimento. Idealmente, os fornecedores, sob acordos, deverão compartilhar com os fabricantes os ingredientes específicos e as quantidades relativas desses mesmos ingredientes, nos componentes e nos materiais de embalagem. Esta troca de informações é extremamente importante, pois permite a avaliação antecipada de riscos sobre possíveis problemas de segurança.<sup>3</sup> Nesse sentido, as avaliações de segurança feitas durante a seleção de materiais, vão permitir aos fabricantes uma seleção de informação dos mesmos, baseada no risco para o uso nos medicamentos, no início do processo de desenvolvimento, diminuindo assim o risco das possíveis preocupações de segurança que possam aparecer no desenvolvimento ou até mesmo após a comercialização da embalagem. Para a realização dos testes, o grupo de trabalho teve à sua disponibilidade um elastómero processado com enxofre, dois elastómeros processados com peróxido e um polipropileno.<sup>3,7</sup>

Algumas das recomendações deste grupo, relativas às melhores práticas para os estudos de extração controlada de OINDP, são:

- Efetuar uma extração rigorosa com múltiplos solventes de polaridade variável;
- Incorporar múltiplas técnicas de extração;
- Incluir uma preparação cuidadosa da amostra com base no conhecimento das técnicas analíticas utilizadas;
- Utilizar múltiplas técnicas analíticas;
- Incluir um processo definido e sistemático para a identificação de extraíveis individuais;
- Otimizar as técnicas e os métodos de extração;
- Rever as informações do fornecedor que descrevem a formulação dos componentes;
- Devem ser baseados e guiados pelos limites AET dentro de um limite de risco de segurança aceite.

Como último passo no processo de identificação, os autores assinalam que se deve realizar uma comparação dos perfis dos produtos extraíveis, do estudo de extração controlada com as informações do fornecedor sobre os ingredientes dos componentes. Esta comparação permite a identificação dos extraíveis que podem ou não estar compreendidos nas informações do fornecedor; considerar se os métodos de extração e de análise são ou não apropriados para um certo material e; por último, permite entender se alguns dos compostos foram consumidos no processo de fabricação dos materiais.<sup>3,7</sup>

A Tabela 3 indica como é que os dados referentes à GC-MS e LC-MS, podem ser atribuídos às “Categorias de Identificação”. Esta identificação, que se encontra na Tabela 3 pode ser usada para designar termos descritivos como: confirmado, confiante ou experimental.<sup>3</sup>

Assim, uma identificação confirmada, significa que as categorias de identificação A, B (ou C) e D (ou E) foram atendidas. Uma identificação confiante, significa que existem dados suficientes para excluir todas, exceto as estruturas mais relacionadas. Uma identificação experimental, significa que os dados obtidos são consistentes apenas com uma das classes de molécula.<sup>3</sup>

Tabela 3: Identificação das categorias para elucidação da estrutura de extraíveis e lixiviáveis por GC-MS e LC-MS

Categoria	Dados de apoio à identificação
A	Comportamento relativo à fragmentação por espectrometria de massa
B	Confirmação do peso molecular
C	Confirmação da composição elementar
D	O espectro de massa corresponde à biblioteca automatizada ou ao espectro da literatura
E	O espectro de massa e o índice de retenção cromatográfica correspondem à amostra genuína

## 2.4. Regulamentação e limites relacionados com as embalagens em contacto com alimentos

Ao longo dos anos, têm sido estabelecidos limites de migração para muitas substâncias na área dos materiais em contacto com os alimentos, com o objetivo de controlar a exposição a estas substâncias e de proteger a saúde humana. Estes limites, têm como base a avaliação do risco toxicológico dessas substâncias e estão abrangidos nos regulamentos dos materiais em contacto com os alimentos.<sup>19</sup>

Para a realização deste trabalho foram analisadas as seguintes normas:

- EN13130-1:2004<sup>20</sup>, descreve os métodos utilizados para a determinação da migração específica de substâncias do plástico para os alimentos ou para os simuladores alimentares;
- EN1186-9:2002<sup>21</sup>, descreve os métodos de teste para a migração global em simuladores aquosos por enchimento do material;
- O Regulamento (UE) N° 10/2011 da Comissão<sup>19</sup>, introduz regras separadas para as condições de teste migração global e migração específica.

É necessário realçar que as normas estipuladas no Regulamento (UE) N° 10/2011 substituem as regras referidas nas normas EN13130-1:2004, publicada em 2004, e a EN1186-3:2002, publicada em 2002. Além disso, há legislação mais recentes e transicionais, sendo que o regulamento de 2018/831 apresenta as últimas alterações, tais como, adições à lista de substâncias autorizadas, que se encontram em vigor até 26 de junho de 2019. Após esta data, irá sair um novo regulamento com a atualização dos materiais em contacto com os alimentos.<sup>22</sup>

Em suma, uma das primeiras regulamentações a ser concebida foi a norma 1935/2004, tendo sido depois elaborados Regulamentos específicos de acordo com cada material usado em contacto com os alimentos, como por exemplo, normas relativas a cerâmica, ao plástico reciclado, a celulose regenerada, entre outros. Sendo que nesta dissertação apenas é revista a regulação relativa aos plásticos, ou seja o Regulamento (UE) N° 10/2011 da Comissão.<sup>22</sup>

O Regulamento 1935/2004 é aplicável a todos os materiais de contacto com os alimentos, incluindo materiais de empacotamento, utensílios de cozinha e equipamentos utilizados na indústria de processamento da comida.<sup>22</sup> É aplicável para todos os materiais regularizados e não regularizados a nível europeu: plásticos, papel e cartão, vidro, metais, cerâmicos, etc. Dentro deste Regulamento, o Artigo 3 é o mais relevante, pois afirma que todos os materiais e artigos devem ser fabricados de acordo com as Boas Práticas de Fabrico, de tal modo, que não ocorrerá transferência de substâncias para os alimentos em condições normais ou previsíveis de uso. A transferência de substâncias pode provocar alterações na composição dos alimentos, nomeadamente nas características organolépticas e pode colocar a saúde humana em risco.<sup>22,23</sup>

As normas presentes no Regulamento (UE) N° 10/2011 da Comissão, abrangem as seguintes categorias de materiais<sup>19</sup>:

- Materiais constituídos exclusivamente por matéria plástica;
- Materiais compostos por várias camadas plásticas (multicamadas) unidas por adesivos ou por outros meios;

- Camadas ou revestimentos de plástico, que formam juntas em tampas ou rolhas, que constituem duas ou mais camadas de diferentes tipos de materiais;
- Camadas de plástico em materiais de multimateriais multicamadas.

Os materiais também podem ter revestimento e/ou impressão, sendo que a camada de tinta ou de revestimento deve ser tida em conta na migração, de forma a cumprir os requisitos da norma (UE) N° 10/2011 e 1935/2004.<sup>22</sup>

As substâncias autorizadas e listadas (mais de 900 substâncias) no Regulamento (UE) N° 10/2011 são<sup>19</sup>:

- Monómeros e outras substâncias iniciadoras;
- Aditivos, exceto corantes;
- Adjuvantes de polimerização, exceto solventes;
- Macromoléculas obtidas por fermentação microbiana;
- Metais selecionados, que estão descritos no Anexo II do Regulamento (UE) N° 10/2011.

Algumas das substâncias autorizadas, mas não listadas<sup>19</sup>:

- Adjuvantes de polimerização;
- Corantes e solventes no fabrico de camadas de plástico;
- Sais de alumínio, amónio, bário, entre outros;
- Fenóis ou álcoois autorizados;
- Misturas de substâncias que estão autorizadas, das quais não ocorrem reações químicas entre os componentes;
- Substâncias poliméricas naturais ou sintéticas de peso molecular superior a 1000Da, exceto macromoléculas obtidas por fermentação microbiana, usadas como aditivos;
- Substâncias não intencionalmente adicionadas.

Estas substâncias são autorizadas, uma vez que<sup>22</sup>:

- São adicionadas durante o processamento;
- Normalmente não se encontram na embalagem final;
- Não são carcinogénicas, mutagénicas nem tóxicas para a reprodução.

Contudo, pode ocorrer adição inesperada de certas substâncias. Estas, são descritas na norma como substâncias não intencionalmente adicionadas (SNIA) e são em geral <sup>22</sup>:

- Impurezas;
- Contaminantes;
- Intermediários;
- Produtos de degradação.

O potencial risco para a saúde advém da migração, que corresponde à transferência de substâncias químicas para os alimentos a partir do material plástico em contacto com os alimentos. De acordo com o Regulamento (UE) N° 10/2011 existem dois tipos de migração: a migração global e a migração específica.<sup>19</sup>

Para a migração global existe o limite de migração global (LMG) que corresponde à quantidade de substâncias não voláteis que são libertadas de um material para o alimento ou para o simulador alimentar. O LMG corresponde à medição da inércia de um material plástico.<sup>19</sup>

Relativamente ao valor do LMG, o Regulamento afirma que é possível fabricar materiais plásticos que não libertem mais de 10 mg de substâncias por dm<sup>2</sup> de área superficial do material plástico, seguindo as boas práticas de fabrico. Caso a avaliação de riscos de uma determinada substância não indique nenhum nível inferior a este, este deverá ser o limite genérico para a inércia de um material plástico (LMG).<sup>19</sup>

De forma a obter resultados que sejam comparáveis na verificação do cumprimento do LMG, os ensaios necessitam de ser realizados em condições normalizadas, ou seja, é necessário que condições como o tempo de ensaio, temperatura e o meio de ensaio (simulador alimentar) representem as condições de utilização previsíveis mais desfavoráveis do material ou objeto de matéria plástica.<sup>19</sup>

Para a migração específica existem dois limites, o limite de migração específico (LME) e o limite de migração específica total (LME(T)). O LME corresponde à quantidade de uma determinada substância libertada de um material ou objeto para os alimentos ou para os simuladores alimentares, sendo que essa quantidade é a quantidade máxima para a qual a substância não irá constituir um risco para a saúde. A avaliação e identificação das substâncias é realizada com recurso a técnicas analíticas em alimentos ou em simuladores de alimentos. São listadas substâncias individuais, com limites baseados na avaliação toxicológica.<sup>19,22</sup> E o LME(T) corresponde ao valor máximo permitido para a soma de substâncias específicas que são libertadas para os alimentos ou para os simuladores alimentares, sendo expresso como o total do grupo de substâncias.<sup>19</sup>

Além desses limites também há a Quantidade Residual por Área superficial em contacto com o alimento (QMA), e para algumas substâncias específicas existem valores tabelados.<sup>22</sup>

O Regulamento também afirma que, o LMG de 10 mg dm<sup>-2</sup> para uma embalagem cúbica que contém 1 kg de alimento, resulta numa migração de 60 mg por kg de alimento. Para embalagens pequenas em que o rácio superfície/volume é maior, a migração irá ser mais elevada. De forma a verificar a mesma proteção às embalagens de pequeno e de grande volume, é necessário ter em conta casos especiais no que diz respeito aos lactentes e às crianças, uma vez que o consumo de alimentos por kg de peso corporal é superior ao dos adultos, visto que a sua alimentação não é tão diversificada. Contudo, o Regulamento afirma

que para os materiais destinados a embalar alimentos para lactentes e crianças, o LMG deve estar ligado ao limite nos alimentos e não à superfície de embalagem.<sup>19</sup>

Em derrogação ao disposto no Regulamento (UE) N° 10/2011, os materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com alimentos para lactentes e crianças jovens, como definidos nas Diretivas 2006/141/CE<sup>24</sup> e 2006/125/CE<sup>25</sup> da Comissão, não devem ceder os seus constituintes aos simuladores alimentares em quantidades superiores a 60 miligramas de constituintes totais por quilograma de simulador alimentar.

Concluindo, para a fixação de limites de migração recorre-se ao pressuposto convencional de que uma pessoa com um peso corporal de 60 kg consome diariamente 1 kg de alimentos e que esses alimentos estão embalados num recipiente cúbico com 6 dm<sup>2</sup> de área superficial que libertam a substância. Para os recipientes que sejam muito pequenos ou muito grandes existe uma grande divergência entre a área superficial e o volume de alimentos embalados do pressuposto convencional; de tal modo que, a respetiva área superficial deverá ser normalizada antes de ser realizada a comparação dos resultados dos ensaios com os limites de migração. A partir do momento em que estejam disponíveis novos dados sobre as utilizações de embalagens para alimentos, estas normas deverão ser revistas.<sup>19</sup>

Em relação ao pressuposto convencional, de que uma pessoa consome diariamente 1 kg de alimentos, deve-se ter em atenção que cada pessoa ingere no máximo 200 g de gordura por dia. Como tal, é necessário corrigir a migração no que diz respeito às substâncias lipofílicas, que apenas migram para a gordura. Esta correção de migração específica apresenta um fator de correção aplicável às substâncias lipofílicas, em conformidade com os pareceres do Comité Científico da Alimentação Humana e da Autoridade.<sup>19</sup>

## **2.5. Recomendações no estudo de migração em embalagens em contacto com alimentos**

A diretiva 2002/72/CE aplica-se a materiais e objetos constituídos exclusivamente de matéria plástica, e às juntas de plástico para as tampas, sendo que estas eram as principais utilizações dos plásticos no mercado no passado. Todavia, na atualidade são utilizados plásticos em combinação com outros materiais, sendo estes designados por materiais multicamadas.<sup>19</sup>

Portanto, os materiais e objetos de matéria plástica podem ser compostos por diferentes camadas plásticas unidas por adesivos. Podem também, estar impressos ou revestidos por um revestimento orgânico ou inorgânico. Contudo, os adesivos, o revestimento e as tintas de impressão, não são compostas pelas mesmas substâncias que os plásticos, logo devem ser adotadas medidas específicas para estes. O principal componente estrutural dos plásticos é um polímero, este é obtido através da reação química entre monómeros e outras substâncias

iniciadoras. Muitas vezes, de forma a alcançar as características específicas desejadas, são adicionados aditivos ao polímero.

O Regulamento afirma que, uma vez que substâncias com peso molecular superior a 1000 Da não costumam ser absorvidas pelo organismo e visto que, o polímero é uma estrutura que apresenta alto peso molecular, este apresentará um potencial de risco mínimo para a saúde. Assim, os potenciais riscos para a saúde resultam das substâncias iniciadoras que não reagiram ou que reagiram incompletamente, ou então de aditivos de baixo peso molecular que podem ser transferidos para os alimentos por migração a partir do material plástico em contacto com os alimentos. Portanto, estas substâncias devem ser submetidas a uma avaliação de riscos e devem ser autorizadas antes de serem utilizadas no fabrico dos materiais e objetos de matéria plástica.<sup>19</sup>

Os plásticos podem ser fabricados a partir de outro tipo de reações químicas, como é o caso da reação entre estruturas macromoleculares naturais ou sintéticas e outras substâncias iniciadoras, dando origem a uma macromolécula modificada. Para esta reação são utilizadas estruturas intermédias que não polimerizam na totalidade, tal como macromoléculas sintéticas. Tal como no caso anterior, os potenciais riscos para a saúde têm origem na migração de outras substâncias iniciadoras que são utilizadas para a modificação da macromolécula, que não reagiram ou reagiram incompletamente, ou então de uma macromolécula que não reagiu na totalidade. Novamente, devem ser avaliados os riscos que poderão resultar destas substâncias iniciadoras, das macromoléculas utilizadas no fabrico de macromoléculas modificadas, de forma a serem autorizados antes da sua eventual utilização no fabrico de materiais e objetos plásticos.<sup>19</sup>

Por último, os plásticos também podem ser produzidos por microrganismos, através de processos de fermentação destes e de substâncias iniciadores, sendo possível criar estruturas macromoleculares. Após este processo, a macromolécula é libertada para um meio ou extraída. Novamente os potenciais riscos estão associados a migração de substâncias iniciadoras que não reagiram ou que reagiram incompletamente, aos produtos intermédios ou subprodutos do processo de fermentação. Neste caso específico, o produto final deverá ser avaliado antes de ser autorizado para a utilização no fabrico de materiais e objetos plásticos. Em certos casos, os polímeros podem ser usados como aditivos, com o objetivo de alcançar certas características desejadas. Caso o aditivo polimérico seja idêntico a um polímero que constitua o componente principal de um material plástico, pode-se considerar o risco como avaliado, caso os monómeros já tenham sido avaliados e autorizados. Pelo contrário, não se pode considerar como avaliado o risco do aditivo nos casos em que um aditivo deste tipo não seja idêntico a um polímero que constitua o componente principal de um material plástico. Nessas situações, é necessário avaliar os riscos do aditivo polimérico

no que diz respeito à fração com peso molecular inferior a 1000 Da, tendo este de ser autorizado antes da sua utilização no fabrico de materiais e objetos plásticos.<sup>19</sup>

Também são usadas substâncias para iniciar o processo (por exemplo, catalisadores) e controlar reações de polimerização (por exemplo, reagentes para a transferência de cadeias) no fabrico de polímeros. Estes auxiliares possuem duas características principais, são utilizados em baixas quantidades e não são esperadas no polímero final, portanto não deveriam ficar sujeitos ao processo de autorização, sendo que os possíveis potenciais riscos para a saúde devem ser avaliados pelo fabricante, em conformidade com os princípios científicos reconhecidos internacionalmente da avaliação de riscos.<sup>19</sup>

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos materiais de matéria plástica constituídos por combinações de até quinze camadas de plásticos diferentes, com o objetivo de otimizar a funcionalidade e a proteção dos alimentos, reduzindo em simultâneo os resíduos das embalagens destinadas a entrar em contacto com alimentos. Neste tipo de materiais multicamadas, as camadas poderão estar separadas dos alimentos através de uma barreira funcional. Esta barreira, impede a migração de substâncias que se encontram atrás da barreira para os alimentos. Portanto, podem ser utilizadas substâncias que não estão autorizadas atrás desta barreira, desde que sejam cumpridos determinados critérios e que a sua migração esteja abaixo de um limite de deteção específico. Deve-se estabelecer um nível máximo de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> nos alimentos para a migração de uma substância não autorizada através da barreira funcional, tendo em conta os casos especiais dos alimentos (como é o caso dos lactentes) e a ampla tolerância analítica para a análise da migração. Contudo, é de realçar que, as substâncias que não devem ser usadas em materiais em contacto com os alimentos sem serem previamente autorizadas, como no caso de substâncias mutagénicas, cancerígenas ou tóxicas, também não poderão ser usadas atrás da barreira funcional. Assim como todas e quaisquer substâncias ou novas tecnologias (como é o caso das nanopartículas) não devem ser usadas atrás da barreira funcional, antes de primeiro serem avaliadas caso a caso no que diz respeito ao potencial risco para a saúde. Dado que estas camadas de plástico, estão combinadas com outros materiais para os quais ainda não existem medidas específicas, não é ainda possível estabelecer requisitos para os materiais e objetos multimateriais multicamadas finais na UE. Como tal, o Regulamento não recomenda a aplicação de limites de migração específicos nem um LMG, com a exceção do cloreto de vinilo monómero, para o qual já existem restrições. O Regulamento conclui que os Estados-Membros podem manter ou adotar disposições nacionais para estes materiais, quando não existem medidas específicas que incluam a totalidade do material ou objeto multimateriais multicamadas, desde que cumpram as regras do Regulamento.<sup>19</sup>

Como no caso das embalagens de produtos farmacêuticos, deve ser disponibilizada às autoridades competentes, documentação de apoio em cada fase de fabricação, que confirme

a declaração de conformidade. A demonstração de conformidade pode ser baseada no ensaio de migração, mas uma vez que estes ensaios são complexos, dispendiosos e demorados, o Regulamento aconselha o uso de cálculos, incluindo a modelização e outras análises, assim como provas ou fundamentações científicas, caso os respetivos resultados sejam tão rigorosos quanto os resultados do ensaio de migração. Estes resultados serão válidos enquanto as formulações e as condições de transformação forem constantes.<sup>19</sup>

Quando se realiza ensaios em objetos como películas ou tampas, que ainda não estão em contacto com os alimentos, pode não ser possível determinar a área superficial que está em contacto com um determinado volume definido de alimentos. Como tal, devem ser estabelecidas regras específicas para a verificação da conformidade destes. De forma a verificar a conformidade em determinadas condições, deve ser permitido a utilização de métodos de determinação por aproximação, sendo que a não conformidade de um determinado material ou objeto deve ser confirmada por um método de verificação.<sup>19</sup>

Poderá ser necessário que o operador da empresa avalie o cumprimento de certas substâncias presentes em plásticos, que não constem no Anexo I do Regulamento (UE) N° 10/2011<sup>19</sup>, em conformidade com os princípios científicos que estão reconhecidos internacionalmente. Sendo que este cumprimento é referente ao Artigo 3 do Regulamento (CE) N° 1935/2004<sup>23</sup>, o qual faz referência às boas práticas de fabrico, ou seja, todos os materiais e objetos deverão ser fabricados de tal modo que não ocorra migração dos seus constituintes para os alimentos, em quantidades que possam representar um perigo para a saúde, provocar alterações inadmissíveis nas composições dos alimentos e/ou provocar deterioração das características organolépticas do alimento.<sup>19</sup> Certas regras dos ensaios de migração deverão ser atualizadas à medida que ocorram novas descobertas científicas. Para tal, as autoridades responsáveis pelo controlo do cumprimento e a indústria deverão adaptar os ensaios conforme as novas regras. De forma a permitir esta adaptação, foi estipulado que as regras atualizadas só serão aplicadas a fim de dois anos após a adoção do Regulamento.<sup>19</sup>

De forma a demonstrar o cumprimento dos limites de migração é necessário realizar ensaios nos materiais em contacto com alimentos. Os testes devem ser realizados com a embalagem em contacto com o alimento, contudo, esta abordagem é pouco prática, pois, a concentração das substâncias que migram é em geral baixa e muitas vezes a complexidade dos alimentos pode interferir na quantificação da migração. Devido a esta impossibilidade, utilizam-se simuladores alimentares que funcionam como um meio de ensaio representativo dos alimentos, sendo assim possível reproduzir a migração a partir dos materiais em contacto com os alimentos. Os ensaios devem ser efetuados em condições de ensaio padrão, no que diz respeito ao tempo e à temperatura de ensaio, que representam as piores condições de utilização do material em estudo.<sup>19</sup>

Concluindo, para que seja possível provar que um material em contacto com os alimentos cumpra os requisitos é preciso seguir os seguintes passos<sup>22</sup>:

- Deve ser reunida uma lista completa de todas as substâncias que são usadas na produção do material de contacto com os alimentos;
- Deve ser revista a Declaração de Conformidade (DoC) do fornecedor;
- É necessário identificar se as substâncias do material podem ser usadas, e para tal é necessário verificar as listas de substâncias autorizadas e as possíveis limitações de uso aplicáveis;
- É necessário determinar quais são as condições de contacto do material com o alimento. Sendo estas as seguintes, qual ou quais são os tipos de alimentos que vão estar em contacto com o material e quais são as condições de tempo e temperatura durante o uso deste material.

De seguida é necessário a elaboração de um protocolo de conformidade para o material. Este pode ser composto por testes de migração, cálculo e modelação do pior cenário possível, estudo de substâncias não intencionalmente adicionadas e estudos toxicológicos.<sup>22</sup>

Por último, deve-se demonstrar a conformidade das embalagens alimentares de acordo com parâmetros da *Good Manufacturing Practice* (GMP).<sup>22</sup>

## 2.6. Análise Toxicológica

Após a conclusão do estudo de caracterização de extraíveis ou de um estudo de lixiviáveis, é criada uma lista de substâncias químicas identificadas, como por exemplo, um perfil de extraíveis ou lixiviáveis. De acordo com a metodologia proposta pelo grupo PQRI, qualquer composto acima do AET deve ser identificado e descrito a um toxicologista para a avaliação específica do produto. O AET pode ser determinado a partir de situações que podem incluir a população de pacientes (por exemplo, adulto e obeso), administração da rota (por exemplo, inalação), duração do tratamento (por exemplo, crónico), configuração da dose (por exemplo, massa ou volume da formulação) e duração prevista de uso (por exemplo, periódico ou uma só vez).<sup>7</sup>

Um perfil toxicológico de uma substância inclui informações sobre<sup>7</sup>:

- Toxicidade sistémica após administrações únicas e repetidas;
- Tolerância local, incluindo uma potencial irritação e sensibilização da pele;
- Toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento;
- Genotoxicidade/mutagenicidade;
- Carcinogenicidade;
- Toxicocinética.



# Capítulo 3

## Metodologia

### 3.1. Migração global

Para a realização deste ensaio foram revistos protocolos e normas relativos ao estudo da migração global em embalagens de produtos farmacêuticos e embalagens em contacto com alimentos. Como tal, um dos primeiros passos foi decidir a abordagem de teste conforme o material/embalagem em estudo. De acordo com as referências relativas às embalagens em contacto com os alimentos, existem quatro métodos, o método de exposição por enchimento, o método de imersão total, exposição numa célula e exposição numa bolsa.<sup>20</sup>

Conforme a norma EN13130-1:2004<sup>20</sup>, o método de exposição numa célula é utilizado quando o plástico apresenta uma forma plana, como por exemplo em camada fina. O rácio de superfície por volume de certas células (célula do tipo A) é convencionalmente 6 dm<sup>2</sup> de área de contacto com a comida por 1000 mL de simulador alimentar. Este método tem a vantagem de reproduzir facilmente a geometria da amostra. O método de exposição numa bolsa é utilizado em plásticos em forma de saco. O rácio de superfície por volume é convencionalmente 2 dm<sup>2</sup> de área de contacto com a comida por 100 mL de simulador alimentar. O método de exposição por enchimento é utilizado em materiais em forma de contentores, como por exemplo garrafas e tabuleiros. No entanto, este método deixa de ser prático quando se estuda materiais com grandes volumes, nestes casos poderá ser utilizado materiais em forma de contentores de menor volume. Por último, o método de imersão total, é o método que apresenta a maior diferença de todos, pois não possui restrições em relação ao material ou objeto em estudo, contudo é um método mais complicado que os restantes, uma vez que ambas as fases de superfície do material irão estar em contacto com o solvente/simulador alimentar, mas apenas a área de superfície da fase em contacto com o alimento, será utilizada para o cálculo da migração. No entanto, em casos em que o material ou objeto é simétrico é possível demonstrar que o cálculo de ambas é viável.<sup>20</sup>

Como segundo passo, procedeu-se a escolha de simulador alimentar e das respetivas condições de uso. Os solventes de extração devem ser apropriados para as formas de dosagem e para os materiais que estão a ser avaliados. Estes, devem de fornecer o pior perfil possível de lixiviáveis para a formulação do medicamento sem a degradação do material. São muitas vezes utilizados múltiplos solventes, sendo um dos solventes o mesmo ou semelhante à

formulação do produto farmacêutico.<sup>3</sup> É desaconselhado usar solventes demasiado poderosos, pois estes podem destruir os materiais dos componentes, criando um falso conjunto de produtos extraíveis.<sup>8</sup> Estas regras também são válidas e tidas em conta para a migração específica.

Nos casos em que se trata de materiais e objetos em contacto com alimentos, os simuladores são selecionados conforme o tipo de alimento<sup>19</sup>:

- Os simuladores alimentares A, B e C são atribuídos aos alimentos com carácter hidrofílico e que podem extrair substâncias hidrofílicas;
- O simulador alimentar B deve ser utilizado para os alimentos com pH inferior a 4,5;
- O simulador alimentar C substitui os alimentos alcoólicos com um teor de álcool até 20% bem como os alimentos com um teor importante de ingredientes orgânicos que os tornam mais lipofílicos;
- Os simuladores alimentares D1 e D2 são utilizados para alimentos com carácter lipofílico e que podem extrair substâncias lipofílicas;
- O simulador alimentar D1 deve ser usado para alimentos alcoólicos com um teor de álcool superior a 20 % e para emulsões de óleo em água;
- O simulador alimentar D2 usa-se para alimentos que contêm gorduras livres à superfície. O simulador alimentar E destina-se aos ensaios de migração específica para alimentos secos.

Contudo, é importante clarificar que os simuladores utilizados no Regulamento (UE) N° 10/2011 sofreram alterações em termos de caracterização, sendo que são utilizados os simuladores apresentados na Tabela 4 do Regulamento (UE) 2016/1416 da Comissão de 24 de agosto de 2016<sup>26</sup> que altera e retifica, apesar de que o que foi dito anteriormente em relação ao tipo de alimento e simulador ainda se encontra válido.

Tabela 4: Lista de simuladores alimentares<sup>26</sup>

Simulador alimentar	Abreviatura
Etanol a 10% (v/v)	Simulador alimentar A
Ácido acético a 3% (m/v)	Simulador alimentar B
Etanol a 20% (v/v)	Simulador alimentar C
Etanol a 50% (v/v)	Simulador alimentar D1
Qualquer óleo vegetal que contenha menos de 1 % de matérias não saponificáveis	Simulador alimentar D2
Poli (óxido de 2,6-difenil-p-fenileno), granulometria 60-80 mesh, dimensão dos poros 200 nm	Simulador alimentar E

Após a escolha dos solventes foi realizada a seleção das condições de estudo.

Para o ensaio de migração global as amostras de material e os simuladores alimentares ou solventes são expostos a condições, que sempre que possível, representam as piores condições de utilização do material em estudo.

Esta parte do ensaio foi baseada nas normas para os materiais e objetos em contacto com os alimentos. Para estes existem condições padrão conforme o tipo de alimento em contacto. O Regulamento (UE) 2016/1416 da Comissão Europeia<sup>26</sup> apresenta sete condições de ensaio padrão, desde a condição *Overall Migration 1* (OM1) a OM7, estando representadas na Tabela 5, e duas condições de ensaio alternativas (alta temperatura), a condição OM8 e OM9, representadas na Tabela 6. Estas duas últimas condições, são usadas quando o ensaio OM7 com o simulador D2 não é praticável.<sup>26</sup>

Tabela 5: Condições de ensaio normalizadas<sup>26</sup>

	Condição do ensaio	Condições de contacto com os alimentos
OM1	10 dias a 20 °C	Condições de congelação ou de refrigeração.
OM2	10 dias a 40 °C	Qualquer armazenagem de longo prazo à temperatura ambiente ou inferior, incluindo a embalagem em condições de enchimento a quente e/ou aquecimento até uma temperatura T em que $70\text{ °C} \leq T \leq 100\text{ °C}$ durante um período máximo de $t = 120/2^{((T-70)/10)}$ minutos
OM3	2 horas a 70 °C	Aquecimento até 70 °C durante 2h, ou até 100 °C durante 15 minutos, no máximo, mas que não sejam seguidas de armazenagem a longo prazo, quer à temperatura ambiente quer sob refrigeração.
OM4	1 horas a 100 °C	Quaisquer condições de contacto que incluam enchimento a quente e/ou aquecimento até uma temperatura T em que $70\text{ °C} \leq T \leq 100\text{ °C}$ durante um período máximo de $t = 120/2^{((T-70)/10)}$ minutos, mas não sejam seguidas de armazenagem de longo prazo à temperatura ambiente ou sob refrigeração.
OM5	2 horas a 100 °C ou em refluxo ou alternativamente 1 h a 121 °C	Aplicações a temperaturas elevadas até 121 °C.
OM6	4 horas a 100 °C ou em refluxo	Quaisquer condições de contacto alimentar a uma temperatura superior a 40 °C, e com alimentos para os quais o ponto 4 do anexo III atribui os simuladores A, B, C ou D1
OM7	2 horas a 175 °C	Aplicações a temperaturas elevadas com alimentos gordos que excedem as condições para o ensaio OM5.

O Regulamento afirma que certos ensaios podem abranger de igual forma as condições de contacto para outros ensaios. Tal como no caso do ensaio OM7, que abrange as mesmas condições de contacto descritas para os ensaios OM1, OM2, OM3, OM4, OM5; porém, representa as condições de caso mais desfavoráveis para o simuladore alimentare D2 em contacto com não-poliiolefinas. O ensaio OM5 abrange as mesmas condições que os ensaios OM1, OM2, OM3, OM4, mas representa as condições do caso mais desfavorável para todos os simuladores alimentares em contacto com poliiolefinas. O ensaio OM6 abrange as mesmas condições que os ensaios OM1, OM2, OM3, OM4 e OM5, contudo representa as condições do

caso mais desfavorável para os simuladores alimentares A, B, C e D1 em contacto com não-poliiolefinas. Por último o ensaio OM2 abrange igualmente as mesmas condições que as descritas para os ensaios OM1 e OM3.<sup>26</sup>

Tabela 6: Condições de ensaio alternativas<sup>26</sup>

	Condição do ensaio	Condições de contacto com os alimentos	Abrange as condições de contacto com os alimentos descritos em
OM8	Simulador alimentar E durante 2 horas a 175 °C Simulador alimentar D2 durante 2 horas a 100 °C	Para elevadas temperaturas	OM1, OM3, OM4, OM5 e OM6
QM9	Simulador alimentar E durante 2 horas a 175 °C Simulador alimentar D2 durante 10 dias a 40 °C	Para elevadas temperaturas, incluindo o armazenamento prolongado à temperatura ambiente	OM1, OM2, OM3, OM4, OM5 e OM6

### 3.2. Ensaio de extraíveis

Para a realização deste ensaio foi necessário escolher os solventes de extração, a técnica de extração e o(s) método(s) analítico(s). Nesta etapa, o protocolo proposto pelo PQRI foi a principal base teórica, além deste foram revistos alguns artigos de investigação que se enquadravam dentro do tema dos Extraíveis e Lixiviáveis em embalagens farmacêuticas.

A recomendação publicada pelo PQRI (*“Safety Thresholds and Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and Nasal Drug Products”*) apresenta processos científicos para identificar, quantificar e estabelecer a segurança biológica de Extraíveis e Lixiviáveis em OINDP. Dentro desta estão protocolos experimentais e resultados que juntos estabelecem as melhores práticas para a realização de estudos de extração controlada, especificamente relevantes para as formas de dosagem de OINDP.

O estudo de extração controlada, envolve um tipo de extração por solvente, tipicamente uma extração por refluxo, soxhlet, sonicação e/ou extração em vácuo. Os solventes escolhidos devem cobrir uma ampla gama de polaridades, de forma a garantir que os analitos não polares e polares sejam extraídos. As considerações para a seleção do solvente apropriado para a extração abrangem tanto a capacidade de extração do solvente como a viabilidade da deteção dos extraíveis dos solventes de extração. A extração por refluxo é uma abordagem comum para a produção de extraíveis, onde as condições são facilmente padronizadas, uma vez que os pontos de ebulição dos solventes de extração permitem verificar a temperatura e a pressão necessária, ao contrário da extração por Soxhlet, esta é um fenómeno de equilíbrio. Extração por Soxhlet é uma extração contínua de sólido/líquido que envolve vários ciclos de aquecimento do solvente, no qual existem três parâmetros que podem ser modificados, o número de turnover, o tempo e a temperatura de extração.

A sonicação utiliza a energia ultrassônica, de forma a aumentar a taxa de difusão de pequenos analitos a partir de uma matriz sólida. Devem ser avaliadas as condições de equilíbrio (assim como na extração por refluxo), contudo estas não podem ser calculados a partir dos parâmetros termodinâmicos.

Por último a extração em vácuo, utiliza energia térmica de modo a facilitar o transporte dos extraíveis de uma matriz sólida. Esta extração é um fenómeno de equilíbrio e as condições são de fácil padronização.

Os solventes de extração com composição complexa poderão interferir com a deteção cromatográfica dos extraíveis, e de forma a evitar estas interferências são preferencialmente utilizados solventes simples e de elevadas purezas. Além disso, para a seleção de solventes devem considerar-se possíveis reações colaterais entre os solventes de extração e os possíveis extraíveis nos materiais.<sup>19</sup>

Para todas as extrações, o peso da amostra da embalagem, volume do solvente de extração e os fatores de concentração do extrato da amostra devem ser estabelecidos e ajustados para que seja possível detetar e identificar extratos individuais presentes ao nível de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  (ppm). Extratos individuais podem ser detetados e identificados em níveis mais baixos caso o método analítico usado seja capaz de atingir tal sensibilidade. Em geral, o grupo PQRI recomenda a utilização de 5 g de material ou objeto em estudo por 200 mL de solvente, sendo que os valores podem ser alterados desde que a razão se mantenha.<sup>27</sup>

Para cada técnica de extração e tipo de solvente, devem ser preparados brancos apropriados (sem amostra da embalagem em teste).<sup>27</sup>

As técnicas analíticas usadas para analisar os extratos devem ser abrangentes de forma a cobrir o maior número possível de analitos.<sup>28</sup>

O grupo PQRI faz uma listagem de diferentes solventes usados para a extração<sup>27</sup>:

- Diclorometano;
- 2-propanol (IPA);
- Hexano (n-hexano);
- Solventes aquosos.

Como solventes aquosos, por norma são usados<sup>27</sup>:

- Água a pH 2,5 (mistura HCl/KCl);
- Água a pH 9,5 (tampão fosfato);
- Água/IPA razão de 1:1.

O grupo de trabalho PQRI apresenta uma Tabela, que se encontra reproduzida na Tabela 7, que demonstra quais os solventes de extração que podem ser utilizados nos diferentes tipos de materiais, como o polietileno (PP), polietileno de baixa densidade

(LDPE), polipropileno (PE), policloreto de vinilo (PVC) e policarbonato (PC). Além desta, também apresenta uma relação entre o método de extração e os diferentes solventes, ilustrada na Tabela 8.

Tabela 7: Lista de material em função do solvente de extração (adaptado do protocolo experimental do grupo de trabalho PQRI<sup>27,29</sup>)

	Aquosos		Mistura	Orgânicos		Thermal (1)
	pH 2,5	pH 9,5	IPA/Água	IPA	Hexano	
PP e LDPE	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
PC (2)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
PVC (2)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Borracha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Rótulo/Adesivo	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim

(1): Por análise em *Headspace*

(2): Tanto por refluxo como por vácuo com a mistura IPA/Água

Tabela 8: Método de extração em função do solvente de extração (adaptado do protocolo experimental do grupo de trabalho PQRI<sup>29</sup>)

	Aquoso		Mistura IPA/Água	Orgânicos	
	pH 2,5	pH 9,5		IPA	Hexano
Soxhlet	Não	Não	Não	Sim	Sim
Refluxo	Não	Não	Sim (3)	Sim	Sim
Sonicação	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Em Vácuo	Sim (1)	Sim (1)	Sim (2)	Não	Não

(1) Sob condições de autoclave (121 °C por 1 h).

(2) Armazenamento a 55 °C por 3 dias.

(3) Apenas usado nos materiais de PC e PVC.

### 3.3. Técnicas analíticas

De forma a analisar as amostras resultantes do ensaio de extração, é necessário utilizar métodos analíticos validados. A Figura 7 exemplifica a estratégia analítica utilizada normalmente.<sup>8</sup>

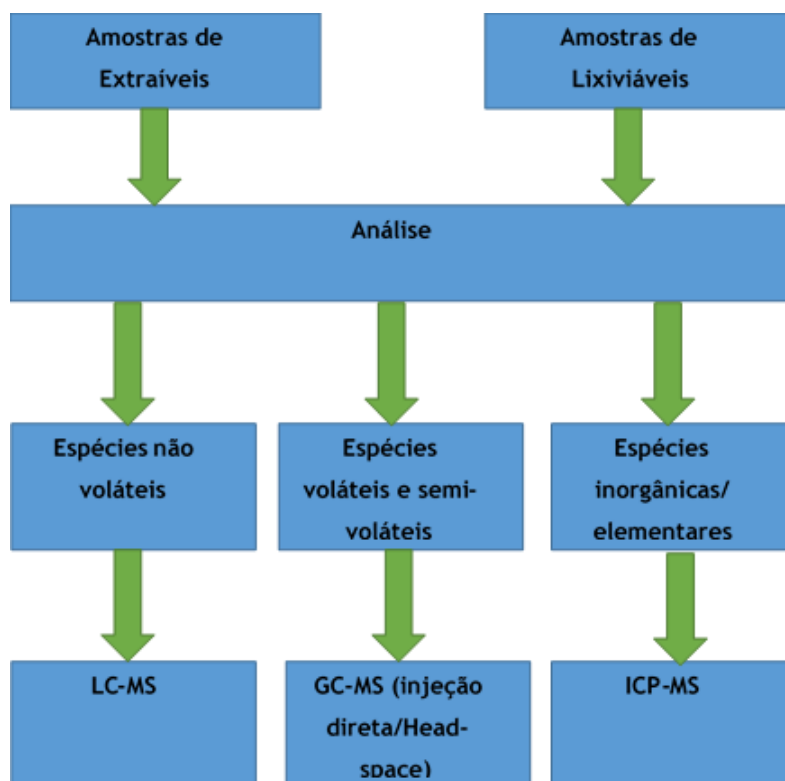


Figura 7: Abordagem generalizada dos métodos analíticos para análise de amostras de Extraíveis e Lixiviáveis.<sup>8</sup>

A análise por LC-MS permite a análise de espécies maiores e não voláteis.<sup>8</sup>

A análise por GC-MS permite a análise de espécies voláteis e semi-voláteis.<sup>8</sup>

A análise de GC-MS *headspace* é utilizada quando há uma grande quantidade de espécies voláteis.<sup>8</sup>



## Capítulo 4

### Caso de Estudo

#### 4.1. Embalagens em estudo

Para este estudo foram disponibilizadas pela empresa Cosmopak-Indústria de Cosméticos e Embalagem SA, 50 embalagens novas, habitualmente utilizadas em produtos cosméticos (frasco com tampa), com capacidade de 40 mL. O modelo do frasco é *Chicago* de 40 mL, *Ambar* com boca de 16 mm, apresenta um peso de 6,5 g, altura de 69,0 mm±0,35 mm e largura de 33,2 mm±0,25 mm. A tampa, corresponde ao modelo C3 preto com boca de 16mm, tem uma altura de 22,3 mm±0,15 mm, um diâmetro de 21,7 mm±0,15 mm e um peso de 2,30 g.

Verificou-se, pela documentação solicitada ao fornecedor, que o material do frasco era composto por 99,72% de Politereftalato de etileno (PET) e 0,28% de *RH DACHA AMBER 2*. Sendo que, o *RH DACHA AMBER 2* pode conter em simultâneo ou individualmente, polímeros, aditivos e colorantes (dentro dos LME(T)). Para o PET foram utilizados como monómeros básicos e aditivos substâncias tais como, o ácido isoftálico, etilenoglicol, entre outros. A tampa apresenta uma composição quantitativa de 99,21% de PP e 0,79% de *UN0052 BLACK*. Em relação ao PP, este é composto por 99,5% m/m de polímero de 1-propileno e por aditivos com propriedades anti-estáticas, adicionados de forma a conceder plasticidade, sendo estes classificados como não perigosos. *UN0052 BLACK* apresenta na sua composição substâncias como o ácido acético e butadieno, e contém também colorantes que estão aprovados pela FDA nos Estados Unidos. Toda a informação referente a esta documentação encontra-se no Anexo I.

#### 4.2. Migração Global

Uma vez que se trata de uma embalagem do género de frasco com uma capacidade de 40 mL, o procedimento experimental escolhido foi o método de exposição por enchimento.<sup>20</sup>

Foram escolhidos três solventes: ácido acético 3%, etanol 10% e água desionizada através de um sistema de purificação (água *Milli-Q* Tipo 1, resistividade de 18,2MΩ cm<sup>-1</sup> a 25 °C, *Direct-Q® 3 UV Water Purification System*). A escolha foi baseada nas especificações mencionadas no Capítulo 3, acerca dos simuladores alimentares. Como condições de ensaio, foram escolhidas duas condições de temperatura (20 °C e 40 °C, e duas condições de tempo de

contacto (10 e 30 dias). A escolha das condições é justificada pelo tipo de embalagem e pela sua utilização esperada. Neste caso, como se trata de uma embalagem de cosméticos, espera-se que esta seja usada no mínimo de 10 dias e que seja armazenada em locais à temperatura ambiente.

Como regra geral é necessário ter no mínimo 200 mL de simulador para a realização da experiência. Além de que, para todas as embalagens deste género que contenham um volume nominal inferior a 200 mL, é necessário utilizar mais do que uma embalagem para constituir a amostra, tendo neste caso sido utilizadas cinco embalagens. A cada embalagem foi dado uma referência de acordo com as características da embalagem, Frasco *Amber* para Migração (FAMB001 a FAMB0040). Foi efetuado um duplicado de um simulador para cada condição, tendo em conta o número de embalagens disponíveis, como se pode verificar na Tabela 9.

Tabela 9: Condições de teste e embalagens utilizadas

	Simulador	Duplicado	Embalagens usadas	Referência das Embalagens
Condição 20 °C 10 e 30 dias	Água <i>Milli-Q</i> Tipo 1	Não	5	FAMB001 à FAMB005
	Etanol 10%	Não	5	FAMB011 à FAMB015
	Ácido Acético 3%	Sim	10	FAMB026 à FAMB035
Condição 40 °C 10 e 30 dias	Água <i>Milli-Q</i> Tipo 1	Não	5	FAMB006 a FAMB010
	Etanol 10%	Sim	10	FAMB016 à FAMB025
	Ácido Acético 3%	Não	5	FAMB036 à FAMB040

Procedeu-se à preparação dos simuladores num balão volumétrico de 1L, o Ácido Acético 3% foi preparado com ácido acético glaciado (99,8-100,5%, *AnalaR NORMAPUR®*) e com água desionizada Tipo 1. O etanol 10%, foi preparado com etanol absoluto (*Ethanol Absolute Anhydrous RPE*) e com água desionizada Tipo 1. Os três simuladores foram colocados na respetiva estufa (estufa 20 °C *Thermostatically controlled incubators* TC 135 S e estufa 40 °C *Termaks Incubator Climate Chamber Series* KB8000 L), conforme a condição em estudo, até atingirem a temperatura desejada.

Após estarem à temperatura desejada, realizou-se o preenchimento das embalagens, e com o auxílio de uma proveta mediu-se 40 mL de cada simulador para as respetivas embalagens. Os frascos foram fechados com as respetivas tampas e colocados na estufa (20 °C ou 40 °C) durante o tempo definido (10 dias ou 30 dias). Foi monitorizada diariamente a temperatura das estufas, durante o período de teste de forma a garantir os critérios definidos (20 °C $\pm$ 1 e 40 °C $\pm$ 1), para a estufa de 40 °C a monitorização foi feita utilizando um *data logger* (EBRO,

modelo EB1 20-T1) de registo de temperatura, que se encontrava dentro da estufa. Para a estufa de 20 °C, a monitorização foi realizada pelo visor digital.

No final do tempo definido, realizou-se a evaporação do simulador, sendo que esta abrange três passos. O primeiro passo consiste na preparação dos cadinhos, para tal foi necessário preparar dezoito cadinhos (três cadinhos para a amostra e dois cadinhos para o branco) para cada condição, cada um deles foi identificado conforme o simulador e o conteúdo (amostra ou branco). Após a sua identificação foram colocados numa estufa (VWR *Dry Line* DL53), previamente aquecida, a 105 °C durante 30±5 minutos, monitorização através do visor digital, sendo o critério de 105 °C±2 °C. Passados os 30 minutos, os cadinhos foram retirados da estufa e colocados no exsiccador para arrefecerem à temperatura ambiente. Quando arrefecidos, efetuou-se a pesagem numa balança de precisão (VWR *Collection Precision Balance* LP) e o registo das massas individuais. Depois da pesagem, voltou-se a repetir o ciclo de aquecimento e arrefecimento até que as massas individuais consecutivas não diferissem mais do que 0,5 mg.

O segundo passo englobou a preparação das amostras e dos brancos. Para a preparação da amostra recolheu-se as embalagens que continham o mesmo simulador (por exemplo, as cinco embalagens de água da condição 20 °C durante 10 dias) e o conteúdo foi esvaziado para um copo de 200 mL. Para a preparação dos dois brancos, colocou-se 200 mL de simulador previamente preparado nos respetivos copos de 200 mL.

O terceiro e último passo, consistiu na evaporação do simulador, para tal os cadinhos com o respetivo simulador, foram evaporados numa placa de aquecimento. Para lavagem dos copos, utilizou-se cerca de 10 mL do respetivo simulador preparado. Quando o solvente estivesse praticamente evaporado, os cadinhos eram colocados na estufa, a 105-110 °C durante 30±5 minutos, de forma a completar a evaporação e a secagem do resíduo. Após os 30 minutos, os cadinhos eram retirados da estufa e era procedido como no primeiro passo. Os cadinhos são então colocados no exsiccador até arrefecerem. De seguida foi realizada a pesagem e o registo das massas individuais, exibidas no Anexo II. Tal como no primeiro passo, é necessário repetir o ciclo de aquecimento e arrefecimento até que as massas individuais consecutivas não difiram mais do que 0,5 mg.

### **4.3. Ensaio de extraíveis**

De acordo com o Capítulo 3, foram escolhidos como solventes de extração o isopropanol (2-*Propanol*, *Supelco*®), água com pH de 2,5 (HCl/KCl) e água com pH de 9,5 (bicarbonato de sódio/carbonato de sódio).

Como método de extração, recorreu-se à sonicação (VWR-*Ultrasonic Cleaner*, USC-TH), tendo sido usadas as duas condições apresentadas na Tabela 10, em que os únicos parâmetros diferentes foram o tempo e o volume, com objetivo de ter mais resultados e verificar qual

disponibiliza o melhor perfil de extraíveis. O protocolo da sonicação foi baseado no procedimento descrito no apêndice do livro<sup>9</sup>, onde é utilizado no mínimo 2 g de amostra, com um rácio de 20:1 de solvente para amostra. O único parâmetro ajustável é o tempo, a temperatura do banho deve ser ajustada utilizando gelo (0 °C) ou monitorizada utilizando um termómetro.<sup>9</sup> Como tal, água do banho foi monitorizada com um termómetro, tendo sido utilizada uma temperatura de 20 °C para este.

Para cada solvente foram realizados triplicados e os respetivos brancos.

Tabela 10: Parâmetros de Sonicação

Tempo (minutos)	Volume de solvente (mL)	Amostra
60	20	Frasco
	22	Tampa
30	40	Frasco
	44	Tampa

Para a realização da extração, a amostra foi cortada em pedaços e colocada no frasco para a sonicação. O frasco escolhido era de vidro, com uma capacidade de 50 mL e tratado com ácido nítrico antes da sua utilização, tendo em conta o mencionado no Capítulo 3. O tratamento consistiu no enchimento dos frascos com ácido nítrico, mais ou menos até meio. Os frascos eram agitados e mantidos em ácido nítrico durante 3 horas, após este período, eram passados com água desionizada e secos em estufa a 50 °C.

Como eram duas condições, foram preparadas duas soluções de água com pH de 2,5 e de água com pH de 9,5. Para a condição de 60 minutos, foi preparado 250 mL destas duas soluções, e para a condição de 30 minutos, foi preparado 500 mL. A solução de água com pH de 2,5, foi preparada com HCl 37% (HCl 37%, *AnalaR NORMAPUR*®), KCl (KCl, ≥99%, *GPR RECTAPUR*®) e com água desionizada Tipo 1. E a solução de água com pH de 9,5, foi preparada com Carbonato de Sódio Anhídrico Granular (*Sodium carbonate, anhydrous* ≥99,5%, *BAKER ANALYZED*®), Bicarbonato de Sódio (*Sodium hydrogen carbonate* 99,7-100,3% ACS, *VWR Chemicals BDH*®) e com água desionizada Tipo 1.

Para a preparação das amostras para o ensaio, as embalagens foram cortadas com recurso a uma faca estéril e as tampas foram colocadas diretamente no interior dos frascos. O peso da amostra foi 2,00 g para a embalagem e de cerca de 2,20 g para a tampa. Após sonificação, foi necessário retirar os pedaços do frasco e a tampa dos solventes, recorrendo a filtração. Na Figura 8 e 9 estão demonstradas as amostras para as duas condições, onde se pode ver o aspeto das amostras em função do tempo de sonicação: 30 e 60 minutos, respetivamente.



Figura 8: Exemplo da amostra com a tampa e da amostra com o frasco para 30 minutos.



Figura 9: Exemplo da amostra com a tampa e da amostra com o frasco para 60 minutos.

As soluções de extraíveis para análise por cromatografia gasosa, foram preparadas com diclorometano (*gradient grade, for HPLC*), no caso dos extratos aquosos e todas foram evaporadas com recurso a um evaporador (*Buchi Rotavapor R215*). O volume final foi de 1 mL em n-hexano (comercial, retificado).

Após preparação de todas as amostras nos respetivos vials, procedeu-se à análise por GC-MS no laboratório do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior.

Todo o material usado, balões e vials, foi previamente lavado com metanol (*CHROMASOL, gradient grade, for HPLC, 99,9%*) e seco numa estufa a 50 °C (*VWR Dry Line DL53*).

#### 4.4. Determinação dos Compostos Orgânicos Voláteis dos extraíveis

Os perfis voláteis para amostras das embalagens de cosmético foram obtidos, em duplicado, através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotómetro de massa (GC-MS SCION-SQ 456 GC, *Bruker*), sendo que os parâmetros utilizados para o ensaio estão representados na Tabela 11.

A identificação dos compostos voláteis presentes nas amostras foi realizada através de:

- comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros de massa da biblioteca NIST 17 incluída no software do equipamento;
- comparação dos espectros com os índices de *Kovats* experimentais obtidos de acordo com uma série de alcanos injetada com o mesmo método que a amostra;
- comparação com padrões (Sigma-Aldrich), para alguns compostos.

A quantidade relativa de cada composto foi expressa em percentagem da área relativa do pico do composto relativamente à área total dos picos identificados na amostra.

Tabela 11: Exemplo de Parâmetros Operacionais, Análise de GC dos Extratos.

Parâmetro operacional	Valor operacional
Coluna	Coluna capilar de sílica fundida HP-5MS, com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro e 0,25µm de espessura ( <i>Agilent J&amp;W GC Columns</i> )
Programa do forno	Início a 45 °C, com um aumento gradual de 3 °C por minuto até aos 175 °C, e até aos 300 °C com uma razão de aquecimento de 15 °C por minuto, mantendo-se nesta temperatura final durante 10 minutos
Gás de arraste e fluxo	Hélio, 1 mL minuto <sup>-1</sup>
Injeção	1 µL, 1:50 split
Temperatura do injetor	220 °C
Temperatura do detetor	250 °C

## 4.5. Resultados Migração

De forma a apresentar os resultados, foi necessário, em primeiro lugar calcular a área superficial de migração em dm<sup>2</sup>, através da Equação 1. Uma vez que, a altura da embalagem era 53,5±0,35 mm (altura que correspondia ao volume de 40 mL) e a largura era de 32,2±0,25 mm, foi necessário converter as unidades para dm.

$$A = L \times h \tag{1}$$

Onde:

A é a área superficial

L é a largura da embalagem

h é a altura da embalagem

Através da Equação 2, calculou-se a massa do resíduo em g:

$$m_r = m_1 - m_2 \quad (2)$$

Onde:

$m_r$  é a massa do resíduo

$m_1$  é a massa do cadinho com amostra, valores apresentados no Anexo II

$m_2$  é a massa do cadinho sem amostra, valores apresentados no Anexo II

Por último, com os dados obtidos por estas duas equações, calculou-se a migração global em  $mg\ dm^{-2}$ , pela seguinte Equação:

$$M = \frac{m_r \times 1000}{S \times N} \quad (3)$$

Onde:

M é a migração global para o simulador, em miligramas por decímetro quadrado da área de superfície da amostra

$m_r$  é a massa do resíduo em g

S é a área da superfície da embalagem que esteve em contato com o simulador durante a exposição em decímetros quadrados

N corresponde ao número de embalagens usadas para cada simulador.

Para o ensaio da migração global, foi estabelecido o limite de quantificação do método (LQ), que corresponde à menor migração quantificada na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão. Este LQ foi estimado com base na incerteza da balança utilizada.

Através do cálculo da migração global para cada amostra e condição foi possível obter os seguintes resultados representados na Tabela 12 e 13 (onde C1,C2 e C3 corresponde ao cadinho um e assim sucessivamente). Contudo é de realçar, que em dois casos particulares, a

assinalado na Tabela 12 e na Tabela 13, apresentam valores significativamente diferentes dos restantes, pelo que não foram considerados os resultados. Estes resultados poderão ser devidos a alguma contaminação que ocorreu durante o ensaio (por exemplo, acumulação de poeira). LQ corresponde a  $0,1 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Tabela 12: Resultados da Migração Global para a condição de  $20^\circ\text{C}$  a 10 e 30 dias

Simulador	Migração Global ( $\text{mg dm}^{-2}$ )							
	10 dias a $20^\circ\text{C}$				30 dias a $20^\circ\text{C}$			
	C1	C2	C3	Média	C1	C2	C3	Média
Ácido Acético	0,7	6,4(*)	0,2	0,5	0,7	1,1	0,4	0,7
Ácido Acético Duplicado	<LQ	0,4	0,2	0,3	<LQ	1,6	1,6	1,6
Água Mili Q	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,3	0,3
Etanol	<LQ	0,6	0,2	0,4	<LQ	1,6	1,4	1,5

(\*) Resultado excluído dos cálculos por ultrapassar o critério de aceitação de  $2 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Tabela 13: Resultados da Migração Global para a condição de  $40^\circ\text{C}$  a 10 e 30 dias

Simulador	Migração Global ( $\text{mg dm}^{-2}$ )							
	10 dias a $40^\circ\text{C}$				30 dias a $40^\circ\text{C}$			
	C1	C2	C3	Média	C1	C2	C3	Média
Ácido Acético	0,6	0,6	0,2	0,5	2,8	2,8	3,8	3,1
Água Mili Q	1,2	1,0	1,4	1,8	2,1	2,5	1,9	2,2
Etanol	0,8	0,9	1,0	0,9	2,4	2,4	3,1	2,7
Etanol Duplicado	4,7(*)	1,3	0,3	0,8	1,8	2,8	1,5	2,0

(\*) Resultado excluído dos cálculos por ultrapassar o critério de aceitação de  $2 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Verifica-se que os valores mais altos da migração global foram registados na condição de  $40^\circ\text{C}$  durante 30 dias para todos os simuladores. Por outro lado, pode-se observar que os valores obtidos para a condição de 10 dias a  $20^\circ\text{C}$ , em comparação com os resultados das amostras mantidas à mesma temperatura, mas por um período de 30 dias, não diferem substancialmente, considerando que é permitida a tolerância analítica de  $2 \text{ mg dm}^{-2}$  para os três resultados obtidos para cada condição. Estes, não devem variar mais do que o valor da tolerância analítica em relação à sua média de acordo com a norma EN 1186-9:2002.

## 4.6. Resultados da análise dos extraíveis

Os resultados correspondentes à análise dos compostos voláteis provenientes das amostras extraídas, apresentam-se nas tabelas 14 a 20. De acordo com os perfis cromatográficos gerados, verificou-se um pico de tolueno proveniente do n-hexano, sendo que este está presente em maior ou menor concentração não só nas amostras, mas também nos brancos de extração (água e isopropanol) e nos brancos de solvente.

Os compostos que apresentavam uma quantidade relativa inferior a 0,05%, estão representados por \*, e são considerados compostos vestigiais.

Para as amostras (frasco e tampa) extraídas com os solventes de extração água a pH 2,5 e 9,5, e respectivos brancos de extração, o perfil cromatográfico obtido foi o mesmo que o apresentado para o solvente n-Hexano, indicado na Tabela 14. Nas amostras extraídas com o solvente de extração água a pH 2,5 e água a pH 9,5 não foi detetado nenhum composto.

Tabela 14: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes no solvente n-Hexano

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
3,26	99,56	Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	97,80
4,07	0,07	Ácido Acético, éster butílico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	88,00
5,18	0,04	Etilbenzeno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	90,70
5,39	0,04	Xileno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	90,30
6,51	0,04	*	--	--
6,59	0,09	--	--	--
7,15	0,12	--	--	--
8,73	0,06	--	--	--

(\*) Compostos vestigiais (quantidade relativa inferior a 0,05%).

O perfil cromatográfico dos brancos de extração do solvente isopropanol nas duas condições, foram bastantes semelhantes, sendo que a % total de compostos identificados foi de cerca de 99%. Na Tabela 15 está representado o perfil cromatográfico para a amostra do branco de extração do solvente isopropanol para a condição de 1h de sonicação e na Tabela 16 para a condição de 30 minutos.

Tabela 15: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Branco de extração de Isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
3,41	99,17	Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	97,40
4,30	0,08	Ácido Acético, éster butílico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	89,70
5,41	0,030	Etilbenzeno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	90,80
5,61	0,065	Xileno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	86,90
6,75	0,059	*		
6,82	0,103			
7,39	0,119			
8,93	0,063			
39,10	0,087			
43,65	0,080			
43,98	0,081			
44,15	0,061			

(\*) Compostos vestigiais (quantidade relativa inferior a 0,05%).

Tabela 16: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Branco de extração de Isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
3,26	98,87	Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	97,30
4,07	0,08	Ácido Acético, éster butílico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	89,60
5,18	0,04	Etilbenzeno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	91,10
5,40	0,06	Xileno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	87,60
6,52	0,04	*		
6,60	0,10			
7,16	0,11			
8,74	0,05			
27,32	0,11			
32,18	0,07			
35,30	0,19			
42,50	0,18			
46,52	0,11			

(\*) Compostos vestigiais (quantidade relativa inferior a 0,05%).

Para a amostra correspondente ao Frasco extraídas em isopropanol, na condição de 1 hora, não foi detetado nenhum composto, sendo que os compostos identificados são os mesmos que no perfil do branco de extração de isopropanol. Tendo sido identificado 97,50% dos compostos, na Tabela 17 está representado o respectivo perfil cromatográfico.

Para a amostra do Frasco extraída em isopropanol, na condição de 30 minutos foram identificados cinco compostos (4-hidroxi-5-metil-2-pentanona, eucaliptol, fenchone, linalol e cânfora). Estes compostos não expectáveis neste tipo de embalagens, podem ter resultado de alguma contaminação, por exemplo alguma situação de carryover de amostras analisadas anteriormente no sistema cromatográfico. Contudo apenas foram identificados 43,57% dos

compostos. A razão de muitos compostos não serem identificados pode ser devido ao facto das concentrações dos compostos detetados serem muito baixas e, por isso, saem muito próximo da linha do ruído. Consequentemente, os espectros de massa desses compostos aparecem com a interferência do ruído, não sendo possível uma comparação com um grau de confiança suficiente para um composto puro da biblioteca. Na Tabela 18 está representado o perfil cromatográfico desta condição de 30 minutos.

Tabela 17: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Frasco com isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
3,27	97,31	Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	97,60
4,08	0,11	Ácido Acético, éster butílico	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	84,60
5,00	0,07			
5,18	0,04	Etilbenzeno*	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	89,70
5,40	0,09	Xileno	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	90,40
6,53	0,05			
6,60	0,12			
7,16	0,15			
8,74	0,09			
9,25	0,10			

(\*) Compostos vestigiais (quantidade relativa inferior a 0,05%).

Tabela 18: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente ao Frasco com isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
3,26	2,54	Tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	86,30
4,67	13,30	4-hidroxi-5-metil-2-pentanona	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	91,40
7,43	3,87			
7,53	3,04			
11,25	8,11	Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	83,50
13,71	4,20	Fenchone	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	93,10
14,36	8,31	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	86,50
16,21	7,12	Cânfora	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	86,80
22,69	35,93			
23,01	13,59			

Para a amostra correspondente à Tampa em isopropanol, quer para a condição de 1 hora de sonicação quer para a condição 30 minutos de sonicação, foram identificados os mesmos compostos que para os Frascos (4-hidroxi-5-metil-2-pentanona, eucaliptol, fenchone, linalol e cânfora). Sendo que para a condição de 1 hora, foram identificados 56,25% dos compostos, estando estes representados na Tabela 19. E para a condição de 30 minutos, foram

identificados 63,48% dos compostos, sendo que o perfil cromatográfico se encontra na Tabela 20.

Tabela 19: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente a Tampa com isopropanol para a condição de 1 hora de sonicação.

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
4,66	9,80	4-hidroxi-5-metil-2-pentanona	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	93,10
7,43	2,83			
7,52	2,20			
11,24	5,63	Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	87,00
13,71	29,74	Fenchone	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	92,20
14,35	5,77	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	85,80
16,20	5,33	Cânfora	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	90,70
16,42	3,41			
22,69	25,58			
23,01	9,74			

Tabela 20: Identificação e percentagens relativas dos compostos voláteis presentes na amostra correspondente a Tampa com isopropanol para a condição de 30 minutos de sonicação.

Tempo de Retenção	Composto %	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Grau de confiança %
4,64	1,32	4-hidroxi-5-metil-2-pentanona	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	90,10
7,41	2,12			
7,50	2,14			
11,23	3,20	Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	90,50
13,70	3,91	Fenchone	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	94,90
14,34	4,09	Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	86,70
16,19	4,62	Cânfora	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	91,70
16,41	4,68			90,70
22,68	6,47			
23,00	6,56			
43,97	12,55			

## Capítulo 5

### Conclusões e perspectivas futuras

Esta dissertação consistiu no desenvolvimento de um procedimento para avaliar a segurança de embalagens utilizadas para o acondicionamento de produtos cosméticos, tendo por base os estudos de migração utilizados nas embalagens de produtos alimentares e os estudos de extraíveis e lixiviáveis utilizados na indústria farmacêutica. Por um lado, foram revistas normas e monografias referentes às embalagens de produtos farmacêuticos e por outro foram revistas normas referentes aos produtos alimentares.

O objetivo seria encontrar uma estratégia para avaliar a segurança de embalagens primárias de cosméticos, recorrendo aos métodos de Extraíveis e Lixiviáveis propondo uma metodologia para este tipo de embalagens.

Os resultados de migração global obtidos cumprem com a legislação aplicada à migração global relativa às embalagens em contacto com os alimentos, mencionada no regulamento nº10/2011, uma vez que possuem valores de migração global inferiores a  $10 \text{ mg dm}^{-2}$ .

Tendo em conta que não há diferenças significativas dos resultados obtidos para ambas as temperaturas, aos tempos de 10 dias e 30 dias, conclui-se que o tempo de análise de 10 dias nas condições de 20 e 40°C será a condição a considerar para estudos de migração para embalagens de produtos cosméticos. Por outro lado, uma vez que até ao momento não existe nenhum Regulamento para a avaliação da segurança das embalagens de produtos cosméticos, de tal forma que, não existem critérios exclusivos de seleção de materiais e substâncias para as mesmas, e que a avaliação das características da embalagem é realizada através da verificação dos certificados enviados pelos produtores, a realização destes estudos permite confirmar a veracidade da declaração de compatibilidade alimentar (Regulamento (EU) Nº10/2011 da Comissão<sup>19</sup>).

Juntamente com os estudos de migração, foi realizado um ensaio de extraíveis, recorrendo à metodologia utilizada nos estudos de Extraíveis e Lixiviáveis de produtos farmacêuticos. Relativamente a este tipo de ensaio, a abordagem foi efetuada em duas etapas, sendo a primeira etapa o ensaio de extraíveis e a segunda, que tem em conta o resultado da primeira, o ensaio de lixiviáveis. Nos casos em que os níveis de avaliação dos extraíveis estão toxicologicamente seguros, não é necessário ou podem ser não considerados os estudos de lixiviáveis. Quando os extraíveis apresentam níveis acima dos limites de segurança, é necessário realizar um estudo de lixiviáveis.

De acordo com os resultados obtidos e considerando os compostos identificados nas amostras dos frascos cujo solvente de extração foi isopropanol (ou seja, 4-hidroxi-5-metil-2-pentanona, eucaliptol, fenchone, linalol e cânfora), não foram detetados outros compostos voláteis com potenciais riscos. Os compostos identificados, presentes em extratos de plantas e largamente utilizados como ingredientes cosméticos, devem-se a alguma contaminação. Considerando que o equipamento utilizado estava a ser também aplicado aos estudos de óleos essenciais, prevemos que os resultados sofreram contaminações de compostos retidos na coluna. É de salientar que, as embalagens eram novas e não estiveram em contato com qualquer produto cosmético. Tendo em conta os resultados obtidos no estudo de extraíveis, não se procedeu ao estudo de lixiviáveis.

Futuramente, seria necessário realizar uma otimização e validação dos métodos analíticos utilizados de acordo com as normas e guias existentes, e recorrer, para a análise de compostos semi-voláteis e voláteis, à técnica de GC com *Headspace*, que tem como vantagem a introdução da amostra sem pré-tratamento, evitando assim possíveis contaminações nesta fase.

É importante referir que, será sempre uma mais valia a realização de uma investigação mais aprofundada das embalagens utilizadas na indústria de cosméticos. Esta investigação deverá ter como foco as características do produto cosmético, de forma a definir não só, outras condições de migração e extração (tempo, temperatura, método de extração) mas principalmente outros simuladores e solventes de extração que melhor se adequem. Para além disso, será também importante refletir sobre a possibilidade da definição de novos limites de migração global, tendo em conta as características dos produtos cosméticos e a forma de utilização dos mesmos. Para os estudos dos extraíveis, torna-se necessário efetuar a sua validação, por forma a poderem ser utilizados como ensaios rotina.

Seria também importante pensar, numa primeira análise efetuada às embalagens, realizar em simultâneo com os extraíveis, o estudo dos lixiviáveis, por forma a efetuar uma correlação entre ambos os estudos e a otimizar o tempo de ensaio.

Contudo, é de enfatizar que este estudo foi realizado com o intuito de delinear uma metodologia, para a avaliação da interação dos produtos cosméticos com as embalagens e iniciar uma discussão em relação à mesma e não com o intuito de ser uma referência ou guia para a avaliação destas.

# Capítulo 6

## Estágio

### 6.1. Apresentação da *Labfit-Health Products Research and Development e Ensaio realizados*

Tive a oportunidade de realizar estágio com a *Labfit-HPRD* durante o período de tempo em que redigia a dissertação. A *Labfit-HPRD* é uma empresa que realiza prestação de serviços de excelência dirigidos a diferentes setores da indústria produtora e transformadora quer a nível nacional como internacional.

Os serviços estão relacionados com o controlo de qualidade e com a caracterização de produtos farmacêuticos, cosméticos, dispositivos médicos e biocidas. Além destes, também efetuam investigação e desenvolvimento de produtos farmacêuticos e outros e realizam serviços de consultoria, na área de assuntos regulamentares, implementação de sistemas de gestão da qualidade, auditorias, entre outros.

Em 2014, a *Labfit-HPRD* foi reconhecida pela primeira vez, através da certificação do Sistema de Gestão da Qualidade pelo referencial da Organização Internacional para Padronização (ISSO) 9001 e em 2015, foi certificada do cumprimento dos requisitos dos referenciais normativos: ISO 9001 (Gestão da Qualidade Total), NP 4457:2007 (Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação) e ISO 13485:2003 (Sistema de Gestão da Qualidade Dispositivos Médicos). Além destas certificações é de realçar que, a *Labfit-HPRD* foi reconhecida pelo INFARMED segundo os Princípios de Boas Práticas de Laboratório da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico (OCDE).

Durante o estágio acompanhei 2 ensaios microbiológicos, a qualidade microbiológica (QM) de produtos cosméticos e o ensaio da eficácia do conservante (*Challenge Test-CT*) com os quais adquiri um vasto conhecimento dos mesmos, das respetivas normas e do controlo de qualidade interno utilizado em cada ensaio. Os ensaios de QM e CT, de acordo com as normas ISO foram efetuados nas amostras habitualmente acondicionadas nas embalagens testadas, objeto desta dissertação. Como exemplo de norma de segurança, foi necessário descartar os resíduos líquidos e sólidos de acordo com o procedimento operativo *Labfit.PO.03-Tratamento e eliminação de resíduos laboratoriais*. E deve ser realizada à descontaminação e lavagem do

material com base no procedimento operativo Labfit-.PO.04-Desinfecção e lavagem de material.

Tratando-se de uma empresa com vários sistemas de gestão de qualidade implementados, tive oportunidade de verificar os procedimentos de qualidade implementados na Labfit.

## 6.2. Teste de qualidade microbiológica:

O ensaio de Qualidade Microbiológica, que compreende a contagem de aeróbios totais de bactérias e fungos e leveduras, pode ser realizado segundo o ensaio descrito na monografia 2.6.12 da Farmacopeia europeia 9.0<sup>30</sup>, sendo que este é aplicado habitualmente a amostras de produtos farmacêuticos e dispositivos médicos.

Relativamente aos produtos cosméticos as normas utilizadas são a ISO 21149:2017<sup>31</sup> para bactérias aeróbias mesófilas e ISO 16212:2017<sup>31</sup> para fungos e leveduras.

### 6.2.1. Teste de QM de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0

Soluções utilizadas, cuja preparação está descrita no Anexo III:

- Diluente;
- Solução de polissorbato;
- Neutralizante completo;
- Neutralizante sem polissorbato;
- Meio de cultura *tryptic soy agar* (TSA);
- Meio de cultura *Sabouraud dextrose agar* (SDA).

## Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos

Antes de começar a trabalhar é necessário limpar a bancada de trabalho com álcool e papel descartável e ligar o bico de Bunsen ou câmara de fluxo laminar, de forma a trabalhar sempre em condições de assepsia.

A partir das culturas stock preparadas com base no procedimento da *Labfit-HPRD* baseado nas normas ISO 21148:2005<sup>31</sup> e ISO 12353:2006<sup>31</sup>. É preparado uma cultura para cada microrganismo nas condições definidas na Tabela 21, em placa de meio de cultura agar. A partir desta, é efetuado uma segunda cultura e caso necessário uma terceira que servirão como culturas de trabalho. Para a preparação das suspensões de inóculo de bactérias e leveduras, é colocado 9 mL de diluente estéril com esferas de vidro, em tubos de falcon de 15 mL estéril e é ressuspenso uma amostra da cultura a partir da cultura de trabalho, com

auxílio de uma ansa estéril. Procede-se a agitação do tubo no vórtex durante 3 minutos no máximo. A absorvância da suspensão é ajustada, utilizando a solução de diluente e tendo em conta os valores apresentados na Tabela 21. Estas suspensões devem ser utilizadas no máximo 2 horas após a sua preparação.

Para a preparação da suspensão do inóculo de *A. brasiliensis*, é necessário transferir um pouco da solução de polissorbato preparada (neutralizante sem polissorbato) para a superfície da placa e com a ajuda de uma ansa estéril soltar os esporos. Após o conteúdo é transferido para um tubo com 9 mL de diluente e esferas de vidro, vortexar no máximo 3 minutos. De modo a descartar a presença de esporos germinados ou micélios, realiza-se uma observação de uma alíquota ao microscópio (ampliação de 400x). Caso sejam observados esporos germinados a suspensão deve ser descartada; caso sejam observados micélios deve-se proceder à centrifugação (2000 g durante 20 minutos) da suspensão e lavagem dos esporos, pelo menos duas vezes, com a mesma solução de polissorbato (neutralizante sem polissorbato). A absorvância da suspensão é ajustada como descrito anteriormente. A suspensão de inóculo deve ser utilizada no próprio dia ou até ao dia seguinte desde que conservada entre 2 a 8 °C e que no dia seguinte não estejam presentes esporos germinados.

## Eficácia do neutralizante

De acordo com a monografia da Farmacopeia Europeia<sup>30</sup>, são realizadas diluições em diluente até à ordem de  $10^{-4}$  para bactérias e  $10^{-3}$  para fungos (leveduras e *A. brasiliensis*) a partir das suspensões de inóculo preparadas. É transferido 1 g ou 1 mL da preparação a testar para um tubo contendo 9 mL de neutralizante e caso seja necessário, efetua-se uma segunda diluição de 1:10 a partir desta. Deixar à temperatura ambiente durante  $30 \pm 15$  minutos. Caso seja verificado que o neutralizante é ineficaz e que mesmo assim não é possível recuperar os microrganismos provenientes da validação, deve-se concluir que a amostra em estudo apresenta atividade antimicrobiana intrínseca. De seguida, prepara-se 5 tubos, um para cada microrganismo a testar, e inocula-se com 100  $\mu$ L da suspensão de cada microrganismo. É necessário preparar um controlo, no qual a preparação é substituída por 1 mL de diluente, sendo este inoculado com 100  $\mu$ L da suspensão de cada microrganismo em separado. Além deste, também se prepara um controlo da suspensão adicionando 100  $\mu$ L de cada suspensão a 10 mL de diluente. As preparações devem ser vortexeadas e só depois se procede à inoculação de 1 mL de cada em duplicado por incorporação nos meios de cultura e condições de incubação apropriados a cada microrganismo (Tabela 21).

De forma a demonstrar a eficácia do neutralizante é necessário verificar a diferença no número de unidades formadoras de colónias (UFC) calculado em  $N_{vf}$  (média de UFC nas duas placas de controlo na presença da formulação e de neutralizante) e em  $N_{vn}$  (média de UFC nas duas placas de controlo na ausência da formulação e na presença do neutralizante), esta diferença

não pode ser duas vezes superior e as contagens entre duplicados não devem diferir mais do que 50%.

Tabela 21: Condições de incubação, meios de cultura, tempo e temperatura dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo

	Microrganismo	Condições de incubação das culturas de trabalho	UFC mL <sup>-1</sup> (inóculo)	Absorvância 600 nm	Condições de incubação das placas em teste
Bactérias	<i>S. aureus</i>	TSA 32,5 °C±2,5 °C durante 18-24h	1x10 <sup>7</sup> -1x10 <sup>8</sup>	0,5/0,080	TSA 32,5 °C±2,5 °C, ≤ 3 dias
	<i>B. subtilis</i>			0,5/0,200	
	<i>P. aeruginosa</i>			0,5/0,075	
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA 22,5 °C±2,5 °C durante 2-3 dias	1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>7</sup>	5,0/0,650	SDA 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias
	<i>A. brasiliensis</i>	SDA 22,5 °C±2,5 °C durante 5-7 dias		6,5/1,250	

## Procedimento

O método vai depender das características físicas do produto em teste. É colocado 10 g ou 10 mL do produto a testar num frasco de 200 mL estéril, e é adicionado 90 mL de neutralizante e caso seja necessário pode-se realizar uma segunda diluição de 1:10 a partir desta. Para produtos que não contem conservantes, o ensaio deve ser efetuado com a adição do diluente. A amostra e a solução de neutralizante ficam em contacto durante 30±15 minutos à temperatura ambiente, de modo a promover a neutralização do conservante. Em seguida é necessário realizar uma diluição de 1:10 em diluente e para os casos em que se preveja uma contaminação da amostra é necessário executar diluições adicionais.

No caso de amostras imiscíveis em água, deve-se homogeneizar a amostra com 300 µL de polissorbato 80. Esta mistura pode ser aquecida no máximo a 40° C ou em alguns casos a 45 °C, durante 30 minutos no máximo. O neutralizante a adicionar, na mesma proporção anteriormente referida de 1:10, é o neutralizante sem polissorbato, sendo que este deve ser previamente aquecido. Assim como anteriormente, para os casos de amostras sem conservantes é adicionado diluente, sendo este previamente aquecido.

Neste momento pode-se proceder à incorporação, em duplicado, de 1 mL de cada uma das diluições em meio de cultura apropriado. As placas de TSA (bactérias) são incubadas durante 3 a 5 dias, a 30 a 35 °C e as placas de SDA (fungos) durante 5 a 7 dias, a 20 a 25 °C.

## Cálculo QM

Realiza-se a contagem do número de UFC nas placas selecionando as diluições que apresentam até 250 UFC para bactérias e até 50 UFC para fungos. De seguida é necessário calcular a média de UFC sobre o fator de diluição de contagem a multiplicar pelo volume testado (normalmente 1 mL) que corresponde ao número de UFC de microrganismos presentes por mL ou por g de formulação. Os aeróbios totais correspondem à contagem de todas as colónias que cresçam na placa de TSA, incluindo fungos. Os fungos e leveduras totais correspondem à contagem de todas as colónias que cresçam na placa de SDA, incluindo bactérias. Em alguns casos pode ocorrer ausência de crescimento.

## Interpretação de resultados

Quando um limite é referido numa norma é interpretado da seguinte forma:

- $10^2$  microrganismos: valor máximo aceitável  $2 \times 10^2$ ,
- $10^3$  microrganismos: valor máximo aceitável  $2 \times 10^3$ , e assim por diante.

Após o cálculo é necessário verificar a conformidade dos valores com os limites de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0. A classificação é sempre realizada de acordo com a aplicação do produto, como por exemplo, para produtos de aplicação cutânea e preparações aquosas para uso oral, a contagem dos germes aeróbios viáveis totais deve ser no máximo de  $2 \times 10^2$  UFC de bactérias e  $2 \times 10^1$  UFC de fungos e leveduras por grama ou mililitro de formulação. Para preparações não aquosas para uso oral, a contagem dos germes aeróbios viáveis totais deve ser no máximo,  $2 \times 10^3$  UFC de bactérias e  $2 \times 10^2$  UFC de fungos e leveduras por grama ou mililitro de formulação.

### 6.2.2. Teste de QM de acordo com a ISO 21149:2017 e ISO 16212:2017

Soluções utilizadas, preparadas de igual modo que em 6.1.:

- Diluente;
- Solução de polissorbato;
- Neutralizante completo;
- Neutralizante sem polissorbato;
- Meio de cultura *Sabouraud dextrose agar* (SDA).

## Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos

O procedimento da preparação da cultura de trabalho é semelhante ao utilizado para produtos farmacêuticos, cosméticos e dispositivos médicos (Farmacopeia Europeia 9.0<sup>30</sup>), com a diferença das condições de preparação do estudo, representadas na Tabela 22, e de um passo adicional, onde são efetuadas diluições da suspensão inicial, de 1:10 em diluente até à diluição de 10<sup>-4</sup>.

Tabela 22: Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo

	Microrganismo	Condições de incubação das culturas de trabalho	Absorvância 600nm	Condições de incubação das placas em teste
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA 22,5 °C ± 2,5 °C durante 18-24h	5,0/0,650	SDA 22,5 °C ± 2,5 °C, 5-7 dias

## Eficácia do neutralizante

O procedimento é semelhante ao da Farmacopeia Europeia 9.0<sup>30</sup> no subcapítulo 6.2.1, a única diferença é na quantidade de produto a testar, pois são utilizados dois tubos de 15 mL estéreis, e na incorporação. Neste caso é inoculado 1 mL da diluição 10<sup>-4</sup> preparada anteriormente, esta é misturada com auxílio do vortex e só depois é que se procede à incorporação, em duplicado, de 1 mL em meio SDA segundo as normas.

Também são preparados 2 controlos como no subcapítulo 6.2.1. São efetuados nas mesmas condições, mas substituindo a amostra por 1 mL de diluente, de forma a ter um controlo. Nos casos em que não foi utilizado neutralizante o controlo é feito com diluente, completando o volume para 10 mL num tubo de diluente e inoculando com o microrganismo nas mesmas condições.

A eficácia do neutralizante é demonstrada da mesma forma que em 6.2.1.

## Procedimento

O procedimento é semelhante ao da Farmacopeia Europeia<sup>30</sup>, apenas difere na quantidade e na incorporação. São colocados 1g ou 1 mL do produto a testar num tubo de 10 mL estéril, e adicionados 9 mL de neutralizante. Para as amostras imiscíveis em água procede-se de igual modo que em 6.2.1.

A incorporação é realizada em duplicado, com 1 mL de cada uma das diluições em SDA e é incubada a  $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$  em aerobiose durante cinco a sete dias.

## Cálculo QM

Procede-se à contagem do número de UFC nas placas selecionando as diluições que apresentam entre 15 e 150 UFC.

É necessário calcular o número de microrganismos (N) presentes na amostra (S) utilizando a:

- média aritmética das contagens obtidas a partir dos duplicados na Equação 4, se apenas se realizar uma diluição da amostra, ou
- média ponderada das contagens obtidas a partir de duas diluições sucessivas (Equação 5)

$$N = \frac{m}{V \times d} \quad (4)$$

$$N = \frac{\bar{x}_c}{V \times d} \quad (5)$$

Onde:

m é a média aritmética das contagens obtidas a partir dos duplicados

V é o volume aplicado a cada placa de petri

d é o fator de diluição que corresponde à diluição realizada para a preparação inicial da amostra ou à primeira diluição de contagem

c é o número de colónias numa placa

Esta média ponderada é obtida através da Equação 6.

$$\bar{x}_c = \frac{\sum c}{n_1 + 0,1 \times n_2} \quad (6)$$

Onde:

$\Sigma c$ , corresponde ao somatório das colónias contadas em todas as placas de petri das duas diluições sucessivas

$n_1$  é o número de placas de petri contadas para a primeira diluição da amostra ( $10^{-1}$ ) ou para a primeira diluição de contagem

$n_2$  é o número de placas de petri contadas para a segunda diluição da amostra ( $10^{-2}$ ) ou para a segunda diluição de contagem.

Quando o número de UFC for superior a 15 e inferior a 150 na contagem da placa, o resultado deve ser expresso tendo em consideração (onde  $S$  é a massa ou volume da amostra):

- a utilização de 1 g ou 1 mL de  $S$  e 1 mL de  $V$ , o número de bactérias mesófilas aeróbias por mL ou por grama de amostra é  $N/S$ .

Se o número de UFC for inferior a 15 na contagem da placa, o resultado deve ser expresso tendo em consideração:

- a utilização de 1 g ou 1 mL de  $S$  e 1 mL de  $V$ , o número de bactérias mesófilas aeróbias estimado por mL ou por grama de amostra é  $N/S$ .

Se não forem observadas colónias, o resultado deverá ser reportado como  $\leq 10$  UFC.

## Interpretação de resultados

Depois do cálculo é necessário interpretar os resultados e classificar a QM de acordo com os critérios definidos na ISO 21149<sup>32</sup>:

- Categoria 1: produtos que sejam formulados para bebés e para a zona em torno dos olhos, o número de UFC de aeróbios totais deverá ser de  $< 2 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> ou g de produto.
- Categoria 2: outros produtos, número de UFC de aeróbios totais deverá ser de  $< 2 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> ou g de produto.

### 6.3. Challenge Test

Assim como no ensaio da qualidade microbiológica, existem 2 tipos de teste conforme a aplicação e as normas. Para amostras de produtos farmacêuticos, cosméticos e dispositivos médicos, o ensaio é realizado de acordo com a monografia da Farmacopeia Europeia 9.0<sup>30</sup> e para a avaliação da proteção antimicrobiana em produtos cosméticos, o ensaio apresenta como base a norma ISO 11930:2019<sup>31</sup>.

Este método tem como princípio a avaliação da capacidade conservante de uma formulação e é baseada na inoculação da mesma com uma suspensão calibrada de microrganismos definidos como relevantes, habitualmente são utilizados o *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*. Após inoculação, segue-se o armazenamento a uma temperatura especificada.

O número de microrganismos viáveis é determinado em intervalos definidos, ao longo de um período de tempo definido por cada norma para cada microrganismo. É calculado em cada um desses intervalos definidos e para cada organismo, a redução logarítmica do seu crescimento. Os resultados são depois comparados com os requisitos mínimos definidos por cada uma das normas.

### 6.3.1. CT de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0

#### Soluções, reagentes e microrganismos

As soluções e reagentes utilizados no ensaio, são preparadas tal como descrito em 6.2.1:

- Solução de polissorbato;
- Neutralizante completo;
- Neutralizante sem polissorbato;
- Meio de cultura TSA;
- Meio de cultura SDA;
- Soro fisiológico.

Microrganismos utilizados:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027;
- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404;
- *Escherichia coli* ATCC 8739;
- *Zygosaccharomyces rouxii* NCYC 381.

#### Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos

É preparada uma cultura para cada microrganismo a partir das culturas stock, nas condições definidas na Tabela 21. A partir desta, faz-se uma segunda cultura e eventualmente uma terceira (caso necessário) que servirão como culturas de trabalho.

Para a preparação das suspensões de inóculo de bactérias e leveduras, é colocado 10 mL de soro fisiológico estéril num tubo de falcon de 15 mL estéril e é ressuspensa uma amostra da cultura a partir da cultura de trabalho com a ajuda de uma ansa estéril. O tubo é agitado no vórtex durante três minutos no máximo, de modo a homogeneizar a suspensão.

A absorvância da suspensão é ajustada utilizando a solução de diluente, tendo em consideração os valores apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Condições de incubação, meios de cultura, tempos e temperaturas dos microrganismos nas condições de testes de preparação do estudo

	Microrganismo	Condições de incubação das culturas de trabalho	UFC mL <sup>-1</sup> (inóculo)	Condições de incubação das placas para determinação do inóculo	Absorvância a 600nm
Bactérias	<i>S. aureus</i>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 18-24h	1×10 <sup>8</sup>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	0,5/0,08
	<i>P. aeruginosa</i>				
	<i>E. coli</i>				
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA, 22,5±2,5 °C durante 48h	1×10 <sup>8</sup>	SDA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	6,0/0,8
	<i>A. brasiliensis</i>	SDA, 22,5±2,5 °C durante 7 dias		SDA, 22,5±2,5 °C durante 3-5 dias	7,5/1,35

Para a preparação do inóculo de *A. brasiliensis* proceder como no subcapítulo 6.1.1, sendo que as condições da cultura de trabalho utilizada (SDA) serão as da Tabela 23.

As concentrações das suspensões de inóculos N, devem ser verificadas no momento de utilização. Deve-se realizar diluições de 1:10 em diluente (até à 10<sup>-7</sup>) e devem ser plaqueadas em duplicado, por incorporação nos meios de cultura descritos na Tabela 23, até à diluição de 10<sup>-7</sup>. As placas devem ser incubadas nas condições referidas na mesma tabela e no final deve ser realizado as contagens do número de UFC.

## Eficácia do neutralizante

A eficácia do neutralizante é realizada na diluição 10<sup>-4</sup> de todos os microrganismos, de igual modo que em 6.2.1. Na incorporação devem ser respeitadas as condições de incubação apropriadas a cada microrganismo definido na Tabela 23.

Assim como no subcapítulo 6.2.1, a eficácia do neutralizante é demonstrada através da verificação da diferença no número de UFC calculado em N<sub>vf</sub> (média de UFC nas duas placas de controlo na presença da formulação e de neutralizante) e em N<sub>vn</sub> (média de UFC nas duas placas de controlo na ausência da formulação e na presença do neutralizante), esta diferença

não pode ser duas vezes superior e as contagens entre duplicados não devem diferir mais do que 50%.

Caso os resultados não estejam de acordo com os requerimentos é necessário testar um neutralizante diferente ou utilizar a técnica de filtração em membrana.

## **Ensaio Eficácia do conservante**

### **Inoculação das amostras no tempo inicial ( $t_0$ )**

São colocados 20 g ou 20 mL da preparação em 4 tubos de Falcon de 50 mL estéreis (ou em 5 no caso das soluções orais) e são inoculados, em separado, cada um dos microrganismos, adicionando 200  $\mu$ L da suspensão inicial de inóculo preparada (inóculo final na preparação entre  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). De modo a obter uma distribuição homogénea, deve-se misturar com a ansa em cada respetivo tubo.

Armazenar os tubos inoculados a  $22,5 \pm 2,5$  °C durante o tempo de estudo, protegidos da luz e com as tampas ligeiramente abertas.

### **Leituras em tempos específicos**

Retirar 1 mL de amostra inoculada com cada microrganismo a executar em cada momento de leitura e adicionar a 9 mL de neutralizante, de acordo com a pesquisa de cada microrganismo indicada na Tabela 24 e 25. Vortexar até homogeneizar,

Caso, só se tenha verificado eficácia do neutralizante para a diluição 1:100, deve ser efetuada uma segunda diluição em neutralizante.

Para amostras oleosas, estas devem ser dissolvidas em 3 mL de polissorbato 80 antes da adição do neutralizante. Caso se opte pela pesagem esta deve ser realizada em condições de assepsia e recorrendo a ansas estéreis para a transferência do produto. O neutralizante a utilizar nestas amostras é o neutralizante sem polissorbato. Deixar em contacto cerca de  $30 \pm 15$  minutos à temperatura ambiente.

Efetuar diluições de 1:10 em diluente a iniciar na primeira diluição do neutralizante ou na diluição previamente verificada como eficaz no passo de neutralização.

Proceder à incorporação, em duplicado, de 1 mL de cada uma das diluições em meio de cultura apropriado segundo indicações da Tabela 24 e 25.

Tabela 24: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais

	Microrganismo	Condições de incubação das placas em teste	t <sub>2</sub> dias	t <sub>7</sub> dias	t <sub>14</sub> dias	t <sub>28</sub> dias
Bactérias	<i>S. aureus</i>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	Sim	Sim	Sim	Sim
	<i>P. aeruginosa</i>					
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA, 32,5±2,5 °C durante 24-48h	Não	Não	Sim	Sim
	<i>A. brasiliensis</i>	SDA, 22,5±2,5 °C durante 24-48h	Não	Não	Sim	Sim

Tabela 25: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações orais

	Microrganismo	Condições de incubação das placas em teste	t <sub>14</sub> dias	t <sub>28</sub> dias
Bactérias	<i>S. aureus</i>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	Sim	Sim
	<i>P. aeruginosa</i>			
	<i>E. coli</i>			
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA, 32,5±2,5 °C durante 24-48h	Sim	Sim
	<i>A. brasiliensis</i>	SDA, 22,5±2,5 °C durante 3-5 dias	Sim	Sim

### 6.3.2. CT de acordo com a ISO 11930:2019

#### Soluções, reagentes e microrganismos

Soluções e reagentes utilizados, tal como descrito em à 6.2.1.:

- Diluente;
- Solução de polissorbato;
- Neutralizantes;
- Meio de cultura para bactérias - TSA;
- Meio de cultura para *C. albicans* - SDA;
- Meio de cultura para *A. brasiliensis* - *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Microrganismos utilizados:

- *Staphylococcus aureus* ATCC6538;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027;
- *Escherichia coli* ATCC8739;
- *Candida albicans* ATCC10231;
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC16404.

## Preparação das culturas de microrganismos e suspensões de inóculos

O procedimento da preparação da cultura de trabalho é igual ao procedimento descrito no subcapítulo 6.2.1, sendo que as condições de incubação para cada microrganismo encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais

		UFC mL <sup>-1</sup> (inóculo)	Condições de incubação das placas para determinação do inóculo	Absorvância 600 nm	Diluições plaqueadas por incorporação para contagem UFC
Bactérias	<i>S. aureus</i>	1×10 <sup>7</sup> - 1×10 <sup>8</sup>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	0,5/0,08	10 <sup>-6</sup> -10 <sup>-7</sup>
	<i>P. aeruginosa</i>			0,5/0,075	
	<i>E. coli</i>			0,5/0,08	
Fungos	<i>C. albicans</i>	1×10 <sup>6</sup> - 1×10 <sup>7</sup>	SDA, 32,5 ±2,5 °C durante 24-48h	6,0/0,8	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-7</sup>
	<i>A. brasiliensis</i>		SDA, 22,5±2,5 °C durante 3-5 dias	7,5/1,35	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup>

## Eficácia do neutralizante

O procedimento apresenta diversas semelhanças em relação ao procedimento descrito em 6.2.1. Neste caso é utilizada a diluição 10<sup>-5</sup> para as bactérias e 10<sup>-4</sup> para fungos da suspensão de inóculo (N) preparada anteriormente, de modo a obter uma suspensão com cerca de 10<sup>3</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (inóculo) de cada microrganismo.

As concentrações das suspensões de inóculos N, devem ser verificadas no momento de utilização. Deve-se realizar diluições de 1:10 em diluente (até à 10<sup>-7</sup>) e devem ser plaqueadas

em duplicado, por incorporação nos meios de cultura descritos na Tabela 26, até à diluição de  $10^{-7}$ . As placas devem ser incubadas nas condições referidas na mesma tabela e no final deve ser realizado as contagens do número de UFC.

Assim como na secção 6.2.1, é necessário demonstrar a eficácia do neutralizante.

## Ensaio Eficácia do conservante

### Inoculação das amostras em $T_0$

É adicionado a cada recipiente 200 $\mu$ l de inóculo calibrado de forma a obter entre  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> ou g para as bactérias, e entre  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> ou g para os microrganismos *C. albicans* e *A. brasiliensis* na formulação (concentração final). Homogeneizar cuidadosamente com auxílio de uma ansa estéril de forma a garantir uma distribuição homogénea do inóculo.

A concentração inicial dos microrganismos presente no produto inoculado,  $N_0$ , é calculado utilizando os resultados das contagens do inóculo calibrado,  $N$ .

Os tubos inoculados devem ser armazenados a  $22,5 \pm 2,5$  °C durante o tempo de estudo, protegidos da luz e com as tampas ligeiramente abertas.

### Leituras em tempos específicos

Em cada intervalo de amostragem especificado e de acordo com o microrganismo teste, recolher 1 g ou 1 mL da formulação inoculada para 9 mL de neutralizante. Misturar até ficar homogéneo. Se a eficácia do neutralizante apenas tiver sido demonstrada na diluição 1:100, realizar uma segunda diluição 1:10 em neutralizante. Deixar em contacto durante  $30 \pm 15$  minutos à temperatura ambiente. A partir da diluição 1:10 em neutralizante (ou 1:100, no caso de produtos onde a eficácia do neutralizante só foi demonstrada na diluição 1:100), fazer diluições sucessivas 1:10 em diluente e contar os microrganismos sobreviventes. São feitas diluições até à  $10^{-4}$  (assim como foi procedido na secção 6.3.1)

Proceder à incorporação, em duplicado, de 1 mL de cada uma das diluições em meio de cultura e incubar nas condições representadas na Tabela 27.

Tabela 27: Condições de incubação e tempos de execução e leituras das amostras inoculadas com cada um dos microrganismos em teste para preparações tópicas e locais

	Microrganismo	Condições de incubação das placas em teste	t <sub>7</sub> dias	t <sub>14</sub> dias	t <sub>28</sub> dias
Bactérias	<i>S. aureus</i>	TSA, 32,5 ±2,5 °C durante 48-72h	Sim	Sim	Sim
	<i>P. aeruginosa</i>				
	<i>E. coli</i>				
Fungos	<i>C. albicans</i>	SDA, 32,5±2,5 °C durante 48-72h	Sim	Sim	Sim
	<i>A. brasiliensis</i>	SDA, 22,5±2,5 °C durante 3-5 dias	Não	Sim	Sim

## 6.4. Cálculos do ensaio CT

O cálculo da eficácia do conservante é igual para ambos os ensaios da Farmacopeia Europeia 9.0<sup>30</sup> e da ISO 11930:2019<sup>31</sup>.

Depois de realizados cada momento de leitura, durante o tempo de incubação predefinidos na Tabela 24 e 25 (Farmacopeia Europeia 9.0<sup>30</sup>) e Tabela 19 (ISO 11930:2019<sup>31</sup>) e de se efetuar a contagem e o registo do número de UFC em cada diluição em teste, de acordo com a Equação 4 em 6.2.2.

### 6.4.1. Contagem nas suspensões de trabalho

Após incubação, é necessário contar o número de UFC, em cada placa, referente a cada diluição. São reservadas as placas que contêm entre 30-300 UFC para bactérias e *C. albicans* e entre 15-150 UFC para *A. brasiliensis*. Quando o número de UFC ultrapassar estes valores deve ser indicado da seguinte forma “>300 UFC” ou “>150 UFC”, conforme o caso, e do mesmo modo “<30 UFC” ou “<15 UFC”.

O cálculo do número de microrganismos no tempo t<sub>0</sub> é feito da seguinte forma:

$$N_0 = \frac{N}{100} \quad (7)$$

Onde:

N é a média do número de UFC nas duas placas a dividir pelo fator de diluição na qual se realizaram as contagens x volume inoculado no meio (habitualmente 1 mL)

$N_0$  é o número de microrganismos inoculados na formulação no tempo  $t_0$

$N_0$  deve situar-se entre  $10^5$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0. E deve situar-se entre  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> para as bactérias e entre  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> para os microrganismos *C. albicans* e *A. Brasiliensis*, de acordo com a norma ISO 11930:2012.

### 6.4.2. Contagem dos microrganismos em cada tempo de análise

Cálculo de  $N_x$ , que corresponde ao número de UFC de microrganismos recuperados por mL ou por g de formulação contaminada em cada momento de análise  $t_x$ , de acordo com:

$$N_x = \frac{\bar{c}}{V \times d} \quad (8)$$

Onde:

$\bar{c}$  é o número médio de colónias contadas em duplicado nas placas

V é o volume em mL aplicado a cada placa de petri (normalmente é de 1 mL)

d é o fator de diluição que corresponde à diluição retida e contida

### 6.4.3. Redução logarítmica

A redução logarítmica é calculada de acordo com:

$$R_x = \text{Log}N_0 - \text{Log}N_x \quad (8)$$

Onde:

$N_0$  é o número de microrganismos inoculados na formulação no tempo  $t_0$

$N_x$  é o número de microrganismos recuperados em cada tempo de amostragem

Em algumas situações poderá não se verificar redução, sendo possível haver um aumento na contagem de microrganismos.

## 6.5. Critérios para a interpretação de resultados e classificação da formulação

### 6.5.1. Critérios de acordo com a Farmacopeia Europeia 9.0

São estabelecidos dois critérios:

- Critério A, a formulação apresenta perfil de eficácia de conservante recomendado pela Farmacopeia Europeia 9.0;<sup>30</sup>
- Critério B, a formulação apresenta perfil de eficácia de conservante alternativo recomendado na Farmacopeia Europeia 9.0.<sup>30</sup>

Caso o produto não respeite nenhum destes critérios, não satisfaz os requerimentos desta Farmacopeia. Caso a eficácia do neutralizante não seja demonstrável para algumas estirpes, mesmo tendo em conta testes adicionais (como o aumento da diluição da amostra ou teste por membrana filtrante), pode-se classificar a formulação como não suscetível de ser contaminada por estas estirpes. Para as restantes estirpes os resultados devem ser apresentados com base nos critérios A ou B e a formulação classificada de acordo com o critério resultante. Estes critérios são expressos em redução logarítmica e a classificação é efetuada de acordo com os critérios estabelecidos na Tabela 28 e 29.

Tabela 28: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante nas preparações tópicas e locais (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior)

Valores de redução logarítmica								
Microrganismos	Bactérias				<i>A. brasiliensis</i>			
Tempo de análise	$t_2$	$t_7$	$t_{14}$	$t_{28}$	$t_2$	$t_7$	$t_{14}$	$t_{28}$
Critério A	2	3	--	s/A	--	--	2	s/A
Critério B	--	--	--	s/A	--	--	1	s/A

Tabela 29: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante nas preparações orais (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior)

Microrganismos	Bactérias		<i>A. brasiliensis</i>	
	t <sub>14</sub>	t <sub>28</sub>	t <sub>14</sub>	t <sub>28</sub>
Critério A	3	s/A	1	s/A

## 6.5.2. Critérios de acordo com a ISO 11930:2019

São estabelecidos dois critérios:

- Critério A, a formulação encontra-se protegida contra a proliferação microbiana que podem apresentar potenciais riscos para o utilizador, não sendo necessário considerar fatores adicionais;
- Critério B, a formulação encontra-se num nível de proteção aceitável, se a análise do risco demonstrar a existência de fatores controláveis não relacionados com a formulação, indicando que o risco microbiológico é tolerável para o produto cosmético.

Caso geral, quando a eficácia do neutralizante é demonstrada para todas as estirpes. Para cada microrganismo, devem ser comparados os valores de  $R_x$  com os critérios A e B e de acordo com a Tabela 30:

- Se todos os valores de redução cumprirem o critério A, a formulação satisfaz os requisitos A do ensaio de eficácia dos conservantes e cumpre os requisitos definidos na Norma Internacional ISO11930.<sup>31</sup>
- Se todos os valores de redução apenas cumprirem o critério B, a formulação satisfaz o requisito B do ensaio de eficácia de conservantes, e são necessárias justificações adicionais que demonstrem que o produto satisfaz os requisitos definidos na Norma Internacional ISO11930.<sup>31</sup>
- Se um ou mais valores de redução não satisfaça o critério A ou B, a formulação não satisfaz os requisitos do ensaio de eficácia de conservantes. O produto deverá ser avaliado exclusivamente em função do risco biológico.

Se a eficácia do neutralizante não foi demonstrada para algumas estirpes, apesar da realização de ensaios adicionais, a formulação pode ser considerada como não suscetível à contaminação pelos microrganismos teste. É necessário reportar o resultado como “não suscetíveis à contaminação”.

Tabela 30: Valores de redução logarítmica para a avaliação dos critérios de classificação da capacidade conservante da formulação cosmética (s/A - sem aumento no nº UFC relativamente à contagem no tempo anterior)

Valores de redução logarítmica								
Microrganismos	Bactérias			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Tempo de análise	t <sub>7</sub>	t <sub>14</sub>	t <sub>28</sub>	t <sub>7</sub>	t <sub>14</sub>	t <sub>28</sub>	t <sub>14</sub>	t <sub>28</sub>
Critério A	≥3	≥3 e s/A	≥3 e s/A	≥1	≥1 e s/A	≥1 e s/A	≥0	≥1
Critério B	--	≥3	≥3 e s/A	--	≥1	≥1 e s/A	≥0	≥0 e s/A

## 6.6. Resultados das amostras

Na Tabela 31, está a apresentação de um resultado de uma amostra de um cosmético semisólido, codificada como AM0\_16052019 (Amostra\_ Data do ensaio). A amostra AM0\_16052019, apresenta uma qualidade microbiológica conforme indicado na *Cosmetics Europe* na norma ISO 11930:2019.<sup>31</sup>

Tabela 31: Aeróbios totais, bactérias e fungos-leveduras (UFC) e Pesquisa de microrganismos específicos

Ensaio	Método	Contagem UFC g <sup>-1</sup>	Resultado UFC g <sup>-1</sup>
Bactérias aeróbias mesófilas 32,5 °C	ISO 21149:2017	0	≤10
Fungos leveduras a 22,5 °C	ISO 16212:2017	0	≤10
Aeróbios totais	ISO 16212:2017/ ISSO 21149:2017	0	≤10

Os resultados do ensaio *Challenge Test* estão apresentados na tabela seguinte (Tabela 32), estando incluindo o nº de UFC g<sup>-1</sup> registado para cada microrganismo ao longo do tempo e a respetiva redução logarítmica tendo por base a concentração do inóculo na amostra no início do ensaio.

Tabela 32: Contagens de UFC g<sup>-1</sup> de formulação e respetiva variação logarítmica ( $\Delta\log$ ) tendo por referência a concentração do inóculo inicial na amostra;

Microrganismo	7 dias (UFC)	7 dias ( $\Delta\log$ )	14 dias (UFC)	14 dias ( $\Delta\log$ )	28 dias	28 dias ( $\Delta\log$ )	Critério
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	00E+00	5,95	00E+00	5,95 (s/A)	00E+00	5,95 (s/A)	A
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	00E+00	5,96	00E+00	5,96 (s/A)	00E+00	5,96 (s/A)	A
<i>E. coli</i> ATCC 8739	00E+00	6,17	00E+00	6,17 (s/A)	00E+00	6,17 (s/A)	A
<i>C. Albicans</i> ATCC 10231	00E+00	4,95	00E+00	4,95 (s/A)	00E+00	4,95 (s/A)	A
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	--	--	00E+00	4,74	00E+00	4,74 (s/A)	A

Os resultados apresentados na Tabela 32 evidenciam que para a amostra AM0\_16052019 e para os cinco microrganismos em estudo, a redução da proliferação microbiana ocorreu de acordo com o critério A definido na norma ISO 11930:2019<sup>31</sup> e que diz respeito à eficácia recomendada. Deste modo, o estudo realizado na amostra permite concluir que o referido produto cumpre os requisitos da norma ISO 11930<sup>31</sup> de acordo com o critério A no que diz respeito à proteção do produto contra a proliferação microbiana para todos os microrganismos. Na tabela onde está s/A significa sem aumento no número de UFC em comparação com leitura anterior.

## Bibliografia

1. Jenke, D. & Carlson, T. A Compilation of Safety Impact Information for Extractables Associated with Materials Used in Pharmaceutical Packaging, Delivery, Administration, and Manufacturing Systems. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **68**, 407–455 (2014).
2. Legrand, P. *et al.* Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **155**, 298–305 (2018).
3. Norwood, D. L. *et al.* Best practices for extractables and leachables in orally inhaled and nasal drug products: An overview of the PQRI recommendations. *Pharm. Res.* **25**, 727–739 (2008).
4. Jenke, D. Safety risk categorization of organic extractables associated with polymers used in packaging, delivery and manufacturing systems for parenteral drug products. *Pharm. Res.* **32**, 1105–1127 (2015).
5. Petruševski, V. *et al.* Development of complementary HPLC-DAD/APCI MS methods for chemical characterization of pharmaceutical packaging materials. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **124**, 228–235 (2016).
6. Zweiben, C. Characterization of Extractables and Leachables for Parenteral Drug Products. *Powerpoint Present.* 1–38 (2010).
7. Broschard, T. H. *et al.* Assessing safety of extractables from materials and leachables in pharmaceuticals and biologics – Current challenges and approaches. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **81**, 201–211 (2016).
8. Alan Wood. Extractables and leachables analysis of pharmaceutical products. (2017). Available at: <https://www.outsourcing-pharma.com/Headlines/Promotional-Features/Extractables-and-leachables-analysis-of-pharmaceutical-products>.
9. Ball, D. J., Norwood, D. L., Stults, C. L. M. & Nagao, L. M. Leachables and Extractables Handbook: Safety Evaluation, Qualification, and Best Practices Applied to Inhalation Drug Products. *Leachables Extr. Handb. Saf. Eval. Qualif. Best Pract. Appl. to Inhal. Drug Prod.* (2012). doi:10.1002/9781118147672
10. Sastri, V. R. Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements, and Applications: Second Edition. *Plast. Med. Devices Prop. Requir. Appl. Second Ed.* 1–305 (2013). doi:10.1016/C2012-0-05946-7
11. Institui, A. & Oficial, J. O presente regulamento estabelece as normas que os produtos cosméticos disponíveis no mercado. **50**, (2005).

12. Cee, R. & Do, N. ► B Regulamento (Cee) N. 1–65 (1998).
13. Committee, S. & Sccp, C. P. Scientific Committee on Consumer Products SCCP THE SCCP ' S NOTES OF GUIDANCE FOR THE TESTING OF COSMETIC INGREDIENTS AND THEIR. *October* (2006).
14. Agreed, D. *et al.* Committee for Medicinal Products for Human Use ( Chmp ) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use Guideline on Stability Testing for Applications for Guideline on Stability Testing for Applications for. 1–6 (2005).
15. Em, E. & Com, C. Embalagens e equipamentos em contacto com alimentos. *Métodos FísicoQuímicos para Análise Aliment.* 537–570 (2008).
16. Agreed, D. *et al.* European Medicines Agency (EMA), Guideline on plastic immediate packaging materials. (2005).
17. Jenke, D. Application of Quality by Design (QbD) Principles to Extractables/Leachables Assessment. Establishing a Design Space for Terminally Sterilized Aqueous Drug Products Stored in a Plastic Packaging System. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **64**, 527–535 (2010).
18. Jenke, D. *et al.* *Extractables Characterization for Five Materials of Construction Representative of Packaging Systems Used for Parenteral and Ophthalmic Drug Products. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **67**, (2013).
19. Comissão Europeia. Regulamento (UE) n. ° 10/2011 da Comissão, relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. *J. Of. da União Eur.* (2011).
20. En, B. S. Materials and articles in contact with foodstuffs — Plastics substances subject to limitation —. **3**, (2004).
21. En, B. S. Materials and articles in contact with foodstuffs — Plastics — Part 9: Test methods for overall migration into aqueous food simulants by article filling. (2002).
22. Ridderbecks, J., Specialist, A. & Contact, F. INTERTEK WEBINAR REGULATION ( EU ) 10 / 2011 Staying in compliance. (2018).
23. Comissão Europeia. Regulamento (CE) N° 1935/2004. *J. Of. da União Eur.* 4–17 (2004).
24. Comissão Europeia. Directiva 2006/141/CE da Comissão de 22 de Dezembro de 2006. *J. Of. da União Eur.* **L 401**, 1–33 (2006).
25. 2006, D. 2006/141/CE da comissão de 22 de D. de. Formulas para lactentes e fórmulas de transição e que altera a Directiva 1999/21/CE. *J. Of. da União Eur.* 16–35 (2006).
26. Comissão Europeia. Regulamento (UE) 2016/1416 Da Comissão de 24 de agosto de 2016 que altera e retifica o Regulamento (UE) n.o 10/2011 relativo aos materiais e objetos de matéria

- plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. *J. Of. da União Eur.* (2016). doi:10.2903/j.efsa.2008.699
27. Parenteral and Ophthalmic Drug Products Leachables and Extractables Working Group Study Protocol-Stage 1 Experimental Protocol for Qualitative Controlled Extraction Studies on Material. (2009).
  28. Waters Corporation. Extractables , Leachables , and Food Contact Materials Application Notebook Extractables , Leachables , and Food Contact Materials Testing. *Application Notebook 720005670EN LM-PDF* (2016).
  29. Parenteral and Ophthalmic Drug Products Leachables and Extractables Working Group Issued and Effective Experimental Protocol for Qualitative Controlled Extraction Studies on Material Test Articles Representative of Prefilled Syringe (PFS) and Small Volume. (2011).
  30. Europe, C. of. European Pharmacopoeia 9.0. (2016).
  31. Standardization, I. O. for. ISO 11930:2019. (2019).
  32. Standardization, I. O. for. ISO 21149:2017. (2017).



# Anexo I

## Composição das embalagens usadas para o estudo de Extraíveis e Lixiviáveis

Na Tabela 33 está representada a composição quantitativa do frasco, e na Tabela 34 está representada a composição da tampa.

Tabela 33: Composição quantitativa do frasco.

Matéria Prima	Aplicação
PET: INFINITES82/REMAPET/TEXPET 874-C80	99,72%
RH DACHA AMBER-2	0,28%

Tabela 34: Composição quantitativa da tampa.

Matéria Prima	Aplicação
PP: Moplen HP500N/Moplen RP248R/Moplen RP2380 Teldene	99,21%
UN0052 BLACK	0,79%

### Composição PET

Não contém na sua composição, nenhum dos seguintes compostos:

- Nitratos;
- Nitritos;
- Nitrosaminas;
- Latex;
- Asbestos;
- Aminas aromáticas;
- Parabenos;
- Ftalato;
- Fenóis alquilados;
- Metais.

De acordo com o Anexo II do Regulamento (EC) nº1907/2006 o produto contém 100% de PET *Chemical Abstracts Service* (CAS) 25038-59-9.

Contudo são utilizadas as substâncias listadas na Tabela 35, como monómeros básicos, aditivos, entre outros.

Tabela 35: Substâncias utilizadas no produto com os LME do Regulamento N° 10/2011, aplicado a 1 de maio de 2011.

Número CAS	Nome da Substância	LME mg/kg
100-21-0	PTA- Ácido tereftálico purificado	<0,8
107-21-1	MEG-Etilenoglicol	<6,0
121-91-5	IPA-Ácido isoftálico	<0,8
111-46-6	DEG-Dietilenoglicol	<6,0
1309-64-4	SB203-Trióxido de Antimônio	<0,04
7664-38-2	Ácido fosfórico	ND

### Composição RH DACHA AMBER-2

Pode conter individualmente ou em conjunto, polímeros, aditivos ou colorantes.

Todos os colorantes usados no produto estão em conformidade com os requerimentos e especificações da resolução AP (89) 1, do Conselho da Europa (CoE).

Todos os aditivos e monómeros usados no produto estão listados no Regulamento (CE) n° 10/2011.

É usado neste produto negro de fumo (CAS 1333-86-4) em percentagens de  $\geq 1$  a  $< 3$ , sendo este ingrediente não classificado no Regulamento (CE) N°1272/2008.

### Composição UN0052 BLACK

Os monómeros, aditivos e substâncias usados no produto estão listadas na Tabela 36.

Tabela 36: Substâncias usadas no produto e respetivo LME

Substância MCA n°	Nome da Substância	LME mg/kg
13630	Butadieno	Não detetável
68320	3-(3,5-Di-terc-butil- 4-hidroxifenil) propionato de octadecilo	6
40020	2,4-Bis(octiltiometil)-6-metilfenol	5
10120	Acetato de vinilo	12

De acordo com o Anexo II do Regulamento, substâncias como o Zinco, não devem libertar quantidades superior a 25mg Kg<sup>-1</sup>, o documento esclarece que a concentração deste no artigo não pode exceder a percentagem máxima de 10% m/m. Não são utilizados aditivos de duplo uso.

Todos os colorantes usados no produto estão aprovados pela FDA nos Estados Unidos, no Código de Regulações Federais (CFR) § 178.3297 (colorantes para polímeros). A concentração destes no material plástico não podem exceder a percentagem máxima de 10 m/m. O UN0052 BLACK está em conformidade com a Diretiva 94/62/EEC do Regulamento da “Coalition of Northeastern Governors” (CONEG), que limita o conteúdo de metais pesados, como o chumbo, cádmio, mercúrio e crómio VI, sendo este no máximo 100ppm.

As seguintes substâncias listadas, não são usadas como matéria-prima nem devem ser geradas no processo de fabricação e, portanto, não são esperadas no produto final. Contudo, os fornecedores e fabricantes não realizam análises regulares.

- Substâncias persistentes, bio acumulativas, tóxicas;
- Substâncias cancerígenas, mutagênicas, tóxicas para a reprodução (CMR) do tipo 1 e 2;
- Pigmentos diarilídeos;
- Ftalatos;
- Látex;
- Bisfenol A;
- Nonilfenol;
- Hidróxido de níquel (II);
- Sulfato de níquel (II);
- Óxido de níquel (III);
- Óxido de antimônio (III);
- Óxido de cobalto (III);
- Óxido de berílio (II);
- Pentóxido de Vanádio;
- Silikon;
- Tetrabromobisfenol A (TBBA);
- Benzofenona CAS 119-61-9;
- 4-hidroxibenzofenona;
- 4-metilbenzofenona;
- Isopropil tioxantono (ITX) CAS 83846-86-0;
- Dimetil fumarato (DMF).

## Composição PP

Este produto pode conter um ou mais componentes com LME especificados no Regulamento (CE) 10/2011.

Este produto tem na sua constituição resinas que estão em conformidade com a diretiva 21 CFR177-1520 da FDA, além disso os fornecedores esclarecem que pelo conhecimento deles, todos os ingredientes usados neste produto atendem aos requisitos dos respectivos regulamentos da FDA.

Contém uso duplo de aditivos e pode conter 1 ou mais dos seguintes aditivos:

- E470a: Sais de Cálcio ou ácidos gordos
- E471: Mono- e di-gliceridos ou ácidos gordos

Não contém latex nem são usados químicos de depleção de ozono.

Não é usado cádmio, cromo (IV), chumbo ou mercúrio na fabricação deste ou na formulação do produto.

A poliolefina não requer o uso de plastificantes, estes são usados para tornar os plásticos mais flexíveis e macios, mas estão associados a potenciais problemas de saúde, de tal modo que não são intencionalmente usados na fabricação ou formulação das resinas que compõem o produto.

As substâncias listadas em seguida, não são intencionalmente usadas na fabricação ou na formulação deste produto, sendo que não são esperadas no produto. No entanto, o produto não foi testado para as seguintes substâncias:

- Benzotriazole CAS 3846-71-7
- Benzotiazol-2-tiol CAS 149-30-4
- Acrilamida CAS 79-06-1
- Acroleína CAS 107-02-8
- Aminas Aromáticas
- Asbestos;
- Corantes azo e pigmentos;
- Benzeno CAS 71-43-2;
- Benzofenona CAS 119-61-9;
- Bisfenol A CAS 80-05-7 e outros derivados deste;
- Terc-Butil-4-hidroxianisolo (BHA) CAS 121-00-6 e 25013-16-5;
- 2,6-Di-terc-butil-p-cresol (BHT) CAS 128-37-0;
- Violeta cristal CAS 548-62-9;
- Ácido cianúrico CAS 108-80-5;
- Epicloridrina CAS 106-89-8;
- Formaldeído CAS 50-00-0, pode ser formado, sob condições específicas, durante o processamento da resina;
- Fluo carbonetos;
- Ouro CAS 7440-57-5;
- Isopropil tioxantono (ITX) CAS 83846-86-0;
- Melamina CAS 108-78-1;
- Nonilfenóis CAS 25154-52-3;
- Peróxido;
- Ácido perfluorooctanoico (PFOA), CAS 335-67-1;
- Sulfonato de perfluorooctano (PFOS) CAS 1763-23-1;
- Polibromato bifenil (PBB);

- Éteres difenilicos polibromados (PBDE);
- Terfenil polibromado (PBT);
- Bifenilpoliclorado (PCB);
- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH);
- Poliestireno;
- Policloreto de vinilo (PVC) CAS 9002-86-2;
- Cloreto de polivinilideno (PVDC) CAS 9002-85-1;
- Silicone
- Monómero de estireno CAS 100-42-5;
- Dióxido de enxofre CAS 7446-09-5;
- Sulfureto e derivados;
- Dióxido de estanho CAS 8062-08-6;
- Cloreto de vinilo CAS 75-01-4;

Não contém nanomateriais, plastificantes nem derivados epóxi, DMF nem triclosano.

## Anexo II

### Registo das massas usadas para o cálculo da migração global (subcapítulo 4.2)

Tabela 37: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 20°C durante 10 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	19,0752	19,0749
Branco etanol 2	17,0344	17,0342
Etanol 1	17,3211	17,3212
Etanol 2	20,0511	20,0507
Etanol 3	19,1024	19,1019
Branco Água 1	19,6773	19,6768
Branco Água 2	20,1056	20,1052
Água 1	20,7640	20,7636
Água 2	19,2575	19,2573
Água 3	20,9425	20,9421
Branco Ácido Acético 1	17,0330	17,0325
Branco Ácido Acético 2	19,2026	19,2020
Ácido Acético 1	18,7699	18,7694
Ácido Acético 2	19,2029	19,2025
Ácido Acético 3	20,5387	20,5385
Ácido Acético Duplicado 1	19,8040	19,8038
Ácido Acético Duplicado 2	19,2294	19,2289
Ácido Acético Duplicado 3	17,4924	17,4919

Tabela 38: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 20°C durante 10 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)	3ªPesagem (g)
Branco etanol 1	19,0759	19,0758	19,0757
Branco etanol 2	17,0346	17,0344	17,0344
Etanol 1	17,3218	17,3210	17,3209
Etanol 2	20,0520	20,0518	20,0517
Etanol 3	19,1032	19,103	19,1026
Branco Água 1	19,6769	19,6776	19,6774
Branco Água 2	20,1058	20,1055	20,1052
Água 1	20,7643	20,764	20,7638
Água 2	19,2579	19,2574	19,2571
Água 3	20,9433	20,9424	20,9423
Branco Ácido Acético 1	17,0336	17,0326	17,0325
Branco Ácido Acético 2	19,2028	19,2020	19,202
Ácido Acético 1	18,7695	18,7701	18,77
Ácido Acético 2	19,2083	19,2084	19,2082
Ácido Acético 3	20,539	20,5388	20,5387
Ácido Acético Duplicado 1	19,8032	19,8025	19,8026
Ácido Acético Duplicado 2	19,2294	19,2295	19,2293
Ácido Acético Duplicado 3	17,4925	17,4926	17,4921

Tabela 39: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 20 °C durante 30 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	20,3484	20,3486
Branco etanol 2	19,131	19,1306
Etanol 1	19,0256	19,0251
Etanol 2	19,6754	19,6756
Etanol 3	19,227	19,2272
Branco Ácido Acético 1	20,1674	20,1677
Branco Ácido Acético 2	20,0057	20,0056
Ácido Acético 1	18,9095	18,91
Ácido Acético 2	19,6527	19,6526
Ácido Acético 3	17,3208	17,3205
Ácido Acético Duplicado 1	18,7698	18,77
Ácido Acético Duplicado 2	20,9314	20,9310
Ácido Acético Duplicado 3	19,4976	19,4977
Branco Água 1	19,7445	19,744
Branco Água 2	21,3172	21,3168
Água 1	19,1614	19,1619
Água 2	19,4435	19,4439
Água 3	20,9438	20,9433

Tabela 40: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 20 °C durante 30 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	20,3497	20,3501
Branco etanol 2	19,1302	19,1301
Etanol 1	19,0249	19,0250
Etanol 2	19,6770	19,6775
Etanol 3	19,2286	19,2289
Branco Água 1	19,7445	19,7450
Branco Água 2	21,3166	21,3170
Água 1	19,1625	19,1620
Água 2	19,4445	19,4442
Água 3	20,9444	20,9442
Branco Ácido Acético 1	20,1676	20,1679
Branco Ácido Acético 2	20,0057	20,0061
Ácido Acético 1	18,9114	18,9110
Ácido Acético 2	19,6544	19,6539
Ácido Acético 3	17,3217	17,3212
Ácido Acético Duplicado 1	18,7696	18,7699
Ácido Acético Duplicado 2	20,9326	20,9328
Ácido Acético Duplicado 3	19,4996	19,4995

Tabela 41: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 10 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	19,2286	19,2282
Branco etanol 2	19,0737	19,0732
Etanol 1	20,9435	20,943
Etanol 2	18,7702	18,77
Etanol 3	17,0343	17,0342
Etanol Duplicado 1	19,6775	19,6779
Etanol Duplicado 2	17,034	17,0337
Etanol Duplicado 3	21,5949	21,5959
Branco Água 1	19,2031	19,2027
Branco Água 2	19,7449	19,7444
Água 1	20,0324	20,0321
Água 2	20,006	20,0060
Água 3	19,2691	19,269
Branco Ácido Acético 1	20,1054	20,1059
Branco Ácido Acético 2	21,2203	21,2199
Ácido Acético 1	19,0253	19,0254
Ácido Acético 2	19,8924	19,8923
Ácido Acético 3	20,2751	20,2748

Tabela 42: Massa dos cadinhos com amostra para a condição de 40 °C durante 10 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	19,2287	19,2285
Branco etanol 2	19,0720	19,0719
Etanol 1	20,9436	20,9432
Etanol 2	18,7707	18,7703
Etanol 3	17,0345	17,0346
Etanol Duplicado 1	19,6821	19,6816
Etanol Duplicado 2	17,0346	17,0344
Etanol Duplicado 3	21,5960	21,5957
Branco Água 1	19,2028	19,2023
Branco Água 2	19,7447	19,7445
Água 1	20,0335	20,033
Água 2	20,0071	20,0067
Água 3	19,2706	19,2701
Branco Ácido Acético 1	20,1057	20,1052
Branco Ácido Acético 2	21,2208	21,2203
Ácido Acético 1	19,0257	19,0258
Ácido Acético 2	19,8929	19,8927
Ácido Acético 3	20,2751	20,2748

Tabela 43: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 30 dias

	1ªPesagem (g)	2ªPesagem (g)
Branco etanol 1	19,7445	19,7440
Branco etanol 2	20,1682	20,1677
Etanol 1	17,3205	17,3204
Etanol 2	19,6761	19,6758
Etanol 3	18,7696	18,7691
Etanol duplicado 1	20,9415	20,9410
Etanol duplicado 2	19,0233	19,0230
Etanol duplicado 3	20,9314	20,9319
Branco Água 1	19,2270	19,2272
Branco Água 2	20,0056	20,0055
Água 1	19,1591	19,1596
Água 2	19,1301	19,1296
Água 3	19,4426	19,4423
Branco Ácido Acético 1	19,6538	19,6536
Branco Ácido Acético 2	20,3489	20,3494
Ácido Acético 1	21,3153	21,3157
Ácido Acético 2	18,9096	18,9095
Ácido Acético 3	19,4978	19,4976

Tabela 44: Massa dos cadinhos sem amostra para a condição de 40 °C durante 30 dias

	<b>1ª Pesagem (g)</b>	<b>2ª Pesagem (g)</b>
<b>Branco etanol 1</b>	19,7444	19,7443
<b>Branco etanol 2</b>	20,1684	20,1682
<b>Etanol 1</b>	17,3228	17,3229
<b>Etanol 2</b>	19,6784	19,6783
<b>Etanol 3</b>	18,7724	18,7723
<b>Etanol duplicado 1</b>	20,9432	20,943
<b>Etanol duplicado 2</b>	19,0263	19,0259
<b>Etanol duplicado 3</b>	20,9340	20,9336
<b>Branco Água 1</b>	19,2273	19,2274
<b>Branco Água 2</b>	20,0057	20,0056
<b>Água 1</b>	19,1615	19,1616
<b>Água 2</b>	19,1319	19,132
<b>Água 3</b>	19,4439	19,4441
<b>Branco Ácido Acético 1</b>	19,6538	19,6542
<b>Branco Ácido Acético 2</b>	20,3496	20,3492
<b>Ácido Acético 1</b>	21,3186	21,3184
<b>Ácido Acético 2</b>	18,9118	18,9122
<b>Ácido Acético 3</b>	19,5010	19,5012

## Anexo III

### Preparação das soluções e reagentes utilizados no capítulo 6

**Diluyente:** dissolução de peptona (1,0g) e cloreto de sódio (8,5g) em água (1000 mL) a quente e autoclagem a 121 °C durante 15 minutos. Verificação do pH final à temperatura ambiente (7,0±0.2); em alternativa pode ser adquirida a formulação completa a um fornecedor de meios e preparada segundo as instruções do fabricante.

**Solução de polissorbato:** solução aquosa a 0,5 g L<sup>-1</sup> de polissorbato e autoclavada a 121 °C durante 15 minutos.

**Neutralizante completo:** água peptonada tamponada (comercial) aditivada de polissorbato 80 (30g L<sup>-1</sup>), lecitina (3g L<sup>-1</sup>), saponinas (30 g L<sup>-1</sup>) e *octoxynol 9* (1g L<sup>-1</sup>). Esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Verificação do pH final, à temperatura ambiente, 7.0±0.2

**Neutralizante sem polissorbato:** água peptonada tamponada (comercial) aditivada de lecitina (3g L<sup>-1</sup>), saponinas (30g L<sup>-1</sup>) e *octoxynol 9* (1g L<sup>-1</sup>). Esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Verificação do pH final, à temperatura ambiente, 7.0 ± 0.2

**Meio de cultura TSA:** meio comercial preparado segundo indicações do fabricante.

**Meio de cultura SDA:** meio comercial preparado segundo indicações do fabricante.

**Meio de cultura PDA:** meio comercial preparado segundo indicações do fabricante.