

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

RODOLPHO GUILHERME MENEZES GAMA

**BOAS PRÁTICAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA: UMA ABORDAGEM PARA O CONTROLE DE
QUALIDADE FARMACÊUTICO**

Rio de Janeiro
2019

RODOLPHO GUILHERME MENEZES GAMA

Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: Uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Tecnologias Industriais Farmacêuticas de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientador: M.Sc, Marcelo Henrique da Cunha Chaves

Rio de Janeiro
2019

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

G184b Gama, Rodolpho Guilherme Menezes

Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico. / Rodolpho Guilherme Menezes Gama. – Rio de Janeiro, 2019.

xiii, 83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcelo Henrique da Cunha Chaves.

Monografia (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas, 2019. Bibliografia: f. 78-83

1. Boas Práticas Cromatográficas. 2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 3. Controle de Qualidade. 4. Indústria Farmacêutica. I. Título.

CDD 615.1

RODOLPHO GUILHERME MENEZES GAMA

Boas práticas para cromatografia líquida de alta eficiência: Uma abordagem para o controle de qualidade farmacêutico

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

M.Sc. Marcelo Henrique da Cunha Chaves
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

D.Sc. Michelle Alvares Sarcinelli
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

M.Sc. Jovana de Mello Rosas
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2019

Dedico o presente trabalho a pessoa mais especial em minha vida: minha amiga,
confidente, instrutora e, sobretudo, mãe.
D^a Jorsy, sem você não teria chegado aqui.

AGRADECIMENTOS

A todos que buscam a transformação constante em um ser humano melhor, não devem esquecer-se ou esconder todos aqueles que contribuíram para o seu sucesso, seja social, profissional, material, emocional e inclusive espiritual. Viver em sociedade nos traz a necessidade do contato constante e do auxílio mútuo como ferramentas de desenvolvimento individual e coletivo. “A gratidão é o principal sinal de nobreza da alma”, já nos dizia Esopo, escritor grego, nascido no ano 620 A.C.

A minha singela, pequena e humilde trajetória se devem:

À Deus, que me deu o sopro da vida e me dá os passos necessários para o meu desenvolvimento, assim como a Jesus, através dos mensageiros espirituais que me auxiliam nas diversas etapas da minha vida.

Ao meu orientador, Prof^o Marcelo H. C. Chaves, que aceitou o desafio da orientação desse trabalho e auxiliou de diversas formas para a sua concretização.

À minha mãe Jorsytania e ao meu pai Alcenin (*in memoriam*), que sempre buscaram oferecer o melhor, dentro das suas possibilidades, a minha educação. Quantas foram as noites de estudo que minha mãe me acompanhou, incentivando a leitura, o pensamento crítico e a resolução dos desafios e problemas oriundos das diversas disciplinas que tive ao longo de minha infância. Quantas mensagens e incentivos meu pai me deu, através dos vistos em provas e cadernos que ele fazia sempre que possível.

À minha Avó, Terezinha, mãe 2 vezes, que proporcionou incentivos ao meu estudo de diversas maneiras.

À minha namorada, Priscila, chamada carinhosamente de moção, que desde o início do processo seletivo para a realização desse curso, não mediu esforços para incentivar o meu estudo e participação. Sempre amiga, boa ouvinte e conselheira. Amo-te menina.

À minha chefia imediata no laboratório do Controle da Qualidade de Farmanguinhos, Karina Rocha de Souza, que desde o momento da minha contratação para a empresa, não poupou esforços para a manutenção e continuação nesta pós-graduação. Dando os incentivos, dicas e o tempo (precioso demais nesse momento) para a conclusão desse trabalho. Ainda mais no período turbulento que foi o processo cirúrgico de minha mãe (duas vezes).

À minha amiga de trabalho, Carolina Passos, que antes mesmo de me conhecer, contribuiu para que eu pudesse continuar no estudo dessa pós-graduação. Colega que se transformou em amiga e que de todas as formas incentivou para que eu tivesse o tempo e o ânimo necessário para estudar as disciplinas.

À colega de trabalho, Bianca Cruz, que forneceu de forma generosa diversos materiais bibliográficos para o enriquecimento desse trabalho.

Ao meu amigo e irmão do coração, Marcos Natividade, que também incentivou de diversas maneiras minha participação no curso e posterior fechamento.

À antiga coordenadora dessa pós-graduação, Prof^a Carmen Pagotto, que sempre se manteve próxima de todos os alunos durante o período de sua gestão, orientando e incentivando nossos estudos.

À atual coordenação dessa pós-graduação, Prof^a Livia D. Prado e Prof^o Helvécio Rocha, além da secretária acadêmica, Prof^a Elizabeth Santos, que contribuíram para a conclusão da pós-graduação dos alunos da turma que fiz parte, através de ações que materializaram o acolhimento mediante as dificuldades e desânimos que surgiram.

Aos diversos amigos e colegas da pós-graduação, Aline Barcelos, George León, Danielle Carvalho, Silvana Martins, Vanessa Gonzalez e outros, além dos amigos e colegas de empresa, de espiritismo e da vida que contribuíram de algum modo para a conclusão desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a conclusão desse trabalho.

(...) Adeus... – disse ele.

Adeus - disse a Raposa. – Eis o meu segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.

O essencial é invisível aos olhos - repetiu o príncipezinho, para não se esquecer.

Foi o Tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante.

Foi o tempo que eu perdi com a minha rosa... - repetiu ele, para não se esquecer.

Os homens esqueceram essa verdade - disse ainda a raposa.

Mas tu não a deves esquecer. Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas. Tu és responsável pela tua rosa...

Eu sou responsável pela minha rosa... - repetiu o príncipezinho, para não se esquecer.

(Antoine de Saint-Exupéry, 1940, p. 65)

RESUMO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) constitui-se como uma das técnicas mais avançadas e utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, devido a sua grande versatilidade técnica. De acordo com diversos órgãos reguladores, faz-se mister que uma indústria farmacêutica possua a autorização de produção e comercialização de seus produtos, através do cumprimento de normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Tendo em vista que a aplicabilidade das técnicas de CLAE atenda aos requisitos das BPF, é deslumbrado que essas mesmas técnicas tenham critérios visando garantir a segurança, confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados, aliado a maximização do desempenho dos sistemas cromatográficos, num contexto de relação custo-benefício para a indústria farmacêutica, evocando, assim, o conceito de Boas Práticas Cromatográficas (BPC), presente desde o início do desenvolvimento dos processos cromatográficos e indicados até os dias contemporâneos, de forma empírica, pelos fabricantes de equipamentos e consumíveis cromatográficos. Identificada essa oportunidade, o presente trabalho aborda conceitos teóricos e práticos das técnicas de CLAE. Para tanto, adotou-se como metodologia a pesquisa bibliográfica e documental em bancos de dados de artigos científicos, além de consultas a documentos oriundos dos maiores fabricantes de itens de CLAE. Assim, através da discussão das BPC's nos processos de qualificação dos equipamentos, de preparação de amostras e soluções utilizadas nos ensaios, na limpeza dos acessórios de CLAE e nos processos de integridade dos dados gerados compreende-se que são práticas fundamentais para indústria farmacêutica agregando maior confiabilidade nos seus processos, culminando na redução de custos com manutenção e no pleno cumprimento dos requisitos dos órgãos reguladores. Defende-se, portanto, que a abordagem das BPC's seja realidade dentro dos laboratórios de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, seguindo preceitos harmonizados e normalizando o conhecimento dos usuários, já que se justificam como ferramentas indispensáveis dentro de suas rotinas de atividade.

Palavras-chave: Boas Práticas Cromatográficas. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Controle de Qualidade. Indústria Farmacêutica.

ABSTRACT

The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is one of the most advanced techniques used in quality control laboratories in the pharmaceutical industry due to its high technical versatility. According to several regulatory agencies, it is necessary that a pharmaceutical industry has the authorization to produce and commercialize its products, by complying with Good Manufacturing Practices (GMP) standards. Given that the applicability of HPLC techniques meets the requirements of GMP, it is dazzled that these same techniques have criteria to guarantee the safety, reliability and reproducibility of the data generated, together with the maximization of the performance of the chromatographic systems in a cost- benefit analysis for the pharmaceutical industry, thus evoking the concept of Good Chromatographic Practices (GCP), present since the beginning of the development of chromatographic processes and indicated up to the present day, empirically, by the manufacturers of equipment and consumables chromatography. Identified this opportunity, the present work approaches theoretical and practical concepts of the HPLC techniques. In order to do so, it was adopted as methodology the bibliographical and documentary research in databases of scientific articles, as well as queries to documents originating from the largest manufacturers of HPLC items. Thus, through the discussion of GCP in equipment qualification processes, preparation of samples and solutions used in the tests, the cleaning of HPLC accessories and the data integrity processes generated, it is understood that these are fundamental practices for the pharmaceutical industry adding greater reliability in its processes, culminating in the reduction of costs with maintenance and in full compliance with the requirements of the regulatory agencies. It is therefore advocated that the GCP approach be a reality within the quality control laboratories of the pharmaceutical industries, following harmonized precepts and normalizing the knowledge of users, since they are justified as indispensable tools within their routines of activity.

Keywords: Good Chromatographic Practices. High Performance Liquid Chromatography Quality control. Pharmaceutical industry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da curva de separação de aminoácidos a partir de coluna cromatográfica recheada com amido de batata	18
Figura 2 - Representação do primeiro cromatógrafo automatizado. Criado por Stein e Moore, para separação de aminoácidos	19
Figura 3 - Ilustração do diâmetro de passagem de uma coluna cromatográfica com partículas de tamanho de 5 µm	39
Figura 4 - Comparativo do sinal resposta de uma fase móvel que não sofreu desgaseificação e de outra que passou pelo processo de desgaseificação	40
Figura 5 - Tempo gasto numa típica análise cromatográfica	46
Figura 6 - Fontes de erros durante uma análise cromatográfica.....	46
Figura 7 - Exemplos de filtros de seringa utilizados na filtração de amostras para CLAE.....	48
Figura 8 - Diferentes tipos de preenchimento de <i>vials</i>	49
Figura 9 - Passo a passo para limpeza do filtro de uma coluna cromatográfica.....	56
Figura 10 – Modelo de formulário de acompanhamento de desempenho e uso de uma coluna cromatográfica.....	58
Figura 11 - Exemplo de armazenagem de colunas cromatográficas novas.....	60
Figura 12 - Representação das Etapas do Ciclo PDCA.....	63
Figura 13 - Fotografia de um filtro de aço inoxidável com elemento filtrante para HPLC.....	66
Figura 14 - Critérios de um dado íntegro – Conceito ALCOA.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPC: Boas Práticas Cromatográficas
BPF: Boa Práticas de Fabricação
BPL: Boas Práticas de Laboratórios
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COT (em português) ou TOC (em inglês): Carbono Orgânico Total
DICLA: Divisão de Acreditação de Laboratório
FDA: U S Food and Drug Administration. (Agência Sanitária Norte-Americana)
EUA: Estados Unidos da América
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Equivalente CLAE)
IFA: Insumo farmacêutico ativo
Inmetro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
OMS: Organização Mundial da Saúde
PVDF: Fluoreto de Polivinilideno
PNIFF: Programa Nacional de Inspeção em Indústria Farmacêutica e Farmoquímicas
POP: Procedimento Operacional Padrão
PTFE: Politetrafluoretileno
RA: Acetato de celulose
RC: Celulose regenerada
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RN: Nitrato de celulose
SNVS/MS: Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
THF: Tetrahidrofurano
UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography
VISA: Vigilâncias Sanitárias estaduais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1.	Um breve relato sobre o desenvolvimento da cromatografia.....	17
2.2.	O desenvolvimento da Cromatografia Comercial	21
2.3.	A regulação no mercado farmacêutico. A importância da Qualidade ..	22
3	JUSTIFICATIVA	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	Geral.....	29
4.2	Específicos	29
5	METODOLOGIA.....	30
5.1	Bases Metodológicas.	30
5.2	Modo de Pesquisa	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
6.1	Boas Práticas Cromatográficas nos processos de instalação, operacionalização e qualificação dos equipamentos.....	31
6.2	Boas Práticas Cromatográficas nos processos de preparação de amostras e fases móveis/solventes utilizados na análise, assim como do adequado preparo e limpeza dos consumíveis e acessórios de CLAE.	36
6.2.1	Reagentes, solventes e fase móvel - Maximizando a <i>performance</i> do sistema cromatográfico	37
6.2.2	Soluções Tampões – Cuidados em seus preparos.....	43
6.2.3	Escolhendo o tipo apropriado de água para análises com CLAE	45
6.2.4	O preparo da amostra e sua criticidade no processo de ensaio cromatográfico.	45
6.2.5	Colunas cromatográficas: o consumível indispensável do sistema cromatográfico	50
6.2.7	As Boas Práticas Cromatográficas para a manutenção dos equipamentos.	65
6.2.8	A Técnica de <i>Troubleshooting</i> como ferramenta de Boa Prática Cromatográfica	67

6.4	Boas Práticas Cromatográficas nos processos de geração, integridade e rastreabilidade dos dados gerados.....	71
6.4.1	Integridade de dados: uma Boa Prática Cromatográfica.	74
7	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais avançadas e utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade, “por ser um procedimento de separação, os analitos são primeiramente segregados para depois serem quantificados, o que propicia análises altamente seletivas(...)” (VALÊCIO, 2018).

Através da detecção quase sempre individualizada dos compostos, é possível traçar uma relação entre as respostas obtidas de uma substância química que contenha concentração previamente conhecida, denominada padrão e, uma amostra com concentração desconhecida (ANVISA, 2010). Dessa forma, obtém-se a quantificação de amostras, seja em ensaios de determinação de teor ou de impurezas, conforme a equação a seguir:

$$C_a = C_p(R_a/R_p)$$

Onde:

C_a = concentração da solução amostra;

C_p = concentração da solução padrão;

R_a = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra;

R_p = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão.

Devido à versatilidade técnica, seja pela combinação praticamente infinita entre tipos de fases móveis e fases estacionárias (colunas cromatográficas) e a possibilidade de quantificação de diversos compostos, além da redução dos preços dos sistemas cromatográficos em relação ao início do desenvolvimento da técnica e a miniaturização dos equipamentos, tem-se um ambiente favorável ao desenvolvimento e uso da técnica de CLAE na indústria farmacêutica. (AHUJA e DONG, 2005)

Os laboratórios farmacêuticos são reconhecidamente identificados como lugares de trabalho incessante, parâmetros elevados de qualidade e prazos de trabalhos justos, que culminam em momentos de estresse para seus colaboradores (LIRA, 2009). A utilização de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência deve garantir a entrega de resultados em tempo reduzido em relação ao utilizado para outros ensaios quantitativos, aliado a questões de confiabilidade, segurança, integridade e rastreabilidade dos dados gerados (NOGUEIRA, SOARES, *et al.*, 2011).

A legislação vigente no Brasil sobre a indústria de medicamentos nos traz a obrigatoriedade das Boas Práticas de Fabricação (BPF), conforme a RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010.

Compreende como Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos:

Art 13. Boas Práticas de Fabricação é a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro (ANVISA, 2010).

Conforme o citado anteriormente, as boas práticas de fabricação de medicamentos se fazem necessárias para garantir a diminuição de quaisquer riscos inerentes à produção farmacêutica, que podem não ser detectáveis pelos ensaios já realizados nas etapas de controle de qualidade. Esses riscos são, por exemplo, a ação de contaminação cruzada, contaminação por partículas e troca/mistura de produto, que podem acarretar em sérios danos para a saúde e o bem-estar da sociedade (ANVISA, 2010).

Dentro da indústria farmacêutica, um dos pilares de sustentação técnica para a certificação e vivência das BPF, é o gerenciamento da garantia e controle de qualidade, que entre outros requisitos, nos traz a vivência das Boas Práticas de Laboratório (BPL), isto é, um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições nas quais estudos não-clínicos de saúde e de segurança ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados. (INMETRO, 2011)

Apesar das BPL serem exigidas pela RDC nº 17/ 2010, a certificação do laboratório de controle de qualidade da indústria farmacêutica neste item é opcional, sendo contemplada pela Norma nº NIT-DICLA-035 de 2011 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e tecnologia (Inmetro).

Destaca-se alguns requisitos desta norma:

Item 4.2 - Equipamentos utilizados em um estudo devem ser periodicamente inspecionados, limpos, passar por manutenção e calibração de acordo com os POPs. Devem ser mantidos registros destas atividades. A calibração deve, onde apropriado, ser rastreável a padrões nacionais ou internacionais de medição.

Item 7.2 - Cada setor ou área da instalação de teste deve ter imediatamente disponíveis Procedimentos Operacionais Padrão, vigentes e que sejam relevantes às atividades que estão sendo conduzidas. Livros texto, métodos analíticos, artigos e manuais podem ser usados como suplementos para estes Procedimentos Operacionais Padrão.

Item 7.4 Procedimentos Operacionais Padrão devem estar disponíveis, mas não se limitar, às categorias de atividades da unidade operacional abaixo. Os

detalhes dados para cada título devem ser considerados como exemplos ilustrativos:

7.4.2 Equipamentos, Materiais e Reagentes a) Equipamentos Uso, manutenção, limpeza e calibração. (INMETRO, 2011)

Desse modo, observa-se que para o devido cumprimento das Boas Práticas Laboratoriais, os equipamentos geradores de dados devem possuir procedimentos que garantam o adequado uso, conforme preconizado pelos seus fabricantes.

Os fabricantes de equipamentos de CLAE recomendam algumas práticas para serem utilizadas nos seus equipamentos, intitulados como “Boas Práticas Cromatográficas”. Estas práticas propiciam que os equipamentos possam atingir o máximo desempenho, gerando resultados que garantam confiabilidade, reprodutibilidade, atendendo assim aos requisitos de órgãos regulatórios.

Tendo em vista o exposto acima, será que os laboratórios farmacêuticos investem, adequadamente, em práticas que culminarão na segurança, confiabilidade e reprodutibilidade de seus resultados? Quais são os cuidados e manutenções realizadas nos equipamentos de CLAE? Quais são as práticas utilizadas para garantir um melhor desempenho dos equipamentos, bem como de seus acessórios e consumíveis?

O Presente trabalho buscou responder esses questionamentos, trazendo um panorama das Boas Práticas Cromatográficas, apresentando a evolução deste conceito e as técnicas sugeridas atualmente, correlacionando ao padrão de qualidade desenvolvido ao longo de décadas na indústria farmacêutica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Um breve relato sobre o desenvolvimento da cromatografia

O início da cromatografia é atribuído ao botânico russo Mikhail Semeovich Tswett, que primeiramente, em 1901 publicou sua dissertação de Mestre com o título “Um estudo físico-químico do grão de clorofila: experimentos e análises”, que foi sucesso entre seus pares. Em 1903, considerado como o ano oficial do nascimento da cromatografia, Tswett publicou dois artigos que descreviam a análise cromatográfica e sua aplicação ao estudo da química de clorofila (BEREZKIN, 1989).

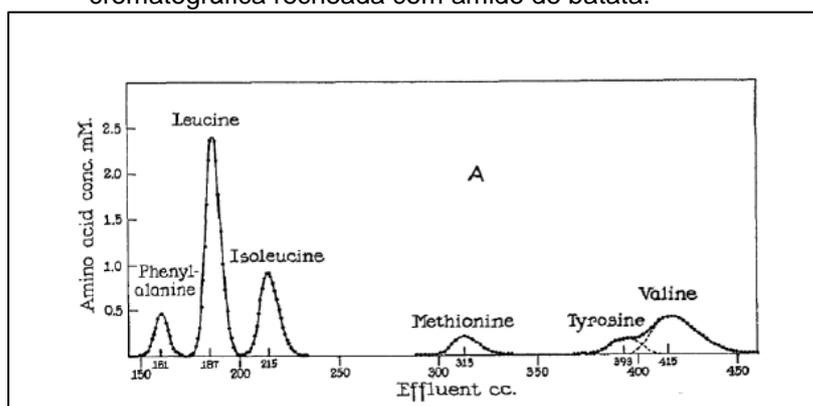
A palavra cromatografia pode ter dois significados. Etimologicamente, a palavra é formada por dois vocábulos gregos, *chroma*, que significa cor e *graphein*, que significa escrever, dando a compressão de “escrita das cores”. Porém, um significado um pouco mais difuso, tem a ver com semântica e fonética do sobrenome do autor: Tswett em russo escreve-se “цвет”, e sua fonética é “*Tsvet*”, que daria a tradução da palavra cor. Assim, de forma subliminar, o termo cromatografia pode ser interpretado como “Escrita de Tswett” (ABRAHAM, 2004).

Apesar de M. S. Tswett ser considerado como o “pai” da cromatografia, sabe-se que existe o relato do emprego de técnica similar, ainda sem nome, visto entre os anos de 77 e 79 D.C, através da publicação da obra “*Naturalis Historia*”, que consistia numa grande enciclopédia. Nesta obra, Plínio descreve um processo de autenticidade de um sal intitulado *verdigris*, utilizado como pigmento de coloração verde, onde era utilizados folhas de papiro embebidas em um extrato vegetal. A autenticidade do sal dava-se através da mudança de coloração das folhas, que ficavam rapidamente enegrecidas com a presença do respectivo sal (ELDER, 77-79).

Nota-se ainda a contribuição anterior à Tswett, de Friedlieb Ferdinand Runge em 1850, com a descrição de papeis de filtros para separação de pigmentos de tintas; de Christian Friedrich Schönbein que descobre o ozônio em 1839, através de testes qualitativos onde o marcador característico apresenta mudança de coloração e Friedrich Goppelsroeder que em 1901 publicou um livro que trazia informações sobre o fenômeno de capilaridade, no qual ele via que componentes de uma mistura de papel poderiam ser separados (PACHECO, BORGUINI, *et al.*, 2015).

Em 1939, Stanford Moore e Willian Howard Stein iniciam estudos no desenvolvimento de métodos gravimétricos para análise de aminoácidos, sendo o ano de 1948 como o marco dos primeiros resultados. O método criado utilizava colunas cromatográficas com recheio de amido de batata e mediam aproximadamente 0,9 cm de diâmetro com 30 cm de comprimento. Os aminoácidos eram carreados por um eluente, que era inicialmente coletado manualmente. A quantificação do aminoácido era realizada conforme a Figura 1, onde se vê que o eixo x representa o volume de efluente coletado numa fração de tempo, e o eixo y é a concentração das espécies de aminoácidos determinadas por espectrofotometria colorimétrica com auxílio de ninidrina.

Figura 1– Representação da curva de separação de aminoácidos a partir de coluna cromatográfica recheada com amido de batata.



Fonte: KRESGE, SIMONI e HILL (2005)

A fim de garantir que os diversos experimentos fossem possíveis de serem executados, Moore e Stein desenvolveram um mecanismo para que as frações geradas pelo processo de separação fossem captadas de forma automática. A engenharia por trás desse processo é interessante, visto que para conseguir um resultado similar ao mostrado na figura anterior, a corrida cromatográfica durava 4 dias. Os experimentos de Stein e Moore atingiam incríveis 98% de recuperação de aminoácidos com 3% de repetitividade (KRESGE, SIMONI e HILL, 2005).

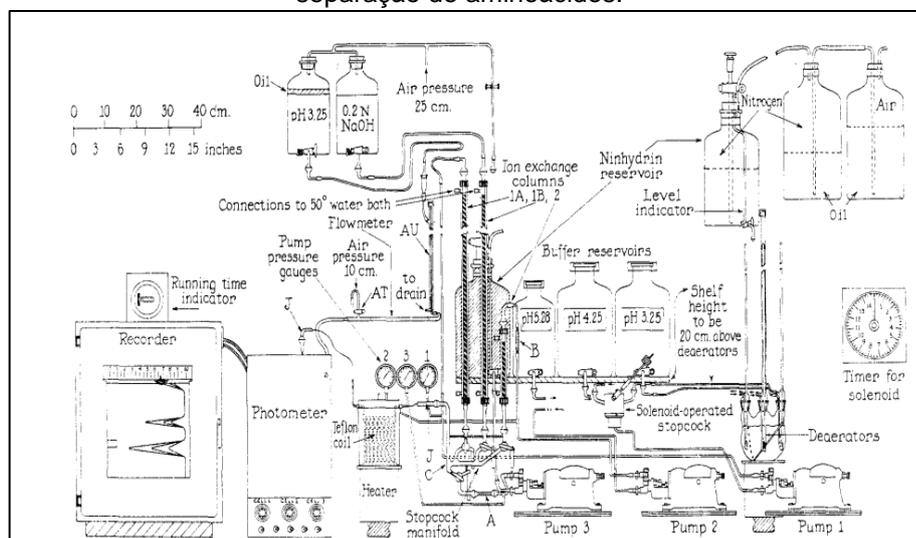
Entre 1949 e 1952, surgem as primeiras resinas de troca iônica, criadas pela companhia americana Dow, que tinha como finalidade a desmineralização da água, através de um pré-tratamento com temperaturas até 100 °C. Intitulada DOWEX 50, essa resina se torna amplamente utilizada nos laboratórios que apresentavam

pesquisas relacionadas à separação de componentes (BAUMAM, SKIDMORE e OSMUM, 1948).

S. M. Partridge publica no período supracitado trabalhos relacionados à cromatografia por troca iônica. Moore e Stein iniciam testes de separações cromatográficas utilizando como fase estacionária a resina de troca iônica (PACHECO, BORGUINI, *et al.*, 2015). Entre as vantagens da utilização da resina DOWEX 50 destaca-se a possibilidade de reutilização das resinas/colunas, sendo suficiente apenas um pequeno equilíbrio com a fase móvel utilizada, além de que não haveria necessidade de dessalinização de fluídos com alta concentração de sais, situação que ocorria com a coluna recheada de amido de batata. (MOORE e STEIN, 1951)

É atribuído a Moore e Stein, com parceria de Daniel H. Spackman o desenvolvimento do primeiro cromatógrafo à líquido automático, no ano de 1958, que utilizava um sistema de eluição do substrato por gradiente, isto é, com mudança da composição da fase móvel ao longo da corrida, além de derivatização pós-coluna. (SPACKMAN, STEIN e MORE, 1958). Os trabalhos de Stein e Moore foram revolucionários para a química, pois traziam consigo grande nível de detalhamento. O projeto do seu sistema cromatográfico foi divulgado livre de qualquer tipo de proteção intelectual, sendo considerado o pioneiro na academia e servindo de base para ser replicado por outros pesquisadores e empresas de instrumentação analítica. (PACHECO, BORGUINI, *et al.*, 2015). A Figura 2 abaixo mostra a imagem do cromatógrafo de Moore e Stein.

Figura 2 – Representação do primeiro cromatógrafo automatizado. Criado por Stein e Moore, para separação de aminoácidos.



Fonte: MOORE e STEIN (1951)

Observa-se que o equipamento desenvolvido por Stein e Moore apresentava 3 bombas, que tinham como finalidade o bombeamento do eluente e da solução de ninidrina, utilizada para o processo de quantificação dos aminoácidos. Esse sistema de bombeamento garantia que o método mantivesse um fluxo contínuo e preciso, trazendo resultados reprodutíveis para o experimento. Essas bombas eram equipadas com pistões de aço, sendo que cada uma tinha 2 válvulas de retenção (*check valves*), que facilitavam o processo de alimentação e descarga do pistão. A pressão era monitorada com manômetro que tinha uma escala de medição até 60 psi, sendo 40psi o valor de pressão desejável. Os tampões tinham fluxo de trabalho de 30 mL/hora e a solução de ninidrina 15 mL/hora (MOORE e STEIN, 1951).

A comunidade científica reconhece Stein e Moore como os criadores do primeiro cromatógrafo automatizado, porém a contribuição desses dois pesquisadores vai além, pode-se afirmar que eles também contribuíram com as primeiras compreensões de Boas Práticas Cromatográficas.

A fim de garantir que o sistema de eluição não sofresse com a carreação de ar, visto que a ninidrina era aquecida a 100 °C após entrar no sistema, gerando bolhas que ocasionavam imprecisões nos resultados, foi projetado um sistema de deaeração de fases através do aquecimento de todo o eluente. As bolhas de ar saíam antes por um tubo apropriado, deaerando assim toda a fase móvel.

O cromatógrafo possuía um reservatório para as fases móveis, com utilização de 1 garrafa de 2 L para a solução tampão de pH 5,26, 1 garrafa de 4 L com pH 4,25 e por fim outra garrafa de 4 L com pH 3,28. O posicionamento das garrafas se dava a uma altura de 30 cm acima das bombas e 20 cm acima dos deaeradores. Visto que a colocação das garrafas num nível acima gerava uma pressão positiva para entrada dos eluentes, garantindo o correto funcionamento das bombas. Esse reservatório ainda continha 2 frascos de 2 L com solução de NaOH 0,2 N e solução tampão pH 3,28, também posicionadas acima do nível das colunas, para no final do processo cromatográfico serem utilizados para limpeza e regeneração da resina de troca iônica presentes nas colunas cromatográficas.

As colunas cromatográficas eram mantidas em temperatura controlada por uma camisa de vidro, que continha em seu interior a circulação de água aquecida. Destaca-se que o primeiro cromatógrafo trabalhava com duas colunas cromatográficas, ficando 1 coluna para o uso e a outra em processo de regeneração (MOORE e STEIN, 1951).

Devido à enorme contribuição para a sociedade dos seus trabalhos, em 1972 a Academia Real das Ciências da Suécia, outorgou para Stanfor Moore, Willian H. Stein e Christian B. Anfinsen o Prêmio Nobel de Química do respectivo ano, pelo trabalho desenvolvido na quantificação, isolamento e estrutura espacial de aminoácidos e de enzima ribonuclease (ACADEMIA REAL DAS CIÊNCIAS DA SUÉCIA, 2018).

2.2.O desenvolvimento da Cromatografia Comercial

Stein e Moore foram fundamentais para a concepção de cromatografia que entendemos no mundo contemporâneo: análise de alta precisão, em tempo curto e com elevada automatização de seus processos. Desencadeando, com o passar do tempo, na criação de empresas que viessem a prover os cromatógrafos para as pesquisas requeridas (ENGELHARDT, 2004).

Até o final da década de 1960, os cromatógrafos líquidos eram projetados pelos pesquisadores, que divulgavam o detalhamento de suas construções através de suas publicações. No período compreendido entre 1965 e 1969 foram realizados congressos, simpósios e eventos sobre as técnicas de cromatografia líquida, que discutiam essas informações. Em 1969, em Miami, ocorreu o 5º Simpósio sobre “Avanços em Cromatografia”, onde algumas empresas apresentaram suas primeiras versões de equipamentos para *High performance liquid chromatography* (HPLC). Em 1971 foi lançado em Wilmington o primeiro livro sobre técnicas de cromatografia (ENGELHARDT, 2004).

Como curiosidade, cita-se que inicialmente os preços dos cromatógrafos líquidos eram demasiadamente caros e devido a isso o termo HPLC era, na verdade, um descritor do valor do equipamento. Outra possível significação do termo, seria oriunda da necessidade do usuário ser “paciente”, já que o sistema de cromatografia líquida apresentava inconvenientes em relação à cromatografia a gás, tais como vazamentos de solventes, preparação de fases móveis, necessidade de estabilização de colunas e problemas oriundos de bolhas no sistemas (PACHECO, BORGUINI, *et al.*, 2015).

A cromatografia líquida ainda teve avanços significativos na década de 70. No início dos sistemas pressurizados de cromatografia, as colunas cromatográficas

consistiam de partículas de sílica porosa, com dimensões irregulares e tamanho aproximado de 40 a 50 μm . O processo de separação era através da cromatografia em fase normal, isto é, a separação dos compostos baseada na polaridade entre os estes e a fase estacionária utilizada. A técnica consiste na utilização de uma fase estacionária polar e uma fase móvel apolar, onde os compostos polares interagem com a fase estacionária e a separação se dá através da diferença de interação entre os diferentes compostos, que são carregados pela fase móvel apolar. Quanto maior a interação com a fase estacionária, maior será o tempo de retenção (ANVISA, 2010).

Com o decorrer dos anos, a tecnologia utilizada para o empacotamento de fases estacionárias trouxe grande avanço em relação a eficiência de separação na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Já nos anos 70, tivemos a diminuição dos tamanhos das partículas das colunas cromatográficas, atingindo em 1975 o tamanho de 5 μm , em 1978 o valor de 3 μm e por fim, em meados da década de 90, o valor de 1,5 μm (ENGELHARDT, 2004).

O surgimento da cromatografia em fase reversa, isto é, a utilização de uma fase móvel polar e de uma fase estacionária apolar, trouxe grandes incrementos para as técnicas de CLAE, garantindo uma melhor separação das partículas. Devido a sua vasta aplicabilidade para desenvolvimento e controle de qualidade de diversos produtos, essa técnica de CLAE tem sido muito explorada nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e químicas. Destaca-se como vantagens a utilização para quantificação de substâncias específicas, possibilidade de utilização de soluções de pH altos ou baixos (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010).

A miniaturização dos sistemas cromatográficos, isto é, a diminuição dos seus componentes, além da divisão em módulos, acarretou num barateamento desses equipamentos, permitindo, assim, a aquisição destes por parte da indústria farmacêutica, garantindo que a CLAE se tornasse uma das principais técnicas de quantificação de substâncias nesse setor (VALÊCIO, 2018).

2.3. A regulação no mercado farmacêutico. A importância da Qualidade

Desde o início dos tempos, o conceito de que determinado produto ou serviço possuísse um nível razoável de qualidade, é confirmado na interpretação de códigos e leis antigos, como por exemplo o código de Hamurabi. A maior preocupação era

relacionada à adulteração e fabricação com ingredientes de má qualidade, nos produtos ou na prestação de serviços, que pudesse afetar a vida do consumidor. Esse pensamento refletia a filosofia de que, para garantir que a riqueza e poder de uma nação se desenvolvesse, era necessário que a população de uma nação fosse grande, controlada e bem cuidada. Desde modo, a primeira lei jurídica que especificava a proibição da adulteração na fabricação de pães, remonta a 1202 na Inglaterra, e a partir do século XVII, nasce o conceito de polícia médica, aonde a administração pública cuidaria da saúde pública (ROZENFELD, 2000).

Com o advento da industrialização, que culminou no aumento da produtividade de diversos produtos, entre eles, aqueles que afetavam a saúde pública, surgiu-se a necessidade de uma regulação maior desses setores, através da criação de órgãos governamentais que iriam trazer normas para trazer requisitos mínimos de produção, transporte, armazenagem e forma de venda, a fim de evitar impactos negativos na saúde da população. Essa regulação é observada com mais clareza nos EUA, onde devido ao alto crescimento da produção industrial, verificou-se o aumento de denúncias relacionadas à fabricação imprópria de produtos, oriundos da negligência técnica e da ganância financeira dos produtores. A divulgação de resultados de ensaios clínicos sobre diversos produtos trouxe forte pressão popular para garantia da saúde da população, trazendo em 1820 a elaboração do primeiro compêndio da *US Pharmacopeia*, determinando padrões mínimos como pureza, consistência e qualidade dos medicamentos. Em 1862 é criado o Departamento de Química dos EUA. Posteriormente, o Departamento de química transforma-se na administração federal de alimentos, medicamentos e inseticidas e em 1931 nasce o FDA (Food and Drug Administration), responsável até os dias de hoje pela regulação dos produtos farmacêuticos disponíveis para humanos e animais, assim como de alimentos, equipamentos biológicos, médicos e cosméticos (LOPES e HARRINGTON, 2014).

Pode-se afirmar, todavia, que apesar dos EUA serem referência em vigilância sanitária e na regulação dos medicamentos até o presente momento, nota-se que a evolução da regulação lá aplicada ao setor farmacêutico adveio de eventos importantes e/ou trágicos para a sociedade. Os exemplos como a tragédia do elixir de sulfanilamida em 1937, que ocasionou a morte de mais de 100 pessoas, trouxe a necessidade do registro de novos medicamentos, onde o fabricante deveria realizar estudos que comprovassem a segurança do produto e fosse proibida a colocação de

falsas informações em seus rótulos; em 1951 foi aprovada a lei que determinava que alguns medicamentos fossem apenas vendidos por prescrição médica; em 1962, a tragédia da talidomida, medicamento ainda em fase de testes, acarretou a morte e a deformação de diversos fetos, trouxe a regulação da necessidade da eficácia dos medicamentos, um maior controle da segurança do produto, além de que para os pacientes de estudos clínicos, fossem oferecidos mais proteção e o direito de escolha; em 1970 o FDA passa a exigir bulas de todos os medicamentos, com informações sobre efeitos colaterais e benefícios do uso, devidos aos efeitos que se observaram dos primeiros anticoncepcionais (LOPES e HARRINGTON, 2014).

Enquanto era notada a criação de regulamentos, normas e agências reguladoras no início do século XX nos países desenvolvidos, aqui no Brasil, a regulação do setor farmacêutico só inicia depois da metade do século XX, ainda de forma incipiente. A legislação sanitária brasileira inicia de forma mais contundente na década de 70 do referido século, através da Lei nº 6360/76 que traz de forma implícita a necessidade de articulação entre as esferas federal e estadual para a realização das fiscalizações e instruções normativas a todos os interessados. Em 1976 foi criada a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SNVS/MS), com o objetivo de auxiliar de forma assistemática as Vigilâncias Sanitárias estaduais, denominadas de VISA, onde através de repasses de recursos e mediante celebrações de convênios, seria aperfeiçoada a regulação do setor. Com o passar dos anos, esse modelo de atuação mostrou-se insuficiente diante a magnitude do setor, atuando praticamente de forma cartorial, isto é, apenas com o aceite simples de documentações e registros (SETA, PEPE e OLIVEIRA, 2006).

No final da década de 80 foi evidenciada a defasagem do setor sanitário brasileiro em relação a outros países, através de idas e vindas no entendimento sobre o papel do estado como promotor de políticas de regulação do mercado. Destaca-se que somente a partir da Constituição Federal de 1988 que o direito sanitário se consolida, através do estabelecimento da saúde como um direito social (VIEIRA, REDIGUIERI e REDIGUIERI, 2013).

A constituição Federal Brasileira vigente é categórica:

Art. 196. A saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e **recuperação**.

Art. 197. **São de relevância pública as ações e serviços de saúde, cabendo ao Poder Público dispor, nos termos da lei, sobre sua regulamentação, fiscalização e controle**, devendo sua execução ser feita diretamente ou através de terceiros e, também, por pessoa física ou jurídica de direito privado. **(Grifo nosso)** (BRASIL, 1988).

A vigilância sanitária é a forma mais complexa de existência da saúde pública, já que através de suas ações, são repassadas todas as práticas médico-sanitárias: promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde, e, através dela, é que o estado atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde (ROZENFELD, 2000).

Com a promulgação da lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990, chamada de Lei Orgânica da Saúde, temos a definição vigente de vigilância sanitária:

Art 6º. § 1º Entende-se por vigilância sanitária um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, **da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: I - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo. (Grifo Nosso)** (BRASIL, 1990).

A década de 90 é considerada um período turbulento dentro da história da vigilância sanitária nacional, com a edição de portarias e trocas constantes de diretores da autarquia federal. Em 27 de Janeiro de 1999, através da medida provisória nº 1791, o congresso nacional aprova a definição do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Como agência reguladora e autarquia especial, vinculada ao Ministério da Saúde, tem como característica sua independência administrativa, a estabilidade dos seus dirigentes e a sua autonomia financeira, regulamentando e coordenando o sistema nacional de vigilância sanitária (SETA, PEPE e OLIVEIRA, 2006).

É importante contextualizar o papel da vigilância sanitária na sociedade moderna, onde o consumo é sempre crescente, de mercadorias, bens e serviços, englobando medicamentos e produtos de interesse sanitário. A dinâmica do sistema capitalista é a geração de lucros, criando a ordem de produzir e vender, sempre em escala crescente, e as vezes não-sustentável. Nessa dialética muitas vezes contraditória, diversos processos são criados ou gerados colocando em risco a vida do consumidor, assim como danos ao meio ambiente.

As ações de vigilância sanitária marcam um contraponto nas relações sociais entre produtores e consumidores, onde o estado se faz presente para regular e mitigar os diversos tipos de problemas que advém dessa relação, tais como a ilicitude intencional de produtores, fabricantes, comerciantes, além das falhas, por motivos diversos em algum ponto da cadeia de produção (ROZENFELD, 2000).

Assim, observa-se que no final da década de 90, há criação de instrumentos para o aprimoramento da qualidade dos produtos do setor, tais como os guias de BPF e os roteiros para inspeção de indústria de medicamentos, domissanearios e cosméticos, além da criação do Programa Nacional de Inspeção em Indústria Farmacêutica e Farmoquímicas/PNIFF (ROZENFELD, 2000).

Para que um medicamento registrado na autoridade sanitária cumpra com seu objetivo, alguns aspectos são considerados em todo o processo de vida útil do medicamento, compreendendo desde a produção e certificação do insumo farmacêutico ativo (IFA), até a dispensação no mercado. Importante salientar que cada etapa desse ciclo apresenta graus de complexidade próprios, que podem ser passíveis de erros em parte ou em todo o processo, decisivos para a adequada qualidade do medicamento que virá ao consumidor. Diante disso, existe um conjunto de normas e regras, que estabelecem padrões mínimos de trabalho para o fabrico de medicamentos, por exemplo, denominado como Boas Práticas de Fabricação (BPF) (SETA, PEPE e OLIVEIRA, 2006).

A legislação vigente no Brasil sobre a indústria de medicamentos nos traz a obrigatoriedade das boas práticas de fabricação – BPF, conforme a RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Conforme citado anteriormente, as boas práticas de fabricação de medicamentos se fazem necessárias para garantir a diminuição de quaisquer riscos inerentes a produção farmacêutica, que podem não ser detectáveis pelos ensaios já realizados nas etapas de controle de qualidade.

A Organização Mundial da Saúde através do seu 37º relatório, publicado inicialmente em 2003 e com atualizações até 2010, serviu de referência para a elaboração e publicação da RDC nº 17/2010, que traz conceitos até então inovadores para o mercado farmacêutico brasileiro, como a validação de sistemas computadorizados, que impacta a utilização de *softwares* de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (VIEIRA, REDIGUIERI e REDIGUIERI, 2013).

No Anexo 1 da BPF da OMS, intitulado “Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos” é citado como requisito para certificação de BPF “(...) *os dados eletrônicos devem ser protegidos contra o acesso não autorizado e deve-se manter a rastreabilidade de todas as alterações*”, (OMS, 2010) trazendo deste modo, a importância do conceito de integridade de dados, um dos pilares das Boas Práticas Cromatográficas, a ser abordado por este estudo.

Quando da realização de inspeções regulatórias dentro dos laboratórios de controle de qualidade, objetiva-se a verificação de que os dados medidos em laboratórios de controle de qualidade são confiáveis e precisos e a garantia de que apenas medicamentos seguros e eficazes são autorizados para comercialização e liberados para o despacho do produto (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

Assim, observa-se que para o devido cumprimento das boas práticas de fabricação, os equipamentos geradores de dados devem possuir procedimentos que garantam o adequado uso, conforme preconizado pelos seus fabricantes.

Os fabricantes ou distribuidores de equipamentos de HPLC recomendam algumas práticas para serem utilizadas nos cromatógrafos, intitulado como “Boas Práticas Cromatográficas”. São práticas generalistas ou específicas para determinados equipamentos e consumíveis, voltadas para o *hardware* e para o *software*, que mesclam conceitos de manutenção preventiva, preditiva e corretiva, integridade e cuidados dos dados gerados, além de cuidados no preparo, uso e armazenamento dos consumíveis envolvidos na prática cromatográfica que trarão a possibilidade de se atingir o máximo desempenho dos equipamentos, através da conservação de uma boa relação custo-benefício, trazendo deste modo, o atendimento aos requisitos dos órgãos regulatórios.

Logo, vivenciar as Boas Práticas Cromatográficas dentro de um laboratório de controle de qualidade farmacêutico, é ter a garantia, em parte, do cumprimento das boas práticas de fabricação.

3 JUSTIFICATIVA

Justifica-se a realização desse trabalho, como oportunidade de materialização de conceitos teóricos e práticos de CLAE, que definidos pelo conjunto de fabricantes, pesquisadores e/ou especialistas, poderá agregar aos laboratórios de controle de qualidade na indústria farmacêutica, as Boas Práticas Cromatográficas, culminando no melhor aproveitamento e maximização da *performance* dos equipamentos e acessórios de CLAE. Observa-se, também, a falta de textos acadêmicos que tratam, como objeto de estudo, das práticas cromatográficas e possíveis processos que possam garantir o melhor desempenho cromatográfico

Desta forma, espera-se que tal proposta gere maior confiabilidade do processo, redução de custos com manutenção (devido ao melhor uso da técnica) e pleno cumprimento de requisitos de órgãos regulatórios.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Apresentar aos usuários da técnica de CLAE, presentes em laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, fundamentação teórica e prática, através da indicação de conceitos, processos e métodos (denominados de Boas Práticas Cromatográficas), para otimização e melhor desempenho dos processos cromatográficos.

4.2 Específicos

- Reunir práticas cromatográficas que culminarão em resultados mais seguros, confiáveis e reprodutíveis para aqueles que aplicarem em seus processos analíticos.
- Discutir a importância das Boas Práticas Cromatográficas para qualquer laboratório de indústria farmacêutica que utiliza CLAE, como processo de obtenção de resultados íntegros e reprodutíveis.
- Apresentar vivências de que a aplicação de Boas Práticas Cromatográficas tenha contribuído na redução de custos relacionados a manutenção corretiva, ocasionado pelo mau uso de equipamentos e acessórios de CLAE.

5 METODOLOGIA

5.1 Bases Metodológicas

O presente estudo adota como metodologia a pesquisa bibliográfica e documental, constituindo-se desta forma em uma pesquisa exploratória sobre as boas práticas de CLAE na indústria farmacêutica.

Para tal, foram utilizados dados secundários de fontes como artigos científicos disponíveis na base *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), *Web of Science*, Periódico Capes, Google Acadêmico, além de informações contidas nas Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, *40ª edition of United States Pharmacopeia* (USP). Buscou-se também as seguintes publicações da área da cromatografia: *Scientia Chromatographica*, Revista Virtual de Química, *Revista Cromatografia y Técnicas Afines*, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas e *Journal of Chromatography*.

A fim de enriquecer a presente pesquisa bibliográfica, utilizou-se também como base metodológica, os guias de uso e/ou manual de instruções dos principais fabricantes e distribuidores de equipamentos e acessórios de CLAE no Brasil e no mundo, tais como: *Agilent Technologies*, *Merck*, *Sigma Aldrich Co*, *Thermo Electron Corporation*, *VWR Corporation*, *DC Tech Laboratory Technologies* e *Waters Corporation*, com vistas a trazer a contribuição dos fabricantes no presente trabalho acadêmico.

5.2 Modo de Pesquisa

Para o adequado enquadramento dos textos e guias disponíveis nas bases supracitadas, realizou-se a pesquisa com os seguintes termos: “Boas Práticas Cromatográficas”, “melhores práticas cromatográficas”, “princípios da cromatografia”, “resolução de problemas em cromatografia”, “otimização de processos cromatográficos” e “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em análises farmacêuticas”. Compreende-se também os mesmos termos em idiomas estrangeiros. Buscou-se o cruzamento, interpretação e organização das Boas Práticas Cromatográficas, apresentando a fundamentação teórica e prática de melhorias nos processos cromatográficos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Conceito de Boas Práticas Cromatográficas pode ser definido como um conjunto de orientações teóricas e práticas, que visam ao melhor aproveitamento e maximização da *performance* dos equipamentos e acessórios de CLAE, garantindo assim que requisitos regulatórios sejam plenamente atendidos. As Boas Práticas Cromatográficas dizem respeito a toda e qualquer etapa de uma operação cromatográfica, desde a instalação e qualificação de um equipamento, passando pelo correto preparo e adequação de seus consumíveis, até a geração e rastreabilidade de dados gerados.

A fim de melhor organizar a estrutura do presente trabalho, serão apresentadas as Boas Práticas Cromatográficas através de 3 tópicos principais:

1. Boas Práticas Cromatográficas nos processos de instalação, operacionalização e qualificação dos equipamentos.
2. Boas Práticas Cromatográficas nos processos de preparação de amostra e fase móveis/solventes utilizados na análise, assim como do adequado preparo e limpeza dos consumíveis e acessórios de CLAE.
3. Boas Práticas Cromatográficas nos processos de geração, integridade e rastreabilidade dos dados gerados.

6.1 Boas Práticas Cromatográficas nos processos de instalação, operacionalização e qualificação dos equipamentos.

De acordo com a RDC nº 17/2010, documento base para as Boas Práticas de Fabricação de medicamentos no Brasil, um dos requisitos para a certificação, é a identificação de quais os trabalhos realizados na indústria são passíveis de qualificação e validação, monitorando os riscos dessas atividades. A partir do momento que um laboratório farmacêutico incorpora um cromatógrafo líquido de alta eficiência em suas rotinas de análises laboratoriais, ele fica submetido à necessidade de qualificação no tocante as normas vigentes. A qualificação dos cromatógrafos é um processo formal que fornece evidências documentadas de que um instrumento é adequado para o uso pretendido e mantido em um estado de manutenção e calibração de acordo com seu uso. O processo de qualificação acontecerá em 4 etapas, que são

a qualificação de projeto (QP), a qualificação de instalação (QI), a qualificação de operação (QO) e a qualificação de desempenho. O processo de validação também incluirá os softwares utilizados no processamento e geração de dados (ANVISA, 2010).

Aliado a isso, a RDC nos diz da necessidade de um programa contínuo de monitoramento, realizado através de uma revisão periódica, interpretado como uma manutenção preventiva e/ou qualificações de desempenho, que é a verificação do funcionamento do equipamento.

Essa manutenção preventiva tem como objetivo assegurar o bom funcionamento do equipamento, que devido ao uso constante e até ininterrupto, pode sofrer com desgastes de alguns componentes eletrônicos e não-eletrônicos.

Nas qualificações de desempenho são realizadas as verificações dos módulos dos equipamentos, sobretudo no tocante a detecção dos analitos, efetuando injeções baseados em estudos estatísticos para detectar incertezas, desvios (alto, médio e padrão), tempos de retenção, além de repetibilidade e reprodutibilidade. O Laboratório contratante poderá utilizar metodologia interna própria ou a critério da empresa contratada. As verificações de *performance* são baseadas em testes com padrões que deverão estar dentro dos limites de aceitação definidos pelos fabricantes dos equipamentos e pelos órgãos reguladores e fiscalizadores, para garantir os resultados apresentados. (CASE ANALÍTICA - ASSISTÊNCIA TÉCNICA, 2016).

A qualificação de desempenho é importante não apenas por garantir o enquadramento às legislações vigentes, mas por garantir a rastreabilidade das medições, a confiança nos resultados medidos, a redução da variação das especificações técnicas dos produtos, a diminuição de defeitos que possam gerar manutenções corretivas dispendiosas e a compatibilidade das medições. (LABVISION INSTRUMENTS, 2017).

O Compliance para laboratórios de controle de qualidade farmacêutico - Informações sobre cartas de advertência do FDA elaborado pela Agilent Technologies, um dos maiores fabricantes de cromatógrafos, nos traz os termos de conformidade e integridade corporativa, abrangendo os requisitos necessários para que um laboratório de qualidade farmacêutico possa cumprir os requisitos exigidos pelo FDA, e de certa forma, por diversas agências reguladoras ao redor do mundo. O

documento em questão, descreve os requisitos necessários para as boas práticas na qualificação de equipamentos de laboratório, sendo eles:

- O Desenvolvimento de um plano mestre de qualificação de equipamentos relacionando todos os equipamentos que serão qualificados e descrevendo o método de qualificação de equipamentos, assim, serão definidos os procedimentos de calibração e/ou qualificação detalhados e critérios de aceitação para cada categoria de instrumento. Não esquecendo do desenvolvimento de Procedimento Operacional Padrão (POP) para executar qualificações (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Na elaboração dos procedimentos, é indispensável a utilização de explicação lógica e dados disponíveis na literatura para definir procedimentos de testes para equipamentos individuais. A qualificação de desempenho deve garantir que o equipamento funcione diariamente sem apresentar qualquer tipo de problema. Inclua medições no sistema que possam ser realizadas pelo corpo técnico do laboratório, como a análise da função de peças essenciais (Exemplo: lâmpadas) que afetam diretamente os limites de detecção e quantificação. Por exemplo, o tempo de uso da lâmpada é um fator importante, mas a medição constante da energia da lâmpada é mais ainda. Para equipamentos de cromatografia, a relação entre o trabalho realizado durante uma qualificação e os testes feitos durante o uso de rotina deve ser bem clara. Por exemplo, alguns aspectos do desempenho do instrumento são avaliados toda vez que o instrumento é usado, enquanto outros são avaliados durante a qualificação (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Definição da faixa operacional de cada instrumento como parte do exercício de especificação de requisitos. É necessário verificar se a faixa de qualificação inclui a faixa operacional especificada exigido pelos procedimentos analíticos previstos do laboratório. Exemplo: Se uma determinada metodologia analítica trabalha com a detecção do analito num comprimento de onda de 190 nm e 620 nm, a qualificação deverá ser realizada considerando esses valores de leitura (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- O mesmo procedimento de qualificação e critérios de aceitação devem ser usados para o mesmo tipo de equipamento, independentemente do fornecedor. Caso contrário, podem haver questionamentos sobre por que procedimentos

diferentes foram usados para o mesmo equipamento. Isso pode ser simplificado por um prestador de serviço capaz de qualificar instrumentos de diferentes fornecedores (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);

- A rotulação do equipamento com o estado de qualificação, indicando se está aprovado para uso ou reprovado para uso. Os dados que deverão ser exibidos são as informações sobre a última e a próxima data de qualificação, a pessoa que realizou a qualificação e o número de ativo do equipamento. Os instrumentos que não estão qualificados devem ser rotulados como “Não qualificado, não utilizar”. O equipamento deve, preferencialmente, ser removido do laboratório para não haver possibilidade de uso por parte do corpo técnico. Caso não haja possibilidade de remoção, deve haver garantias de que o mesmo não será utilizado (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Verificar se apenas equipamentos qualificados são usados para a análise de amostras (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Manter a guarda de todos os dados brutos dos testes de qualificação, O POP referente a qualificação dos equipamentos deverá definir o que constitui um registro completo para cada instrumento. Dados brutos, material comprobatório como cromatogramas e espectros, assinaturas do engenheiro ou técnico que realizou a qualificação e a assinatura de um avaliador são alguns exemplos. Quando a qualificação é realizada por um prestador de serviço, um representante da empresa contratante deve verificar e aprovar se a qualificação foi realizada de acordo com os procedimentos da empresa contratante. O trabalho de qualificação (inclusive testes, pontos e limites de definição) deve ser aprovado antes de o trabalho ser realizado. Esta análise deve abordar qualquer diferença entre a qualificação realizada e os procedimentos das empresas. Esse processo é colaborativo. Esse processo de avaliação da qualificação precisa estar documentado, a fim de garantir a rastreabilidade dessa verificação. A qualificação realizada por um prestador de serviço pode ser cientificamente equivalente, mas diferente da realizada anteriormente. Por isso é importante a verificação e comparação com qualificações anteriores (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Fazer atividades de limpeza e manutenção dos equipamentos regularmente, através da descrição (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);

- Investigar a causa raiz das execuções de calibração que apresentaram falha durante o processo. Assim que a causa raiz for identificada, uma ação corretiva deve ser iniciada para solucionar o problema específico do equipamento. Por exemplo, se um POP errado for a causa raiz, o mesmo deve ser corrigido, o equipamento deve ser qualificado novamente e após ser aprovado na requalificação o POP atualizado deve ser usado em todos os outros equipamentos do mesmo tipo (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Quando um laboratório terceiriza as atividades de qualificação, o mesmo ainda é responsável pela qualificação. Antes da qualificação do equipamento ser terceirizada, o prestador de serviço deve ser aprovado pela empresa para realizar o trabalho. Geralmente, esse processo de aprovação inclui uma análise de alto nível do sistema de qualidade. Em seguida, o prestador de serviço verifica se os procedimentos usados seguiram um processo de ciclo de desenvolvimento, validação e aprovação adequado em seu sistema de qualidade. Durante o processo de aprovação do prestador de serviço, qualquer diferença entre o trabalho de qualificação que será realizado e os requisitos da empresa deve ser abordada. Em alguns casos, os procedimentos da empresa podem ser atualizados, ou quando houver um requisito regulatório, o prestador de serviço pode ser capaz de configurar o trabalho de qualificação realizado para atender aos requisitos do laboratório. Qualquer diferença deve ser documentada e justificada (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017);
- Desenvolver e seguir um cronograma para requalificação regular, pois a qualificação de equipamentos não é um evento único; os órgãos reguladores exigem requalificações regulares. Os testes e critérios de aceitação devem ser os mesmos da qualificação inicial. A frequência da requalificação varia de acordo com o instrumento. A definição do período de requalificação pode ser definida através de consulta ao fabricante ou fornecedor do equipamento. A melhor prática é requalificar equipamentos de cromatografia no mínimo anualmente, a não ser que uma avaliação de riscos justificada e documentada sugira ciclos mais curtos ou longos (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

6.2 Boas Práticas Cromatográficas nos processos de preparação de amostras e fases móveis/solventes utilizados na análise, assim como do adequado preparo e limpeza dos consumíveis e acessórios de CLAE.

Para o adequado processo de preparação de amostras é indispensável que o laboratório de controle de qualidade tenha espaços destinados ao armazenamento das amostras, seguindo o preconizado pela RDC ^a 17 de 2010.

Art. 135. Os laboratórios de controle de qualidade devem ser separados das áreas de produção. (...)

Art. 136. Os laboratórios de controle de qualidade devem ser adequados às operações que se destinam.

§ 1º Deve existir espaço suficiente para evitar misturas e contaminação cruzada.

§ 2º Deve haver espaço para armazenamento adequado de amostras, padrões de referência (se necessário, com refrigeração), solventes, reagentes e registros.

Art. 138. Pode ser necessária a utilização de salas separadas para proteger determinados instrumentos de interferências elétricas, vibrações, contato excessivo com umidade e outros fatores externos. (ANVISA, 2010)

Assim, a projeção adequada do espaço, pode ser considerada uma Boa Prática Cromatográfica, contribuindo assim para a adequada resposta do componente analisado. Não havendo contaminação cruzada devido a não utilização correta do espaço, existe a confiabilidade que um determinado produto analisado não tenha um valor acima do especificado de impurezas, por exemplo.

Apesar de não ser considerado uma Boa Prática Cromatográfica, a amostragem é uma boa prática laboratorial, que se for realizada de forma inadequada, pode influenciar negativamente no resultado obtido pelo cromatógrafo. De acordo com Agilent Technologies (2013), algumas boas práticas relacionadas ao processo de amostragem se fazem necessárias, tais como: O plano de amostragem deve garantir que as amostras sejam representativas, caso não sejam, poderá ter resultados com variações expressivas no decorrer da análise

O Laboratório deve garantir a integridade da amostra ao longo de todo o uso. É importante o desenvolvimento de um procedimento para garantir a integridade da amostra durante todo o seu uso. Isso inclui procedimentos para transporte, recebimento, manuseio, proteção, armazenamento, retenção e/ou descarte de itens de teste.

6.2.1 Reagentes, solventes e fase móvel - Maximizando a *performance* do sistema cromatográfico

A utilização de reagentes dentro do prazo de validade e em perfeitas condições de uso é parâmetro mínimo para garantir a confiança nos resultados obtidos por um cromatógrafo. Reagentes ou soluções preparadas que estiverem contaminadas, degradadas, fora da validade, mal conservadas ou sem informações relativas ao fabricante, lote de produção, data de validade e grau de purezas não podem ser utilizados para o controle de qualidade de quaisquer medicamentos (ANVISA, 2010).

Além desses pontos, o reagente a ser utilizado em análise cromatográfica precisa de uma série de cuidados a fim de evitar a presença de contaminantes, a formação de fungos ou algas nas soluções tampão, a presença de bolhas ou gases dissolvidos na amostra e na fase móvel.

A empresa DC Tech Laboratory Technologies através do Guia Definitivo de solução de problemas em HPLC passa uma série de Boas Práticas Cromatográficas voltadas para os reagentes usados nas análises, conforme é visto no quadro 1

Quadro 1 – Boas Práticas na utilização de reagentes para CLAE

(continua)

Problema a ser evitado	O que pode ocasionar?	Boas Práticas recomendadas
Presença de Contaminantes	Ruído na linha de base / Picos Desconhecidos	Utilização de água ultrapura deionizada (filtrada em equipamentos de osmose reversa com filtro de 0,22 µm).
		Utilização de reagentes grau HPLC.
		Utilização de frascos para guarda de Fase Móvel limpos conforme procedimento interno do laboratório. Garantir a vedação das tampas.
Fungos ou Algas nas soluções tampão	Turvamento do Tampão	Descarte de tampão nesta condição. Preparo de novo tampão.
	Entupimento da Coluna Cromatográfica / Aumento da pressão de trabalho	Limpeza da coluna com água e posteriormente com solventes orgânicos, conforme método de limpeza presente neste trabalho

Quadro 1 – Boas Práticas na utilização de reagentes para CLAE**(conclusão)**

Problema a ser evitado	O que pode ocasionar?	Boas Práticas recomendadas
Fungos ou Algas nas soluções tampão	Como prevenir fungos e algas na solução tampão?	Em caso de guarda do tampão, adição de solvente orgânico, caso a fase móvel utilizada leve solvente em sua composição.
		Adição de 100 ppm de Azido de Sódio nas soluções tampões aquosos. Verificar a possibilidade de interferência no cromatograma do analito analisado.
		Determinação do prazo de estabilidade do tampão, para efetuar o descarte caso ultrapasse o tempo necessário.
Presença de bolhas ou gases dissolvidos	Ruído na linha de base	Degaseificação da Fase Móvel antes de colocação no cromatógrafo.
		Utilização de uma unidade degaseificadora no cromatógrafo
		Tampas devidamente vedadas, não permitindo a absorção de gases contidos na atmosfera
		Filtração da fase móvel através de filtros inertes de 0,2 µm ou 0,45 µm
		Adequada homogeneização da Fase Móvel

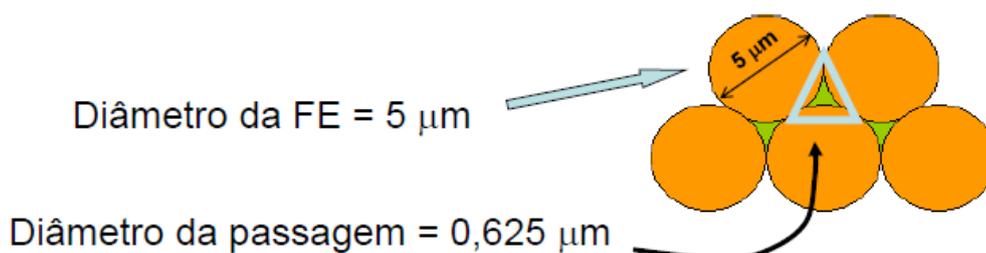
Fonte: Adaptado de Guia Definitivo de solução de problemas em HPLC

A importância da filtração e degaseificação da fase móvel, além da utilização de reagentes grau HPLC são descritas como fundamentais em diversos guias de maximização de *performance* das análises de CLAE.

A utilização de sistemas de filtração em 0,45 µm é justificado também no *Troubleshooting Guide* da fabricante Termo Scientific, pois o uso desse tipo de filtro irá reter material particulado que possa vir a bloquear ou mudar a seletividade da coluna, além de que pulsões da bomba, selos e as *check valves* terão melhor desempenho e suas vidas úteis serão maximizadas (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

A escolha de membrana com porosidade de $0,45\ \mu\text{m}$ se deve ao fato de que no geral, os recheios das colunas cromatográficas usadas em laboratórios de controle de qualidade são fabricados com tamanho de partícula de $5\ \mu\text{m}$ sendo que o diâmetro de passagem do leito desse tipo de coluna possui o tamanho de $0,625\ \mu\text{m}$, isto é $1/8$ do diâmetro da fase estacionária, conforme visto na figura 3. Desse modo as membranas de $0,45\ \mu\text{m}$ permitiriam apenas a passagem de partículas com tamanho inferior a $0,45\ \mu\text{m}$ não havendo o entupimento desse leito cromatográfico. Para casos de recheios com diâmetros inferiores a $4\ \mu\text{m}$, recomenda-se como boa prática cromatográfica a utilização de membranas de filtração com porosidade de $0,22\ \mu\text{m}$. Em alguns casos, fase móveis que possuem grande quantidade de solução tampão de alta concentração em sua composição, recomenda-se como boa prática cromatográfica a sua filtração diária, a fim de evitar precipitação de sais dentro do frasco de armazenamento (COSTA, 2010).

Figura 3 – Ilustração do diâmetro de passagem de uma coluna cromatográfica com partículas de tamanho de $5\ \mu\text{m}$.



Fonte: COSTA (2010)

O tipo da membrana também influenciará a qualidade da filtração da fase móvel. Membranas de ésteres de celulose são indicadas para filtração de água, solução tampão ou água acidificada. Membranas de Nylon permitem a passagem de água e solventes em geral, com exceção de clorofórmio, éteres, diclorometano e ácidos fortes (COSTA, 2010).

Ressalta-se que em casos de análises que necessitem de alta sensibilidade, não é recomendada a filtração de acetonitrila ou soluções que a possuam em sua composição a fim de evitar vestígios de produtos da reação da Acetonitrila com Nylon (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

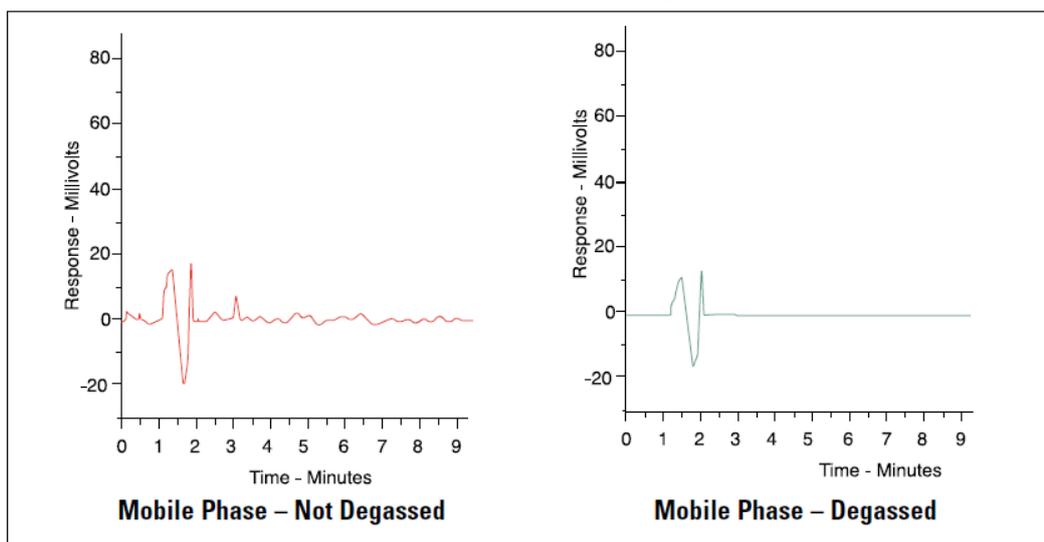
No tocante ao preparo da fase móvel ou do reagente a ser utilizado para o processo de cromatografia líquida de alta eficiência, é indispensável citar que o processo de desgaseificação das soluções utilizadas nos sistemas cromatográficos

permite uma melhor eficiência dos resultados obtidos por CLAE, não ocorrendo instabilidade no sistema, mudança de tempo de retenção de picos e até surgimentos de picos indesejados, além de evitar desgaste prematuro de peças, acessórios e componentes dos equipamentos. Essa instabilidade do sistema ocorre pelo fato de que o gás O₂ absorve em qualquer comprimento de onda abaixo de 215 nm, trazendo instabilidade em métodos de varredura ou que trabalhem nessa faixa de leitura (COSTA, 2010).

Os gases dissolvidos podem ser retirados pelos processos de sonicação, isto é, utilização de equipamento de ultrassom, filtração à vácuo e borbulhamento com gás hélio (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

Na figura 4 pode ser visto a diminuição do sinal ruído e consequentemente da melhora da linha de base de um cromatógrafo que esteja com uso de uma fase móvel que sofreu desgaseificação. Interessante destacar que o fabricante ao exibir esse comparativo não apresentou qual técnica foi aplicada para fazer a retirada de gases dissolvidos na fase móvel, podendo inferir que independente da técnica escolhida, o resultado obtido com o processo de desgaseificação traz benefícios incontestáveis na aplicação da técnica de cromatografia líquida.

Figura 4 – Comparativo do sinal resposta de uma fase móvel que não sofreu desgaseificação e de outra que passou pelo processo de desgaseificação.



Fonte: THERMO SCIENTIFIC (2016)

O melhor método para desgaseificação é o borbulhamento à gás hélio, de acordo com a fabricante Thermo Scientific, porém habitualmente, devido ao menor custo, recomenda-se a utilização dos dois primeiros processos citados anteriormente

para a retirada dos gases dissolvidos na fase móvel como boa prática cromatográfica numa combinação da filtração mais 20 minutos de sonicação com agitação constante (COSTA, 2010).

Aliado a isso, para que se atinja o máximo desempenho de um cromatógrafo, é necessário o uso de reagentes próprios para as suas análises, que possuem um grau específico de pureza para HPLC, intitulado “Grau HPLC”. É considerado reagente grau HPLC os solventes que possuem propriedades químicas e limites de temperatura aplicados à análise; possuam transparência óptica ou baixo índice de absorção no UV, especialmente para análises que requerem alta sensibilidade espectrofotométrica; sejam livres de partículas na faixa de exclusão em torno de 0,2 a 0,45 μm ; e que apresentem baixos níveis de corrosão em aço inox SS316; além de serem livres de íons halogêneos tais como HCl, KCl, NaCl e NH_4Cl , livres de gases dissolvidos (bolhas) e por fim baixos índices de viscosidade (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

A utilização de reagentes grau HPLC traz de início um pouco mais de custos ao processo analítico já que são reagentes mais caros devido aos inúmeros processos de eliminação de impurezas a que são submetidos. Em alguns casos, a utilização de reagentes que não possuem o grau HPLC, ocasiona o surgimento de picos de impurezas oriundas do próprio solvente ou ainda oriundas da degradação do analito a ser quantificado, atrapalhando a sua adequada quantificação, seja devido a diminuição do sinal resposta do analito principal, da quantificação inadequada de impurezas como se fossem o analito ou da co-eluição dessas impurezas (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

A coluna cromatográfica vai reter qualquer material particulado que passe no fluxo do sistema de CLAE. Quando o laboratório opta em não usar reagentes de grau HPLC ou reagentes impuros, por questões de corte de custo por exemplo, acaba invariavelmente tendo problemas analíticos, já que a utilização de solventes impuros no HPLC provoca adsorção irreversível de impurezas na entrada e saída da coluna. Estas impurezas bloqueiam sítios de adsorção, mudam a seletividade da coluna e eventualmente levam a quebra dos picos no cromatograma. Na eluição com gradiente, por exemplo, estas impurezas geram picos fantasmas, que são picos que sempre aparecem na mesma posição no cromatograma. Sua origem não é a amostra, mas as impurezas de solventes ou outros aditivos encontrados nos solventes.

A fim de verificar a possível formação de picos fantasmas, recomenda-se correr o gradiente sem injetar a amostra no início de cada método para determinar se picos fantasmas aparecem, evidenciando assim possíveis contaminações da fase móvel ou da coluna cromatográfica (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

A utilização de frascos limpos evita grande parte das contaminações, porém faz necessário a rinsagem do mesmo com o solvente que for utilizar, ainda que o solvente de guarda seja água ultrapurificada, a fim de se retirar possíveis resíduos do processo de lavagem. O adequado armazenamento constitui-se como uma boa prática cromatográfica, já que as soluções armazenadas podem sofrer oxidação ou reações fotoquímicas. Recomenda-se a utilização de frascos de vidro borossilicato âmbar, que é inerte a maioria dos reagentes usados nas técnicas de CLAE, a fim de evitar quaisquer reações indesejadas (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

Cita-se ainda como Boas Práticas Cromatográficas para os solventes, de acordo os manuais presentes neste trabalho, as diretivas a seguir:

- Caso o solvente esteja em uso pelo equipamento, garantir que não existe entrada de ar entre a tampa e o canal, para que não ocorra reações indesejáveis, além da formação de bolhas e utilizar filtros de entrada para proteger o sistema cromatográfico de possíveis partículas contaminantes (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).
- A não reciclagem ou uso de solventes que já tenham tido contato com os canais do equipamento para o preparo de amostras, a fim de evitar possíveis contaminações (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).
- A troca diária do frasco que tiver 100% de água ultrapurificada, para que não aconteça crescimento microbiano (WATERS CORPORATION, 2002).
- A substituição semanal do solvente que for utilizado para limpeza da seringa de injeção e do selo do pistão (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014).

O preparo das fases móveis requer o mesmo cuidado em relação à manipulação de quaisquer reagentes para HPLC. A medição dos componentes a serem utilizados na fase móvel deverá ser feita de forma separada, antes da mistura deles, já que em algumas misturas de água com solventes orgânicos, entre eles

metanol e etanol, acontece a contração do volume devido a interações moleculares. Em alguns casos, recomenda-se inclusive o preparo diário da fase móvel, ou em casos de análises que o processo de mistura da fase móvel é realizado no cromatógrafo, que a solução tampão seja preparada diariamente (COSTA, 2010).

6.2.2 Soluções Tampões – Cuidados em seus preparos.

O preparo das soluções tampões requer cuidados especiais, visto que por conter água é natural o processo de crescimento microbiano. O surgimento de fungos e algas podem ocasionar a alteração na seletividade das colunas cromatográficas e uma diminuição na precisão das análises cromatográficas, por isso a determinação da vida útil dos tampões mais utilizados nas análises cromatográficas, constitui-se como uma boa prática cromatográfica. A verificação e determinação da vida útil de um tampão traz benefícios como a economia de reagentes, a diminuição da frequência de preparo e a manutenção das condições cromatográficas ideais para a análise (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

Em alguns casos, é possível a compra de alguns tipos de soluções tampões usados em análises cromatográficas através de fornecedores qualificados, devendo ser verificado a relação custo-benefício dessa decisão.

O preparo do tampão possui um fator de sensibilidade relevante que é a faixa de ajuste do pH. Em análises rotineiras, observa-se que a adição inadequada de soluções ácidas ou básicas para a correção do pH da solução tampão proporciona uma saída do valor pretendido inicialmente. As vezes o gotejamento de uma única gota é capaz de fazer com que o pH da solução saia do valor meio de faixa. Entende-se como valor meio de faixa, o valor alvo determinado por uma metodologia analítica. Equipamentos laboratoriais de pequena sensibilidade costumam ter duas ou 3 casas decimais de precisão para determinação de pH. Por exemplo: Existem soluções tampões que possuem o pH para ajuste em 6,8.

Se um equipamento realiza a medição de uma solução com pH em 6,86 e de outra solução com pH 6,75, qual delas é possível utilizar? Qual está mais adequada a metodologia em questão? Algumas metodologias definem intervalos para o ajuste do pH, permitindo que o analista possa realizar o ajuste da solução tampão dentre aqueles limites máximos e mínimos. Em alguns casos, o intervalo permitido é de

$\pm 0,05$. Isso significa que para um pH de 6,8 será possível ajustar a solução para um pH de 6,75 à 6,85. No geral, é recomendado como uma boa prática cromatográfica que o valor final da solução tampão fique dentro do intervalo de $\pm 0,02$ unidades de pH (WATERS CORPORATION, 2002).

Outra questão sempre muito discutida em laboratórios que utilizam a cromatografia como técnica para quantificação das amostras é o momento do ajuste do pH. Em casos que a fase móvel é constituída por mistura de solventes orgânicos com soluções tampões, qual é melhor momento para o ajuste do pH? Seria no preparo da solução tampão ou depois que a solução tampão é adicionada aos solventes orgânicos?

De acordo com o *HPLC Troubleshooting Guide* da fabricante Waters Corporation, publicado em 2002, preferencialmente deve ser realizado o ajuste do pH na solução tampão antes da adição de qualquer solvente orgânico, já que ao adicionar solventes orgânicos na solução aquosa haverá o deslocamento da concentração de íons H^+ , além de que o medidor de pH foi calibrado e ajustado para fornecer resultados precisos em soluções aquosas. Porém existem exceções, como o caso de determinados sais, como por exemplo aminas de cadeia longa, que possuem solubilidade limitada em água. Nessas situações, são adicionados os solventes orgânicos na fase aquosa antes do ajuste do pH, com o intuito de melhorar a solubilidade dos sais e em seguida é realizado o ajuste do pH da fase móvel. Em outros casos, com a adição de solventes orgânicos, um novo equilíbrio é atingido, com mudanças bruscas do pH da solução final. Recomendando-se assim, um pequeno ajuste do pH da fase móvel final.

Sendo possível, recomenda-se um estudo da capacidade de tamponamento da solução aquosa e da fase móvel (isto é, da solução tampão com pH ajustado misturado com solvente orgânicos), através de uma curva de titulação, onde é realizado adição de base e ácido em ambas as soluções, a fim de verificar se a adição antes ou depois do solvente orgânico não está interferindo na capacidade de tamponamento da fase móvel (WATERS CORPORATION, 2002).

6.2.3 Escolhendo o tipo apropriado de água para análises com CLAE

A utilização de água em sistemas cromatográficos é de grande importância, seja no preparo de tampão/fase móvel, ou na limpeza e regeneração de colunas, para sistema de fase reversa.

Os diversos fabricantes de sistemas cromatográficos preconizam a utilização de água ultrapurificada em sistemas cromatográficos, a fim de evitar o surgimento de picos na linha de base, além da detecção de impurezas indesejáveis no processo analítico (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

Á água ultra purificada possui baixa concentração iônica, baixa carga microbiana e baixo nível de Carbono Orgânico Total (COT). Os baixos níveis de COT são importantes para garantir que a água não tenha em sua composição diversos tipos de compostos químicos orgânicos potencialmente perigosos que possam interferir no processo de quantificação e identificação dos analitos. A água ultrapurificada é considerada estéril, já que uma de suas membranas de filtração é de 0,22 µm, aliado também a utilização de outros componentes de filtração e eliminação de micro-organismos, como lâmpadas de ultravioleta.. Os requisitos preconizados são: possuir a condutividade de 0,055 S/cm à 25 °C, resistividade maior que 18,0 MΩ.cm e 0,05 ppm (ou 0,05 mg/L) de Carbono Orgânico Total (ANVISA, 2010).

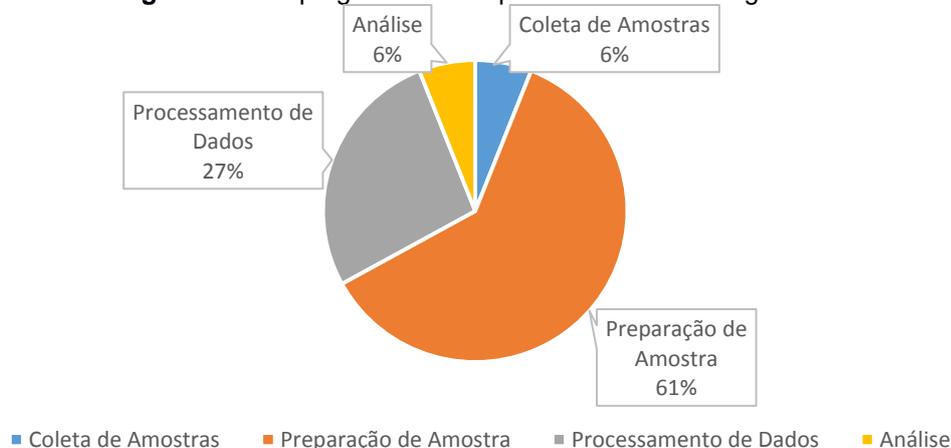
6.2.4 O preparo da amostra e sua criticidade no processo de ensaio cromatográfico.

O cuidado no preparo das amostras para cromatografia constitui um item importante das Boas Práticas Cromatográficas, visto que esta etapa é o objeto e maior fonte de erros do ensaio aplicado. Um preparo inadequado pode ocasionar resultados imprecisos e falsos, oriundos de diversos fatores que serão abordados no presente trabalho.

Conforme pode ser visto na figura 5, dentro de uma análise cromatográfica padrão, 61% do tempo dispendido é utilizado no processamento da amostra, incluindo nesta etapa o preparo da amostra para o ensaio requerido. Por ser a etapa que consome a maior parte do tempo de uma análise cromatográfica, será também a que possibilitará uma maior possibilidade de erros, pensamento este corroborado pela figura 6, onde é apresentando que 30% dos erros gerados nas análises

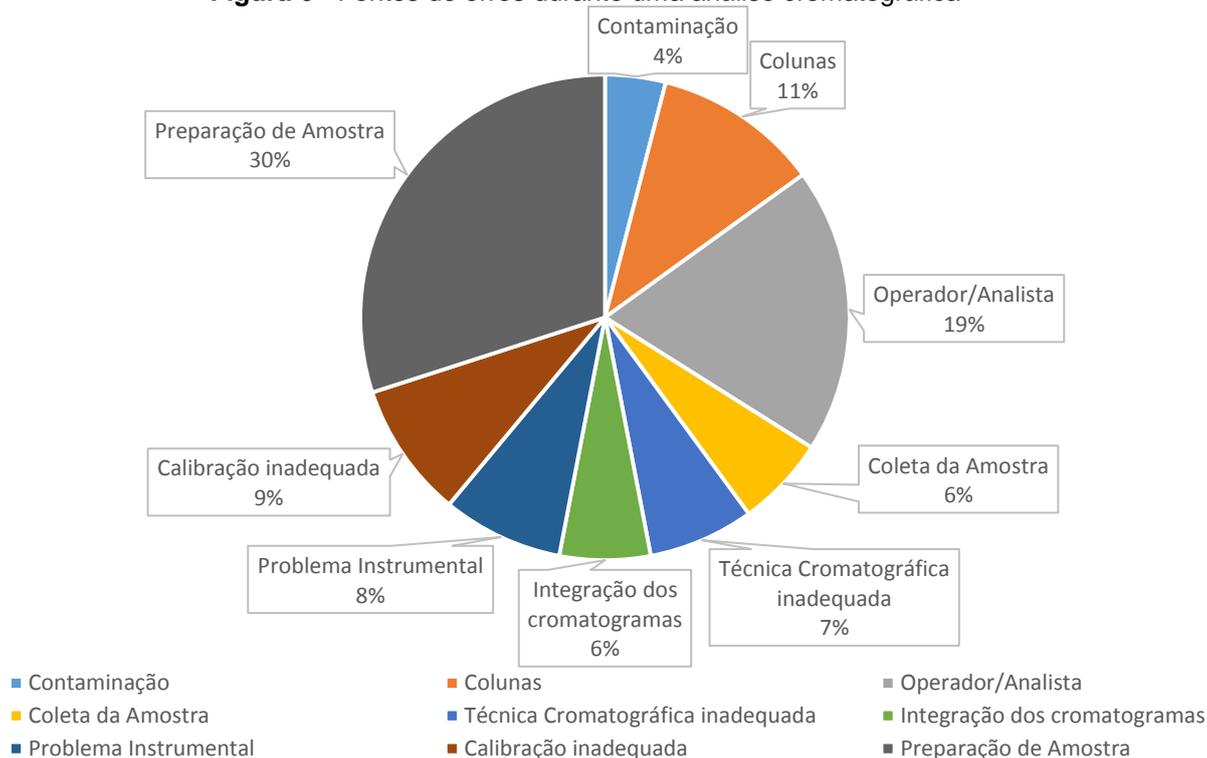
cromatográficas são oriundas também da etapa do preparo de amostra (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

Figura 5 - Tempo gasto numa típica análise cromatográfica



Fonte: Adaptado de: AGILENT TECHNOLOGIES (2013)

Figura 6 - Fontes de erros durante uma análise cromatográfica



Fonte: Adaptado de AGILENT TECHNOLOGIES (2013)

Para garantir a adequada quantificação do(s) analito(s), é necessário que as substâncias a serem quantificadas ou detectadas, estejam totalmente solubilizadas na solução preparada, através do correto preparo da solução que servirá de diluente da sua amostra, conforme instrução de preparo constante na monografia. Alguns métodos recomendam a filtração prévia, decantação ou centrifugação da solução

amostra, para que assim seja separado sólidos insolúveis que possam atrapalhar a extração, solubilização ou carrear do ativo, por exemplo. Destaca-se que em alguns casos, quando possuir solução tampão em sua composição, o diluente também precisará passar por processos de filtração como o da fase móvel, para garantir que o mesmo não contenha partículas que poderão reagir com o analito (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

Interessante destacar ainda que são utilizadas algumas técnicas em determinadas amostras, durante o preparo da solução que carreará as substâncias analisadas, a fim de melhorar o seu processo de solubilização, como o uso de um equipamento de ultrassom, que por meio da sonicação, consegue a divisão e quebra das partículas maiores em menores, aumentando a superfície de contato das moléculas, melhorando sua solubilização.

As amostras depois de preparadas são usualmente filtradas em filtros de seringa, contendo uma membrana de filtração, descartável e não reutilizável mais de uma vez, destinadas a filtração de uma única amostra, ou ainda, membranas funcionalizadas, que possuem atividade química e reatividade alta com certos compostos. É importante a utilização de membranas compatíveis com os solventes utilizados, para não ocorrer extração de componentes das membranas, que podem interferir no processo cromatográfico (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

Os filtros de membrana mais utilizados para típicas análises cromatográficas são os de celulose regenerada (RC), acetato de celulose (RA), nitrato de celulose (RN), nylon, politetrafluoretileno (PTFE) e fluoreto de polivinilideno (PVDF). O mais usado é o de celulose regenerada por ter baixa reatividade e ser eficaz em amostras orgânicas, inclusive para hidrocarbonetos aromáticos poli nucleares, soluções aquosas, bio-amostras, apresentando menor adsorção de proteínas, fornecendo grande recuperação em amostras de diversos tipos (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

Poderia se pensar que uma vez determinado o tipo de membrana de filtração a ser usado na metodologia analítica, celulose regenerada, PDVF, PTFE, não haveria risco de extração ou contaminação indesejada. Contudo, existem diferenças nos materiais empregados para fabricação do corpo do filtro de seringa contendo membranas do mesmo tipo entre fabricantes. Em algumas monografias, é inclusive definido a marca e o fabricante do filtro, a fim de evitar quaisquer interferências por

causa desta etapa do processo (MEIO FILTRANTE, 2003). Na figura 7 é apresentando alguns tipos de filtros de seringas.

Por isso, é uma boa prática cromatográfica a verificação de possível interferência do uso de determinado tipo de filtro de seringa no ensaio cromatográfico.

Figura 7 - Exemplos de filtros de seringa utilizados na filtração de amostras para CLAE.



Fonte: AIJIREN AUTOSAMPLERIAL (2017)

A fim de enriquecer o presente trabalho, destaca-se que a precipitação da amostra dentro da coluna cromatográfica acontece em diversos casos, quando o diluente é mais forte em termos de polaridade do que a fase móvel. Isso é motivado pelo fato da amostra ser “forçada” a dissolver no diluente mais forte, e posteriormente em contato com a fase móvel menos forte em termos de polaridade, acontecerá a sua precipitação dentro da coluna cromatográfica, ocasionando uma quantificação errada, além da perda da eficiência do processo cromatográfico, devido ao entupimento do leito cromatográfico (COSTA, 2010). Outro problema que ocorre devido a inapropriada diferença de polaridade entre diluente e fase móvel é o surgimento de erros na linha de base ou o aparecimento de picos indesejados quando ocorrer a passagem do diluente no detector do cromatógrafo (THERMO SCIENTIFIC, 2016).

Cabe ressaltar que em laboratórios de controle de qualidade no Brasil, as metodologias analíticas empregadas são validadas por exigência da ANVISA, em caso de desenvolvimento próprio ou terceirizado, ou ainda oriundas de farmacopeias, não permitindo assim, mudanças na composição dos diluentes e fase móvel (ANVISA, 2017).

A colocação das amostras nos *vials* também se configura de uma importância ímportante, já que eles serão os veículos de armazenamento da amostra durante todo o ensaio realizado pelo cromatógrafo. Após a colocação das amostras em seu interior, eles recebem uma tampa para que fiquem ali vedados até a retirada da amostra para

injeção no equipamento, impedindo desta forma a evaporação dos solventes ali presentes. Essas tampas são acompanhadas dos septos que podem ser inteiriços ou apresentarem um pré-corte pequeno no seu meio, para facilitar a permeação da agulha em seu interior.

Destaca-se que é uma boa prática saber qual é melhor tipo de tampa para ser utilizado nos *vials*, para evitar que por exemplo o a agulha de injeção quebre ou entorte durante o processo de injeção das amostras, evitando prejuízos financeiros e analíticos para os ensaios realizados.

Os *vials* para laboratórios de controle de qualidade na indústria farmacêutica podem ser de vidro borossilicato ou de poliuretano, sendo utilizados de forma geral o primeiro tipo, já que o vidro é inerte e de baixa reatividade. Eles podem ser incolores ou de coloração âmbar, de acordo com a foto sensibilidade de cada analito. Podem possuir diferença no seu corpo, boca ou interiores, e podem ser de rosca ou de pressão a forma de fechamento com a tampa (ANALÍTICA, 2017).

Nos equipamentos com amostradores automáticos, o uso de *vials* de 2mL é padrão, possuindo 12 mm de largura e 32 mm de altura, podendo ser utilizados na sua capacidade máxima, isto é, até o gargalo do *vial*, ou ainda, a utilização de *vials* com graduação de 1,5 mL, marcada no corpo, conforme visto na figura 8 (ANALÍTICA, 2017).

Figura 8 - Diferentes tipos de preenchimento de vials.



Fonte: ANALÍTICA (2017)

Destaca-se que em alguns equipamentos, o preenchimento dos *vials* até seu gargalo pode estabelecer resultados imprecisos, devido à produção de vácuo na agulha do amostrador, ocasionando uma sucção maior de amostra, gerando desvios nos resultados. Como boa prática cromatográfica, é recomendado verificar junto com o fabricante do cromatógrafo se é possível usar o *vial* com preenchimento total de sua capacidade ou parcial (AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

Por fim, ainda dentro do contexto dos cuidados no preparo das amostras, salienta-se que algumas técnicas de boas práticas de laboratório auxiliam na diminuição da probabilidade de erros na análise cromatográfica, tais como: a correta identificação dos reagentes, solventes e vidrarias a serem utilizadas; a pesagem, solubilização, diluição e acerto de volume das amostras diluídas em temperatura adequada para o laboratório, conforme preconizado nos documentos regulatórios, o cumprimento do roteiro proposto pela monografia analítica, que incluem os cuidados especiais na manipulação e preparo da amostra, a utilização de determinado tipo de filtros, sequência correta de diluições, caso possuam, além da estabilidade térmica e fotoquímica da solução amostra. Evitando assim a utilização de amostras que já estejam degradadas, que não trarão a recuperação pretendida (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

6.2.5 Colunas cromatográficas: o consumível indispensável do sistema cromatográfico

As colunas cromatográficas são indispensáveis para uma operação cromatográfica, visto que é nelas que ocorrem as separações dos analitos em análise, permitindo assim a sua quantificação, através de resultados comparados a um padrão preparado e injetado, sob concentrações conhecidas (ANVISA, 2010).

Sem uma coluna cromatográfica em boas condições de uso, os resultados gerados podem estar comprometidos, não ocorrendo da forma pretendida a separação dos analitos. Como seria possível uma correta identificação, se um determinado dado gerado pode ser de dois ativos, quando ocorre por exemplo a co-eluição de dois picos? A área quantificada pertence a qual substância? Desde modo, é de vital importância práticas que culminem na maximização da *performance*, aliado a processos que evitem, minimizem ou reparem desgastes sofridos pelas colunas cromatográficas ao longo dos ensaios (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

Quando uma coluna cromatográfica está deteriorada ou com o filtro entupido ela costuma apresentar alguns sinais, tais como: O surgimento de picos indesejados, de picos quebrados ou divididos, formação de “ombro”, “cauda” ou frente no pico, alteração nos tempos de retenção, mudanças bruscas da pressão do trabalho, formato

ruins dos picos, ocasionando mudanças na assimetria, nos pratos teóricos, entre outras unidades de medição da performance da coluna (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

Como já dito anteriormente, a filtração das soluções e reagentes utilizados é de fundamental importância para evitar entupimentos no leito cromatográfico. Esses entupimentos ocorrem devido à formação de canais de empacotamento na coluna, principalmente nas suas extremidades. Esses canais de empacotamento muitas vezes são irreversíveis, alterando a seletividade da coluna, já que acabam absorvendo impurezas, que bloqueiam os sítios de adsorção das colunas e proporcionam uma degradação química. Alguns fabricantes de colunas cromatográficas recomendam, devido a essa situação, a utilização de pré-colunas, com o intuito de minimizar esses desgastes prematuros (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

A degradação química da coluna é ocasionada pelos reagentes que passam por seu interior, sendo que a vida útil de determinadas colunas se esvai devido à destruição da camada que recobre a sílica, no caso de colunas a base de sílica. Esse tipo de coluna possui estabilidade para trabalhar com solventes e soluções que estejam na faixa de pH de 2 a 8. O ideal é sempre consultar o fabricante, ainda que seja através do manual de operações contida na caixa da coluna, para identificar o pH de trabalho suportado pela coluna. Em alguns casos, uma degradação acelerada pode acontecer por escolhas inadequadas no desenvolvimento dos métodos. Algumas colunas à base de sílica possuem faixa de trabalho maior, no quesito pH, operando entre os pH 1 a 12. A armazenagem correta da coluna também evita o fenômeno da degradação química, sendo que as colunas cromatográficas a base de sílica, que são maioria em laboratórios de controle de qualidade farmacêutico, devem ser armazenadas com solvente sem próton. Desse modo, colunas de fase reversa, tais como C30, C18, C8, C4, C1, CN e fenil, devem ser armazenadas em acetonitrila/água, na proporção 50%:50%, caso a coluna venha a ser utilizada em período inferior a 1 mês. Caso a coluna cromatográfica fique mais de 1 mês armazenada aguardando análise, recomenda-se aumentar a proporção de orgânico para 90%:10%. Importante destacar que colunas específicas de alguns fabricantes deverão ser estocadas em uma proporção maior de solvente orgânico, independentemente do tempo de guarda estipulado, sendo alguns casos, com o solvente de estocagem também de acetonitrila: água, na proporção 90%:10%. Desse modo, recomenda-se a verificação da proporção

e do tipo de solvente de estocagem contido no certificado de garantia, ou ainda, o que for preconizado pelo fabricante da coluna. Já as colunas de fase normal, de sílica, diol, nitro, ciano ou amino, recomenda-se a estocagem em hexano/isopropanol na proporção de 90%:10%. (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017)

Um ponto importante e que constitui uma boa prática é o adequado fechamento das pontas das colunas, com seus respectivos adaptadores de extremidades, realizando a vedação completa da coluna, e desta forma evitando a secagem do seu recheio, durante o período de sua armazenagem.

Cita-se também que o adequado condicionamento da coluna, isto é, o tempo de equilíbrio necessário antes de realizar a injeção das substâncias, minimiza uma possível degradação química, por conta do equilíbrio das substâncias da fase estacionária, garantindo assim uma melhor reprodutibilidade e evitando que ocorram desvios dos tempos de retenção dos ativos analisados. (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014)

Em geral, é necessário que se passe fase móvel, o equivalente a 20 volumes internos da coluna cromatográfica, para atingir as condições de equilíbrio. (DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES, 2017).

Levando em consideração um fluxo adequado de trabalho e o volume interno da coluna devido ao seu tamanho, chegar-se-á ao tempo estimado de equilíbrio de acordo com a tabela 2.

Tabela 1 – Tempo de equilíbrio estimado para uma coluna cromatográfica.

(continua)

Dimensão da Coluna	Volume interno da coluna (mL)	Vazão (mL/min)	Tempo de equilíbrio estimado
250 x 4.6 mm	2.91	1.00	58
150 x 4.6 mm	1.74	1.00	35
100 x 4.6 mm	1.16	1.00	23

Tabela 1 – Tempo de equilíbrio estimado para uma coluna cromatográfica

(conclusão)

Dimensão da Coluna	Volume interno da coluna (mL)	Vazão (mL/min)	Tempo de equilíbrio estimado
50 x 4.6 mm	0.58	1.00	12
250 x 4.0 mm	2.20	1.00	44
125 x 4.0 mm	1.10	1.00	22
250 x 2.0 mm	0.55	0.25	44
150 x 2.0 mm	0.33	0.25	26
50 x 2.0 mm	0.11	0.25	9

Fonte: Adaptado de DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES (2017)

Recomenda-se ainda que após o uso da coluna cromatográfica, a mesma seja submetida a um processo de lavagem, que terá como objetivo a remoção de pequenas sujidades que tenham sido carregadas no interior da coluna, ou ainda, a solubilização de micro cristais que possam ter se formado devido a uso de soluções tampões, proporcionando desse modo que não aconteça o entupimento do leito cromatográfico após o seu uso ou uma mudança da seletividade desse consumível.

Conforme os guias de *troubleshooting* da Waters Corporation (2002), Thermo Scientific (2016), Agilent Technologies (2016), utilizados como referência no presente trabalho, notou-se que existem dois tipos principais de limpezas para as colunas cromatográficas, são elas:

1. Limpeza básica: Cujo objetivo é garantir que o período de estocagem futura não altere as condições físico-químicas da coluna, além de retirar pequenas impurezas ou cristais de sais do seu interior. Comumente, para cromatografia em fase reversa é usado água e acetonitrila para esse tipo de lavagem, podendo ser lavada de forma isocrática ou através de um gradiente entre esses dois solventes. É recomendada após o término de uma análise bem-sucedida, no que tange aos parâmetros cromatográficos.
2. Limpeza profunda: intitulado também de regeneração da coluna, que é uma limpeza com a utilização de diversos solventes, cujo objetivo é a

restauração das condições físico-químicas ideais da coluna, após a mesma estar apresentado problemas como quebras de picos e aparecimento de picos fantasmas, por exemplo. Alguns processos de regeneração são específicos para colunas de determinados fabricantes e outros assumem um caráter generalizado para outros tipos de coluna. Inclusive, por conta da retirada de muita sujidade, recomenda-se que faça de forma a não permitir o carreamento dos solventes para dentro do detector do sistema cromatográfico. Deste modo, poderá ser feito com a saída da coluna desconectada do equipamento ou realizada ainda em uma bomba avulsa, fazendo o recolhimento dos solventes usados para seu descarte. Em algumas colunas, o processo terá um desempenho melhor se realizado com a limpeza do filtro de entrada e saída da coluna, conforme será visto ainda neste subcapítulo, caso seja possível. Esses processos de limpeza profunda podem remover, ainda que pouco, parte da fase química ligada a sílica, por isso a saída do fluxo dos solventes não poderá ser feita ligada um detector de CLAE.

Para limpeza básica de colunas de fase reversa a base de sílica, recomenda-se a passagem inicial de água ultrapurificada com acetonitrila na mesma proporção da fase móvel, equivalente a 10 ou 20 volumes da coluna. Neste momento, a coluna pode ser aquecida para temperatura entre 40 a 50 °C, caso sua temperatura de trabalho seja a temperatura do ambiente do laboratório, para forçar a solubilização de sais. Em seguida, efetua-se um gradiente, invertendo a proporção de água e acetonitrila, até que se atinja 90% de solvente orgânico e 10% de água. O procedimento será realizado com a passagem dessa mistura ao equivalente a 10 a 20 volumes da coluna cromatográfica. Após a limpeza, a coluna cromatográfica será armazenada com uma proporção adequada de solvente orgânico e água, conforme já citado neste trabalho, levando em consideração as especificidades do fabricante e do tempo estimado de guarda. Se caso a amostra tiver sido solubilizada em solventes orgânicos de baixa polaridade ou contenha substâncias reconhecidamente que se adsorvem com facilidade, pode ser realizada antes da limpeza, injeções com THF com o objetivo de fazer a remoção dos materiais orgânicos que ainda estiverem adsorvidos na coluna (COSTA, 2010).

Interessante destacar que em algumas colunas de fase reversa, não é indicado a passagem de 100% de água ou solução aquosa na coluna, ainda que exclusivamente para limpeza, pois devido ao tipo de revestimento realizado em suas sílicas, pode ocorrer um colapso da fase hidrofóbica, levando justamente a um entupimento. Antes de qualquer procedimento de limpeza, é recomendado a leitura do manual de instrução da coluna, a fim de se detectar qualquer tipo de prevenção. Por isso é indicado que se inicie sempre uma limpeza com no mínimo 5% de solvente orgânico, ainda que se tenha utilizado uma fase móvel com grande concentração de sais. (KREPICH, 2009)

Para colunas cromatográficas de fase normal, o processo de regeneração poderá ser realizado através da passagem de 30 à 50 mL dos seguintes solventes: Hexano/Octano/Heptano, cloreto de metileno, isopropanol, THF, metanol e mistura equivalente a fase móvel sem conter os sais. (COSTA, 2010)

Para limpeza profunda, isto é, a regeneração de colunas de fase reversa a base de sílica, recomenda-se as seguintes metodologias:

1. Para colunas cromatográficas que carrearam durante muito tempo amostras que foram dissolvidas em alguma proporção de meio aquoso, sempre será necessário primeiramente a passagem de água. A passagem de 50 mL de água a 60 °C, além de 50 mL de metanol, 50 mL de acetonitrila, 25 mL de metanol e 25 mL de mistura equivalente a fase móvel sem a presença de sal. (SIGMA-ALDRICH, 2008) Ou ainda, 25 mL de mistura equivalente à fase móvel utilizada sem a presença de sal, 25 mL de metanol, 100 mL de acetonitrila, 25 mL de solução 75%:25% acetonitrila:isopropanol, 25 mL isopropanol, 25 mL cloreto de metileno e 25 mL de hexano. (AGILENT TECHNOLOGIES, 2014)
2. Para colunas cromatográficas que carrearam durante muito tempo amostras que não foram dissolvidas em nenhuma proporção de meio aquoso, será necessário a passagem de 50 mL de Isopropanol, 50 mL de cloreto de metileno, 50 mL de Hexano, 25 mL de Isopropanol e 25 mL de mistura equivalente a presença de fase móvel sem a presença de sais. (SIGMA-ALDRICH, 2008)

O processo de regeneração poderá ser potencializado pela limpeza dos filtros de entrada e saída da coluna. É uma prática que deverá ser realizada por analista com experiência, a fim de não haver perda do recheio da coluna, que culminará na

perda de eficiência e até a inutilização da coluna cromatográfica, conforme visto na figura 9.

Figura 9 – Passo a passo para limpeza do filtro de uma coluna cromatográfica

	<p>É necessário detectar se a coluna possui algum mecanismo para retirada de filtros. Algo que permita o rosqueamento das extremidades sem forçar demasiadamente o corpo metálico da coluna, que pode ocasionar quebras ou deslocamento de recheio.</p>
	<p>Após a confirmação da possibilidade de retirada do filtro, é necessário a separação dos filtros e das extremidades das colunas, respeitando o que for de entrada e o que for referente a saída da coluna.</p>
	<p>É necessário a inspeção visual do filtro de entrada da coluna, verificando se o filtro de fato está obstruído. No exemplo utilizado, percebe-se que existe materiais particulados no filtro de saída da coluna.</p>
	<p>Observar se alguma extremidade da coluna apresenta deslocamento do recheio. Esse "excesso" que foi anteriormente deslocado, precisará ser removido, para que a princípio não entupa o filtro da coluna novamente. Em casos de uso da coluna em sentido invertido, é capaz de se detectar acumulação de recheio em ambas extremidades.</p>
	<p>Separar o corpo da extremidade do filtro da coluna, caso seja possível. Observa-se que o filtro de saída da coluna está totalmente branco, devido a adsorção do recheio na tela metálica.</p>
	<p>Proceder a raspagem do filtro, com escova de polietileno, similar a uma escova dentária. Após, colocar o filtro e sua cabeça em banho ultrassom de 30 minutos, primeiramente com ácido nítrico 10% e posteriormente em água ultra purificada pelo mesmo período. Caso seja notado uma coloração da solução em algum momento, repetir o procedimento.</p>
	<p>Após a limpeza mecânica e química, ocorrida pelo processo de sonicação, será visível a tela dos filtros, devendo ser remontados e encaixados novamente na coluna cromatográfica, respeitando a origem das extremidades.</p>

Fonte: O próprio autor.

Por fim, seguem mais algumas boas práticas relacionados ao uso das colunas cromatográficas, de acordo com Agilent Technologies (2016) e Thermo Scientific (2016):

- Utilizar, preferencialmente, a coluna apenas na direção do fluxo marcada em seu corpo. Em caso de utilização no sentido invertido, manter esta condição até um processo de limpeza dos filtros. Ao não usar em sentidos aleatórios a cada ensaio, evita-se o entupimento de ambas extremidades e a mudanças bruscas no leito cromatográfico, que podem alterar a seletividade e a resposta da coluna.
- Criar formulários individuais para cada coluna cromatográfica utilizada no laboratório, com o intuito de ter um registro documentado do histórico de desempenho da mesma. Esse formulário possuirá informações como o produto analisado, em casos de laboratórios que não trabalhem com colunas dedicadas a determinados produtos, fluxo de trabalho utilizado, pressão média de trabalho, além de informações que servem para medir o desempenho analítico da coluna, tais como assimetria e tempo de retenção dos picos analisados, além dos pratos teóricos. Nesse formulário também poderá conter informações sobre qual equipamento a coluna foi utilizada, se foi realizada limpeza ao término da análise, se a coluna respondeu ao ensaio em relação aos parâmetros metodológicos e até mesmo se a coluna cromatográfica foi utilizada no sentido indicado pelo fabricante ou no sentido invertido. É indispensável que este formulário possua um campo de observação, para que o usuário aponte fatos relevantes ao uso, explicitando uma não resposta analítica, se houve a realização de algum processo além da limpeza básica da coluna, como a retirada de filtros ou a regeneração. Por fim, em caso de desativação da coluna, devido à perda de *performance* da mesma, é sugerido a colocação em anexo de um cromatograma, para que em caso de troca de produto ou tentativa de recondicionamento da mesma, tenha-se a ideia do estado real em que a coluna se encontra. Veja na figura 10 um modelo de formulário de acompanhamento de coluna.

- Utilizar conectores apropriados para a coluna, seja de polietileno, seja de aço inoxidável. Existem equipamentos que possuem conectores específicos para colunas de determinados fabricantes, não sendo possível adaptações devido a especificidade da coluna. Forçar a conexão de um conector, pode trazer prejuízos ao sistema e a coluna.
- Realizar uma limpeza básica sempre ao término da corrida de uma sequência, ou ainda, em caso de uso severo. Determinar um quantitativo de injeções para proceder com a limpeza da coluna.
- Armazene sua coluna cromatográfica em ambiente com temperatura e umidades controladas, independente da coluna ser nova ou usada. Ambientes com excessiva umidade podem provocar a formação de fungos na cabeça da coluna, somente pelo contato do ar, caso a mesma não esteja devidamente fechada.
- Evite lugares com vibração mecânica para a armazenagem da coluna cromatográfica, assim como quedas ou movimentos bruscos da coluna. Pode ocorrer deslocamentos do recheio e/ou alterações nos caminhos dos leitos cromatográficos, alterando a capacidade de resposta analítica diante dos ensaios.
- Armazenar as colunas cromatográficas sempre na horizontal, para que não aconteça o deslocamento do recheio para alguma extremidade, caso a mesma seja armazenada incorretamente na vertical.
- O processo de regeneração de coluna poderá ser realizado sempre que se observar pontos falhos na análise cromatográfica, porém esse processo é limitado na recuperação da coluna, não sendo possível a sua utilização infinita vezes.
- Realizar de forma separada a guarda das colunas cromatográficas novas e usadas, garantindo relatório de uso das colunas usadas e separação adequada para as colunas novas, conforme figura 11.

Figura 11 - Exemplo de armazenagem de colunas cromatográficas novas



Fonte: O próprio autor

A organização deste modo é baseada na popularidade de determinados tipos de coluna. De acordo com Majors (2007), as colunas de fase reversa representavam em 2007, 38% de todas as colunas cromatográficas utilizadas para HPLC, e as colunas de fase normal 13,9%, troca iônica 18%, quiral 8,7% e demais tipos 21,7%.

Entre as colunas de fase reversa, 44% eram do tipo C18 e 29 do tipo C8. Os demais tipos de fase reversa atingem juntas 27% do total. Deste modo, a catalogação apresentada na figura anterior, foi realizada separando as colunas em 4 grandes grupos. O primeiro grupo é o das colunas C18, que recebem etiquetas vermelhas, as colunas C8 recebem a cor amarela, as colunas dedicadas a parcerias de desenvolvimento produtivo (PDP) recebem a etiqueta verde e as colunas de demais tipos, como C4, fenil, de troca iônica, quiral, ciano e outras recebem a coloração azul. As colunas ainda são catalogadas por ordem de recebimento em planilha apropriada e protegida.

Após a separação pela sua composição ou destino, as colunas ainda são separadas pelo seu tamanho, proporcionando uma facilidade na busca da coluna no estoque, sempre que necessário. Em outros laboratórios, o tipo de coluna de PDP poderia ser trocado por produtos específicos, que requer a guarda separada devido a dificuldades de compras ou ao valor específico desses consumíveis. Interessante destacar que este modelo de organização é aplicável para qualquer laboratório de controle de qualidade, podendo ainda, caso seja necessário, a criação de novos grupos para englobar determinados tipos de coluna.

Quando se opta por fazer o controle digital dessas colunas, poderá ser elaborado relatórios apontando os produtos que mais consomem determinados tipos de colunas e se as mesmas estão respondendo de forma adequada aos ensaios propostos, determinado a partir da quantidade de colunas encaminhadas para cada produto (MAJORS, 2007).

6.2.6 O planejamento é uma Boa Prática Cromatográfica para diminuição de manutenções indesejadas.

Compreende-se que uma boa prática cromatográfica referente a manutenção envolva o quesito de planejamento, com a consequente gestão dos riscos inerentes a utilização do HPLC. Em alguns laboratórios de controle de qualidade, a prática única da manutenção corretiva nos equipamentos é usualmente normalizada até que o reparo do problema fique em valor inviável e opte pela compra de um novo equipamento, algo inadequado, visto que a qualificação de *performance* dos cromatógrafos, requisito exigido pelos órgãos reguladores, deve compreender um

período razoável, visando o atendimento dos requisitos de confiabilidade, reprodutibilidade e integridade dos dados gerados, conforme já citado no presente trabalho.

Um artigo publicado em 2018 pela doutoranda Amanda Carvalho Miranda, intitulado “Aplicação da ferramenta PDCA na otimização de equipamentos de análises instrumentais (HPLC/UPLC) na rotina de análises físico-químicas em uma indústria farmacêutica”, ambos da Universidade Nove de Julho, apresenta como a utilização do ciclo PDCA, ferramenta da qualidade amplamente utilizada na indústria farmacêutica, trouxe resultados positivos referentes a manutenção dos HPLC de determinado laboratório de controle de qualidade de uma indústria farmacêutica.

O Ciclo de gestão PDCA foi criado por Walter A. Shewhart, nos anos 20 do século XX, sendo disseminado por W. Edwards Deming nas décadas seguintes, cujo acrônimo é derivativo das palavras inglesas *plan* (planejar), *do* (executar), *check* (verificar/avaliar), *act* (corrigir), cujo enfoque é o de implementar o conceito de melhoria contínua nos processos de gestão. (PALADINI e CARVALHO, 2006, p. 11)

A vantagem da utilização do ciclo PDCA como ferramenta de gestão, é trazer não só a compreensão e a identificação de um problema, mas sobretudo os meios de corrigi-lo e mitiga-lo, atuando não somente nas consequências, e sim, também nas causas raízes do ocorrido. Isso se deve ao fato de que o entendimento é que o planejamento de qualquer atividade não é estático, realizado de uma vez só, de forma absoluta, mas que o processo é dinâmico, envolvendo as variáveis novas que surgem ao longo da execução do processo, acarretando assim em melhorias. (JUNIOR, 2017)

Na aplicabilidade do PDCA na manutenção dos HPLC's, o gestor deverá realizar um planejamento, além da criação de indicadores de desempenho que mostrarão se o planejamento anteriormente proposto tem sido cumprido. É a etapa essencial, já que ela norteará todas as ações realizadas posteriormente. Após o escopo do planejamento ter sido definido, o gestor colocará o plano em ação, sempre na observância do que foi proposto inicialmente. Em caso de não aplicabilidade de determinado item, é necessário a identificação do motivo da não realização, a fim de identificar possíveis causas raízes de problemas no próprio planejamento. Em seguida ou até mesmo paralelamente, inicia-se a checagem das ações realizadas, verificando os itens elencados em relação ao planejamento inicialmente proposto. Em caso de desvios, como proceder para corrigi-los, se eles já haviam sido contemplados no

planejamento ou se precisaram de um novo embasamento. Por fim, entra o processo de correção das falhas, implementando as ações que já podem sofrer uma adequação de rumos, já trazendo melhorias ao processo, antes do reinício do ciclo PDCA (ANDRADE, 2018). Na figura 12 é apresentado as etapas do ciclo PDCA.

Figura 12 – Representação das Etapas do Ciclo PDCA.



Fonte: ANDRADE (2018)

Com base no estudo “Aplicação da ferramenta PDCA na otimização de equipamentos de análises instrumentais (HPLC-UPLC) na rotina de análises físico-químicas em uma indústria farmacêutica nacional”, observa-se a aplicabilidade das 4 etapas do PDCA e seus resultados, vide quadro 2.

Quadro 2: Aplicação do PDCA em equipamentos de HPLC/UPLC em laboratórios de controle de qualidade.

<i>Plan</i> (Planejar)	<i>Do</i> (Fazer)	<i>Check</i> (Verificação)	<i>Act</i> (Ação)
<p>Avaliar quais os problemas frequentes apresentados pelos equipamentos de HPLC's e UPLC's relacionar estas causas com mau uso, conservação e até mesmo falta de conhecimento ao operar o equipamento (uso indevido). Quantificar a abertura de chamados feitos para manutenção e avaliar os itens mais frequentes de queixa.</p>	<p>Responsabilizar analistas para verificação e checagem diária dos equipamentos, com a finalidade de conservá-los e deixá-los sempre em boas condições de uso ao início ou término de qualquer análise. Realizar treinamentos sobre hardware e software do equipamento, com intuito corrigir e informar o modo correto de uso do mesmo.</p>	<p>Catalogar e acompanhar através de gráficos a evolução da conservação dos equipamentos e relacionar a redução de visitas de manutenção. Avaliar o comprometimento dos analistas quanto à responsabilidade diária de manter os equipamentos em boas condições de uso.</p>	<p>Mediante os resultados obtidos, elaborar um plano de manutenção preventiva dos HPLC's e UPLC's de modo a evitar gastos excessivos com visitas desnecessárias de técnicos e manter a vida útil das peças e compartimentos do equipamento de acordo com a conservação e preservação contínua durante o uso.</p>

Fonte: Adaptado de MIRANDA e SANTANA (2018)

A definição dos indicadores propostos pelos autores considerou alguns pontos que são repetitivos nas análises, em relação à rotina do laboratório de controle de qualidade, como a extração e preparação de uma amostra, preparo do equipamento de análise, corridas no equipamento e finalização adequada do uso. De acordo com o artigo, após a implementação do ciclo PDCA no laboratório de controle de qualidade farmacêutico, utilizado como objeto de estudo, foi possível observar a negligência de muitos analistas com as questões referentes à preparação adequada do equipamento para o início da análise, a troca de reagentes/solventes e a troca diária de água ultrapurificada nos canais do equipamento e até a limpeza adequada dos equipamentos após o término das análises. Assim, os autores investigaram a causa, observando que muitos erros realizados nessa rotina eram oriundos de inabilidade técnica na operação dos HPLC's, problema minimizado pela proposta dos autores em unir analistas júnior e analistas sênior nas mesmas atividades, já que um analista com uma experiência profissional maior, tendem a não cometer equívocos de quem não possui experiência ou conhecimentos técnicos profundos. Concomitantemente a isso, os autores propuseram a realização de cursos de reciclagem e treinamentos para todos os envolvidos na utilização do HPLC. Essas ações, de acordo com informações dos autores, geraram uma diminuição das aberturas de chamado de técnicos e conseqüentemente uma diminuição das trocas de peças e consumíveis desgastadas

antes do uso, proporcionando uma economia por ano no valor de R\$19.500,00. Destaca-se que a economia financeira atingida, somente pela aplicabilidade do ciclo PDCA, seria suficiente para a compra de equipamentos laboratoriais e/ou a contratação de treinamentos para os funcionários (MIRANDA e SANTANA, 2018).

6.2.7 As Boas Práticas Cromatográficas para a manutenção dos equipamentos.

Os equipamentos de CLAE possuem canais de entrada para a passagem de soluções específicas para o HPLC. Alguns equipamentos possuem 2, 4, 6 e até 8 canais de entrada diferentes. Recomenda-se como boa prática cromatográfica a utilização de canais dedicados, isto é, de canais específicos para determinadas soluções, se caso a rotina de análise do laboratório utilizar largamente os mesmos tipos de solvente. Assim evita-se por exemplo, em caso de uma contaminação, a obstrução de canais com precipitação de sal ou formação de fungos oriundos de soluções tampões. Destaca-se que alguns equipamentos já vêm com a orientação de que tipo de solução ou solvente utilizar em determinados canais, a fim de maximizar o desempenho em casos de métodos com gradiente de solvente. (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016)

Quando acontece a cristalização e posterior precipitação de sais, oriundos das soluções tampões dentro do sistema cromatográfico, podem ocorrer travamentos e desgastes das *check valves* e dos selões dos pistões, levando a uma possível quebra e danos a câmara de mistura da fase móvel. Isto geraria falhas no equipamento, levando a vazamentos, alterações no fluxo, mistura ou vazão da fase móvel, sendo detectados por alterações drásticas na pressão da bomba do equipamento. (NETO, 2009)

A fim de proteger o equipamento de CLAE de quaisquer partículas, além do processo de filtração, é recomendado como boa prática cromatográfica a utilização de filtros de fase móvel na entrada dos canais do HPLC, que realizam o último processo de filtração, garantindo assim que o eluente que percorrerá o leito cromatográfico não sofrerá interrupções. Esses filtros comumente são de aço inoxidável 316, conforme visto na figura 13. Podem ainda ser de polietileno de altíssima densidade ou ainda de vidro de borossilicato com elemento filtrante poroso de 2 µm, sendo facilmente limpos por processo de retro-lavagem (SUPELCO-ALDRICH INC, 2008).

Figura 13 – Fotografia de um filtro de aço inoxidável com elemento filtrante para HPLC.



Fonte: SUPELCO-ALDRICH INC (2008)

De acordo com Agilent Technologies (2016) é recomendável o uso de algumas Boas Práticas Cromatográficas referente a manutenção dos cromatógrafos, que estão expostas na quadro 3.

Quadro 3: Boas Práticas Cromatográficas para manutenção de equipamentos de CLAE.

(continua)

Frequência de manutenção	Boas Práticas Cromatográficas recomendadas.
Diária	Purgar cada canal de solvente novo a 2,5 mL-3 mL durante 5 min. para evitar carreamento de bolhas
	Aqueça a lâmpada durante, pelo menos, 1 hora, antes do início da análise
	Equilibrar o sistema 15 minutos antes da análise com os solventes de aplicação.
	Verificar se o selo do pistão não está com solvente puro. Colocar proporção de água e solvente orgânico, a fim de evitar a precipitação de sal nas <i>check valves</i> . A adequada limpeza dos selos garante a remoção de partículas, cristais de sal e outros resíduos não voláteis que podem danificar o pistão e os selos, além de que a limpeza garante a lubrificação da interface selo/pistão e o resfriamento dos pistões ao longo do uso.
	Ao término da análise, programar limpeza do sistema, para que fique a solução de água/metanol na proporção 1:1.
	Purgar o amostrador do equipamento, seja antes ou depois de uma sequência de amostras. Alguns equipamentos já realizam a purga do amostrador de forma automática após a corrida de uma sequência de amostras.

Quadro 3: Boas Práticas Cromatográficas para manutenção de equipamentos de CLAE.

(conclusão)

Frequência de manutenção	Boas Práticas Cromatográficas recomendadas.
Semanal	Realizar a limpeza do selo do pistão com solução de água e isopropanol (90%:10%)
	Lavar todos os canais com água (2,5 mL a 3 mL) durante 5 minutos para remoção de depósito de sal que tiver formado dentro do equipamento devido a soluções tampões. Em seguida repetir o procedimento com a solução destinada ao canal.
	Inspecionar os filtros de solvente quanto a sujeiras e bloqueios e limpar através de sonicação. Caso nenhum fluxo esteja saindo, recomenda-se a troca do filtro do canal.
	Realizar a limpeza externa dos módulos de HPLC, com tecido não tramado com água purificada, sem a utilização de solventes ou abrasivos químicos.
Longo Prazo em caso de não utilização	Limpar o sistema todo com água para remoção da solução tampão, além de depósitos de sais. Remover todas as amostras do amostrador. Realizar limpeza com solução de água/metanol na proporção 1:1. Para armazenagem e desligue o cromatógrafo da rede elétrica.

Fonte: Adaptado do Guia Boas Práticas para usar em um sistema de LC AGILENT.

6.2.8 A Técnica de *Troubleshooting* como ferramenta de Boa Prática Cromatográfica

A literatura acadêmica e técnica é rasa no que tange a apresentação de forma direta das Boas Práticas Cromatográficas, sendo discutido o tema diversas vezes por Guias de *Troubleshooting*, isto é, guias de resolução de problemas, onde são apresentadas diversas situações indesejáveis do universo da cromatografia com suas resoluções e passos para evitá-los ou eliminá-los. Defende-se a existência de uma literatura que se discuta as Boas Práticas Cromatográficas e posteriormente, nas situações onde houvessem problemas, as soluções para resolvê-los. Pode-se dizer que as capacitações ou treinamentos iniciais a um analista sem experiência transmitam algumas noções de Boas Práticas Cromatográficas, mas isso ainda é incipiente dentro dos desafios e situações vividas dentro de uma rotina de laboratório de controle de qualidade. Para analistas com experiência profissional, é condição *sini qua non*, isto é, sem o qual não pode ser, que o mesmo possua conhecimentos de

resolução de problemas cromatográficos, a fim de não permitir atrasos nos processos de análises, mesmo que ainda ele não saiba como evitar esses problemas.

O caminho traçado atualmente, traz o entendimento que um possível problema só será evitado depois da sua detecção e resolução. A forma de prevenir a situação indesejada só surge depois do dano já ter ocorrido. Inclusive, em alguns casos, problemas relacionados à cromatografia são demorados para serem descobertos, justamente por falta de uma metodologia adequada. (NETO, 2009)

De acordo com NETO (2009, p. 84), a “abordagem de *troubleshooting* em cromatografia tem o objetivo de observar, isolar e corrigir problemas, de maneira direta, simples, racional e eficiente”. Assim, através da elaboração de uma metodologia de prática de *troubleshooting*, é possível a pronta identificação dos problemas, inclusive no momento em que acontecem, a identificação eficiente das causas raízes e a solução ágil para reparar danos, corrigi-los e evitá-los em futuras utilizações.

É importante destacar que a apresentação da técnica de *troubleshooting* para cromatografia não elimina a necessidade da visita de técnicos especializados para correções e ajustes nos equipamentos de HPLC. Nos seus manuais são apresentados procedimentos que podem ser realizados por analistas devidamente treinados e outros que só podem ser realizados pela assistência técnica especializada. É importante o analista compreender em qual o momento ele deve solicitar o auxílio especializado. Realizar *troubleshooting* cromatográfico não é ter acesso ilimitado a manutenção e operacionalização do HPLC (NETO, 2009).

A seguir será listado os passos para um correto *troubleshooting* cromatográfico, adaptado de NETO (2009), inserindo, após os parágrafos, frases simples em negrito resumindo a técnica de *troubleshooting*.

- a) O Analista deve conhecer um pouco da teoria geral de cromatografia, e de forma mais profunda, da técnica de CLAE, incluindo noções relacionadas a diversos equipamentos e o que estiver operando. Existem situações que se aplicam a alguns cromatógrafos, independente do fabricante e outras que serão únicas e exclusivas de determinados HPLC, devido a suas particularidades. **Conhecimento cromatográfico é indispensável**

- b) Para um bom *troubleshooting* cromatográfico, é importante o analista ser observador, cuidadoso e monitorar o equipamento antes, durante e depois de sua análise. **Observação é tudo**
- c) Toda e qualquer alteração precisará ser devidamente documentada nos cadernos ou livros de registros, intitulados *logbook*. Assim evita-se, por exemplo, que uma determinada peça danificada seja reutilizada em outro cromatógrafo ou que um problema que esteja ocorrendo de forma sistematizada nos equipamentos de um setor seja resolvido de forma mais rápida. A abertura de formulários de ocorrência é indispensável para o planejamento da manutenção do laboratório, conforme já citado anteriormente. Manter anotações do histórico dos problemas, assim como das soluções encontradas. **Sem documentação, perde-se a memória das soluções encontradas.**
- d) Todo o problema a ser resolvido, precisa ser abordado de forma linear e lógica. Qualquer alteração deverá ser realizada de forma individual, para que se localize de forma rápida um determinado problema. Exemplo: Se começa a acontecer uma mudança nos tempos de retenção relativo de determinados ativos, ao longo de uma determinada sequência cromatográfica já em análise, a investigação que será realizada verificará se o problema está ocorrendo devido a alguma contaminação ou deterioração da fase móvel, se for método com gradiente, se o equipamento está realizando a mudanças ou mistura dos solventes nos tempos adequados, se o fluxo de passagem está de acordo com o acertado no método cromatográfico: se foi erro no preparo da amostra ou se a coluna está deteriorada ou perdeu eficiência. Se o analista realiza a mudança de duas variáveis para o problema proposto, com a justificativa que está com o tempo apertado para a análise, como um novo preparo de fase móvel e a mudança de equipamento cromatográfico e os tempos de retenção relativo voltam as condições anteriores a mudança, qual terá sido a causa raiz do problema? A fase móvel que sofreu alguma deterioração ou o equipamento que estava com alguma avaria? A realização dos testes individuais é o caminho para

se isolar um problema, reconhecendo de forma rápida. **Mude as variáveis do problema uma de cada vez.**

- e) Caso tenha a suspeita de ter identificado o problema, teste novamente as variáveis para verificar se realmente a causa raiz foi identificada. Na situação relatada no parágrafo anterior, percebe-se que ao longo da sequência o tempo de retenção relativo voltou a ficar fora do especificado. Nota-se que a fase móvel está isolada e sem contato com o ambiente externo. Trocará novamente de equipamento? **É preciso ter a certeza da identificação do problema antes de partir para resolução.**
- f) A troca de peças, consumíveis ou partes que estejam sob dúvidas por outras novas ou que sabidamente sejam identificadas como boas, garantirá que a causa raiz foi corretamente identificada. No exemplo anterior, o analista identifica que houve um pequeno vazamento de recheio da coluna, já no novo equipamento, que está com seu filtro interno possivelmente dilatado. Realiza a troca imediata da coluna cromatográfica, assim como parte das tubulações, a fim de evitar o carreamento do recheio da coluna cromatográfica para dentro do equipamento. Ele mantém a sequência de análises e percebe que não houve mais alterações do tempo relativo dos ativos pesquisados. E no equipamento usado anteriormente, ao mudar a tubulação e as peças que ficaram entupidas por conta do deslocamento do recheio, percebeu-se a volta permanente dos tempos de retenção relativo. O problema foi identificado, era perda de recheio da coluna cromatográfica, que estava acarretando em entupimentos nos equipamentos e a consequente mudança dos parâmetros cromatográficos. **Troca-se sempre o que está em dúvida por algo que você tenha certeza que está bom.**
- g) A compilação dos relatórios de mudanças no equipamento deve ser divulgada para todos os que usam os cromatógrafos no laboratório. A criação de um formulário que facilite o registro do sintoma do problema, sua origem e posterior solução, traz um ganho de tempo, em caso de repetição da situação problema para outro analista. Em determinados ensaios, por particularidades das metodologias e dos ativos sob análise,

alguns problemas são recorrentes. **A divulgação do histórico de *troubleshooting* denota que o corpo técnico possui a capacidade para resolução de problemas.**

- h) A prevenção de certas falhas e o planejamento da adequada manutenção é indispensável para o adequado *troubleshooting*. **Planejar a manutenção é encontrar, preferencialmente, o problema antes que ele apareça.**

6.4 Boas Práticas Cromatográficas nos processos de geração, integridade e rastreabilidade dos dados gerados.

A indústria farmacêutica tem convivido com o implemento da tecnologia de informação em seus diversos setores, objetivando o aumento de produtividade, rentabilidade e a alta qualidade dos seus produtos, atendendo assim seus acionistas, consumidores e a sociedade através dos órgãos reguladores.

Os órgãos reguladores da indústria farmacêutica nacional ou internacional tais como a ANVISA, a OMS e o FDA, tem exigido do setor a manutenção da integridade de dados críticos que são relacionados a toda a cadeia de produção até a comercialização dos produtos. Possuir dados íntegros é indispensável para se evitar não conformidades que podem ocasionar diversas sanções técnicas ou administrativas para a empresa.

A organização mundial da saúde no anexo 1, intitulado “Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos”, publicado em 2010, apresenta seus requisitos em relação a geração, guarda e análises dos dados obtidos por equipamentos com processamento de dado, o que naturalmente engloba os sistemas cromatográficos. Todo o sistema cromatográfico utilizado hoje, é composto de um equipamento modular, onde a técnica da cromatografia é aplicada. Aliado a este equipamento, temos a presença de um computador, que tem a função de gerenciar esse *hardware*, com programas específicos para este fim, que permitem além do controle do equipamento, a geração de dados, interpretação e arquivamento deles. Desde modo, a integridade desses dados é indispensável para que um sistema de garantia de qualidade, aplicado à indústria farmacêutica, garanta que o

medicamento possua a qualidade requerida pelos órgãos regulatórios. Veja a seguir como, pelos requisitos da OMS, a integridade desses dados é relevante:

5.2. Para computadores, equipamentos de ensaio automatizados ou de calibração, e para a coleta, processamento, registro, relatório, armazenamento ou recuperação de dados de ensaio e/ou calibração, o laboratório deve assegurar que:

(a) o programa computacional desenvolvido pelo usuário esteja documentado com detalhamento suficiente e apropriadamente validado ou verificado, de acordo com o uso;

b) Procedimentos para proteger a **integridade dos dados** estejam estabelecidos e implementados. Tais procedimentos devem incluir, mas não estar limitados a medidas para assegurar a integridade e confidencialidade das informações sobre recebimento ou coleta, armazenamento, transmissão e processamento dos dados. Em particular, os dados eletrônicos devem ser protegidos contra o acesso não autorizado e deve manter-se a rastreabilidade de todas as alterações;

c) os computadores e equipamentos automatizados sejam mantidos funcionando apropriadamente e estejam providos com as condições operacionais e ambientais necessárias para assegurar a **integridade dos dados** de ensaio e calibração;

(d) os procedimentos para realizar, documentar e controlar as mudanças na informação contida em sistemas computadorizados estejam estabelecidos e implementados; e

(e) os dados eletrônicos devem ser copiados em intervalos regulares e apropriados de acordo com um procedimento documentado. Os dados copiados devem ser recuperados e armazenados de maneira a evitar perda de dados. **Grifo nosso** (OMS, 2010).

O FDA no seu Guia "*Data Integrity and Compliance With CGMP Guidance for Industry*", de dezembro de 2018, traz a definição, criticidade e operacionalização de integridade de dados.

"Para efeitos da presente orientação, a integridade dos dados refere-se à integralidade, consistência e precisão dos dados. Dados completos, consistentes e precisos devem ser atribuíveis, legíveis, contemporaneamente registrados, originais ou cópias fiéis, e acurados. (ALCOA)".

A integridade dos dados é crítica em todo o ciclo de vida dos dados das atuais boas práticas de fabricação (CGMP), incluindo na criação, modificação, processamento, manutenção, arquivamento, recuperação, transmissão e disposição de dados após o término do período de retenção do registro.

O design e os controles do sistema devem facilitar detecção de erros, omissões e resultados aberrantes ao longo do ciclo de vida dos dados. (FDA, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018)

Os dados relacionados a um sistema de processamento de dados são classificados em 3 tipos:

- *Raw Data*: São os dados puros, não tratados, isto é, são os registros originais, papel ou eletrônico, no qual eles foram inicialmente gerados. Esses dados são gravados por sistemas inteligentes e são os pilares para interpretação das informações.
- Dado Principal: É o dado definitivo que apresenta o resultado final de um processo.
- Metadados: São dados que repassam informações que justificam o dado principal, repassando informações sobre os dados brutos, como por exemplo a sua data de criação, sua trilha de auditoria, data de análise ou interpretação, usuário operador, entre outros, que trarão informações do período e contexto na qual foram gerados (CALIXTO e JACOB, 2017).

Assim, todo e qualquer procedimento que norteie a integridade de dados dos HPLCs pode ser interpretado como uma boa prática cromatográfica, já que as etapas da produção, interpretação, retenção, guarda/recuperação e destruição de dados representa uma alta criticidade para o setor de controle de qualidade, sendo alvo constante de não-conformidades pelas agências reguladoras (ROCHA e QUINTÃO, 2018).

Conforme visto na definição de integridade de dados pelo FDA, o conceito ALCOA é fundamental para o sucesso dessa operação, visto que os dados precisam ter 5 atributos para serem considerados íntegros, apresentados na figura 14:

Figura 14: Critérios de um dado íntegro – Conceito ALCOA



Fonte: ROCHA e QUINTÃO (2018)

Destaca-se que o FDA ampliou o conceito de ALCOA, criando o ALCOA+, onde além dos atributos acima, os dados precisam ser completos, consistentes, duradouros e disponíveis, aumentando a criticidade dessa etapa.

6.4.1 Integridade de dados: uma Boa Prática Cromatográfica.

São diversas as práticas que podem ser implementadas para garantir a integridade dos dados oriundos dos sistemas cromatográficos, corroborando para que se atinja a plenitude do conceito ALCOA dentro do laboratório de controle de qualidade. Elas estarão presentes nas seguintes etapas: criação e geração de dados; manutenção dos dados eletrônicos, controle de acesso e validação dos sistemas computadorizados.

No que tange a criação e geração de dados, destaca-se como boas práticas, o mapeamento dos tipos de dados eletrônicos que serão elaborados e como eles se relacionarão com os processos de qualidade da empresa, avaliando assim seu impacto e criticidade em relação a qualidade do produto. O procedimento a ser escrito, deverá contemplar as definições clássicas de integridade de dados, trazendo exemplos práticos para facilitar o entendimento de todos aqueles envolvidos no processo. A rastreabilidade na criação de dados é ponto crítico, já que os dados brutos é que permitirão, através de sua interpretação, o resultado pretendido. Assim, esses dados não poderão ser perdidos, impedindo seu acesso. Recomenda-se a utilização de formatos não editáveis e indeletáveis, já no momento de sua geração (CALIXTO e JACOB, 2017).

Em relação a manutenção dos dados eletrônicos, destaca-se que o registro dos dados precisa ser realizado de forma correta, segura e completa, para que em ocasiões futuras eles possam ser interpretáveis. Essa etapa se relaciona com a guarda dos dados, onde o procedimento a ser elaborado, deverá mensurar, ou ainda, apresentar as ferramentas para este fim, a criticidade e o risco do local de guarda dos backups, assim como os tipos de dados que sofrerão backup, em que tipo de mídia acontecerá a gravação, a periodicidade do processo de backup, o local de armazenagem desses dados e o período de guarda, além de procedimentos para facilitar a restauração desses dados (CALIXTO e JACOB, 2017).

A avaliação da evolução tecnológica também deverá se fazer presente, para que um avanço tecnológico não impeça a leitura ou busca de um determinado dado.

Assim, a migração de dados ou sistema, em caso de mudança tecnológica, não poderá ser desconsiderada como item crítico a integridade desses dados. Em alguns casos de atualizações de *softwares*, é comum a possibilidade de leitura e interpretação em relação aos dados antigos, garantindo a rastreabilidade. De todo modo, a realização de uma análise de risco em relação a mudança é fundamental para garantir que os dados gerados não percam sua integridade, garantindo pelo menos a sua leitura e consulta numa possibilidade futura (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

As trilhas de auditoria, conhecidas como “*Audit Trail*”, precisam ser mantidas íntegras, já que elas servirão de provas de como esse dado foi gerado, editado ou até apagado dentro da vivência do setor. Esses dados podem trazer evidências de desvios, controle de mudanças e até necessidade de manutenções no equipamento, servindo como ferramenta na busca de erros e não conformidades em relação ao escopo da garantia e controle da qualidade e dos requisitos dos órgãos reguladores. Deste modo, o procedimento de integridade de dados deverá ter informações que mostrem e sinalizem a preocupação na revisão dessas trilhas de dados, garantindo a conferência de todas as ações que foram realizadas. Aliado a isso, em caso de não conformidade, os procedimentos devem garantir ações para mitigação daqueles erros relatados (CALIXTO e JACOB, 2017).

Acrescenta-se a isso a supervisão também dos “*Audit Log*”, que são as trilhas referentes as informações de entrada e saída de usuário no sistema. Esses deverão ter o mesmo nível de acompanhamento dos “*audit trail*”, a fim de evitar a entrada incorreta de usuários no sistema (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

O Controle de acesso também se constitui com uma boa prática para a integridade dos dados, já que somente pessoas devidamente autorizadas e treinadas tenham, de fato, acesso aos *softwares* ou sistemas que manuseiam os dados dos cromatógrafos. A elaboração de um procedimento que contemple os níveis de permissão/ação dentro do *software*/sistema é indispensável para garantir que somente determinadas pessoas possam executar determinadas ações, impedindo ações que gerem danos aos dados dos *softwares*, evitando fraudes ou ataques ao sistema (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

A criação de um perfil administrador com nível de permissão maior também se faz necessário, para que haja uma supervisão do sistema, porém o mesmo deverá ser

restrito a algumas pessoas, que não possuam conflito de interesse na manipulação de certas informações. Geralmente são dois níveis de acesso: Os funcionários que poderão gerar, revisar e aprovar os dados oriundos dos sistemas cromatográficos e outro nível que são os funcionários que poderão realizar a exclusão, alteração ou modificar configurações do *software* (CALIXTO e JACOB, 2017).

Interessante destacar que 95% das não conformidades de integridade de dados registradas pelos órgãos reguladores são oriundas de más práticas de gerenciamento de dados, reforçando a necessidade de empenho neste setor (ECA ACADEMY, 2013).

O sistema poderá contemplar também a utilização de assinatura eletrônica, que possui a mesma representatividade da assinatura física, que indicará que um determinado ensaio foi verificado, revisado ou até mesmo aprovado. Em alguns casos, poderá ser adotado um sistema biométrico, que trará a segurança de que determinada ação foi tomada por determinado usuário, porém nem todos os softwares possuem essa capacidade de identificação do usuário, podendo ainda ser utilizado um sistema de login e senha, de uso pessoal e intransferível (CALIXTO e JACOB, 2017).

Por fim, é fundamental que o sistema a ser utilizado seja validado, através da revisão e verificação de informações e ações que o sistema seja capaz de executar. Ações como geração de dados, conexão com o sistema, interpretação de dados, exclusão de dados por pessoas não autorizadas, enfim, todos os itens críticos relacionados ao manuseio do sistema deverão ser verificados a fim de garantir a integridade do *software*. A empresa submetida a essas normas, precisa trazer a compreensão de que a integridade de dados traz segurança aos seus produtos, impactando de forma significativa seus pacientes (AGILENT TECHNOLOGIES, 2017).

7 CONCLUSÃO

As Boas Práticas Cromatográficas se apresentam como ferramentas indispensáveis nos laboratórios de controle de qualidade farmacêutica, e formam, segundo nossa defesa, os alicerces técnicos para a sustentabilidade e segurança na aplicação das técnicas de cromatografia.

É inegável que existem diferenças técnicas relacionadas a equipamentos, consumíveis e *softwares*, portanto, é necessário que as Boas Práticas Cromatográficas sigam preceitos harmonizados, através da definição de conceitos gerais com o intuito de normalizar o conhecimento comum.

Recomenda-se a realização de mais pesquisas, que promovam cruzamentos de informações dos diversos fabricantes, além do desenvolvimento de novas técnicas, que aliados a testes práticos, possam averiguar e mensurar financeiramente e tecnicamente, de forma inequívoca, o benefício da aplicabilidade das Boas Práticas Cromatográficas para indústria farmacêutica.

Como visto no presente trabalho, com as técnicas já apresentadas, é possível aferir que os resultados obtidos tenderão a ser mais confiáveis, robustos, íntegros e seguros, pois serão oriundos de sistemas cromatográficos que atingirão uma maximização de seu desempenho, atendendo aos requisitos dos órgãos reguladores, além de proporcionar possivelmente uma redução dos custos para a indústria farmacêutica.

Defende-se, portanto, que essa abordagem das Boas Práticas Cromatográficas seja realidade dentro dos laboratórios de controle de qualidade farmacêutico, onde a cultura da prevenção acaba não sendo, em alguns casos, mais interessante que a cultura da correção ou reparo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M. H. 100 years of chromatography—or is it 171? **Journal of Chromatography A**, n. 1061, p. 113-114, 2004.

ACADEMIA REAL DAS CIÊNCIAS DA SUÉCIA. Nobel Prizes. **Kungl Vetenskaps Akademien**, 2018. Disponível em: <<https://www.kva.se/en/priser/nobelprisen/pristagare>>. Acesso em: 26 Maio 2018.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Sample Preparation Fundamentals for chromatography**. [S.l.]: Agilent Technologies, 2013. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2019.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Column User Guide for agilent reversed-phase columns**. [S.l.]: Agilent Technologies, 2014.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Boas práticas para usar um sistema de LC Agilent**. [S.l.]: [s.n.], 2016. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/BestPractice_pt-BR.pdf>. Acesso em: 04 de Dezembro de 2018.

AGILENT TECHNOLOGIES. **Compliance para laboratórios de controle de qualidade farmacêutico - informações sobre cartas de advertência do FDA**. [S.l.]: Agilent Technologies, 2017. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-5456PTBR.pdf>>. Acesso em: 04 de Dezembro de 2018.

AHUJA, S.; DONG, M. W. **Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC**. [S.l.]: Elsevier Academic Press, v. 6, 2005.

AIJIREN AUTOSAMPLER VIAL. **Filtros de Seringa HPLC**. Aire, 2017. Disponível em: <<http://www.aijirenvial.pt/products/hplc-syringe-filter/14.html>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2019

ANALÍTICA. Análitca. **Vials para cromatografia 2mL**, 2017. Disponível em: <https://www.analiticaweb.com.br/produtos_detalhe.php?tit=vial-para-cromatografia-2-ml-snap-cap-crimp-rosca&Bid=p46f01655483af>. Acesso em: 14 Janeiro 2019.

ANDRADE, L. **CICLO PDCA: COMO ELE PODE MELHORAR SEUS PROCESSOS?** SiteWare, 2018. Disponível em: <<https://www.siteware.com.br/metodologias/ciclo-pdca/>>. Acesso em: 31 Dezembro 2018.

ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª Edição. ed. Brasília: [s.n.], 2010.

ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 17 - 16 de Abril de 2010**. Brasília: [s.n.], 2010.

ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Ministério da Saúde - MS. Brasília. 2017.

BAUMAM, W. C.; SKIDMORE, J. R.; OSMUM, R. H. **Dowex 50 - A New High capacity cation exchange Resin**. Symposium on purification and conditiong of water supplies, p. 1350 - 1358, Agosto 1948.

BEREZKIN, V. G. **Biography of Mikhail Semenovich Tswett and Translation of Tswett's Preliminary Communication on a New Category of Adsorption Phenomena**. Chemical Reviews, v. 89, p. 279-285, 1989.

BRASIL, C. (. **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília: Centro Gráfico, 1988. 292 p.

BRASIL, L. O. D. S. **Lei Orgânica da Saúde. nº 8080 de 19 de Setembro de 1990**. Brasília: [s.n.], 1990.

CALIXTO, J.; JACOB, M. **Integridade de Dados: Guia Sindusfarma para a Indústria Farmacêutica**. 1ª. ed. São Paulo: SINDUSFARMA, v. 28, 2017. Disponível em: <http://www.farmaceuticas.com.br/wp-content/uploads/2017/10/SINDUSFARMA_Manual_Integridade_de_Dados-1.pdf>. Acesso em: 09 Janeiro 2019.

CASE ANALÍTICA - ASSISTÊNCIA TÉCNICA. **Manutenção preventiva e qualificação de desempenho de Cromatógrafo Líquido - HPLC**. Case Analítica, 2016. Disponível em:

<http://caseanalitica.com.br/manutencao_preventiva_em_cromatografo_liquido.php>
. Acesso em: 04 Dezembro 2018.

COSTA, G. M. **Sugerencias para el uso de equipos de CLAE**. Universidad Nacional de Colombia, Fevereiro 2010. Disponível em: <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/user_27/file/Cuidados%20con%20el%20HPLC.pdf>. Acesso em: 2018 Dezembro 04.

DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES. **Compatibilidade de Solventes e Reagentes com sistemas HPLC**. Blog da DC Tech Laboratory Technologies, 2017. Disponível em: <<https://www.dctech.com.br/compatibilidade-de-solventes-e-reagentes-com-sistemas-hplc/>>. Acesso em: 04 Dezembro 2018.

DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES. **O Guia Definitivo de solução de problemas em HPLC**. [S.l.]: [s.n.], 2017.

ECA ACADEMY. ECA Academy. **ECA Analytical Quality Control Working Group - Final OOS SOP**, 2013. Disponível em: <<https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/eca-analytical-quality-control-working-group-final-oos-sop>>. Acesso em: 16 Dezembro 2018.

ELDER, P. T. Biblioteca Online Perseus. **The Natural History**, 77-79. Disponível em: <<http://www.perseus.tufts.edu/hopper/>>. Acesso em: 18 de Maio de 2018.

ENGELHARDT, H. One century of liquid chromatography From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations. **Journal of Chromatography B**, 2004. 3-6.

FARMANGUINHOS. **Procedimento Operacional Padrão - POP 132 - Registro de uso de coluna para cromatografia líquida de alta eficiência**. 06. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], v. Anexo B1, 2018.

FDA, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Data Integrity and Compliance With Drug CGMP Questions and Answers Guidance for Industry**. FDA, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. [S.l.]. 2018.

INMETRO. **Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL - Norma nº NIT-DICLA-035**. [S.l.]: [s.n.], 2011.

JUNIOR, C. **Ciclo PDCA: uma ferramenta imprescindível ao gerente de projetos!** Project Builder, 2017. Disponível em: <<https://www.projectbuilder.com.br/blog/ciclo-pdca-uma-ferramenta-imprescindivel-ao-gerente-de-projetos/>>. Acesso em: 31 Dezembro 2018.

KREPICH, S. **Reversed-Phase HPLC Column Cleaning and Regeneration**. Phenomenex. [S.l.], p. 1-2. 2009.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. **The Fruits of Collaboration: Chromatography, Amino Acid Analyzers, and the Chemical Structure of Ribonuclease by William H. Stein and Stanford Moore**. The Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 9, p. 6-7, 2005.

LABVISION INSTRUMENTS. **Qualificação e Calibração**. LabVision Instruments, 2017. Disponível em: <<https://www.labvisioninstruments.com/qualificacao-e-calibracao>>. Acesso em: 04 Dezembro 2018.

LIRA, O. B. N. D. **Qualidade de vida no trabalho: Estudo de caso na base operacional da cifarma**. Goiania: [s.n.], 2009.

LOPES, R. D.; HARRINGTON, R. A. **Compreendendo a pesquisa clínica**. 1ª. ed. São Paulo: AMGH, 2014.

MAJORS, R. E. **Current Trends in HPLC Column Usage**. LCGC North America, v. 25, n. 6, p. 532-544, Junho 2007. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/current-trends-hplc-column-usage-2?id=&pageID=1&sk=&date=>>>. Acesso em: 13 de Janeiro de 2019.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reserva**. Química Nova, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MEIO FILTRANTE. **Preparação de amostras para análises cromatográficas**. Revista e Portal Meio Filtrante, São Paulo, n. 7ª, Novembro / Dezembro 2003. Disponível em:

<<http://www.meiofiltrante.com.br/edicoes.asp?link=ultima&fase=C&id=80>>. Acesso em: 06 de Janeiro de 2018.

MIRANDA, A. C.; SANTANA, J. C. C. **Aplicação da ferramenta PDCA na otimização de equipamentos de análises instrumentais (HPLC/UPLC) na rotina de análises físico-químicas em uma indústria farmacêutica.** *Exacta - EP*, São Paulo, 16, n. 1, 2018. 1-6. Disponível em: <<https://doi.org/10.5585/exactaep.v16n1.6587> >. Acesso em: 25 de Dezembro de 2018.

MOORE, S.; STEIN, W. H. **Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins.** *Journal of biological chemistry*, n. 192, p. 663-681, 1951.

NETO, Á. J. D. S. **Uma visão técnica para a compreensão e resolução de problemas em sistema de cromatografia líquida.** *Scientia Chromatographica*, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 83-96, 2009. Disponível em: <<http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a7.pdf>>. Acesso em: 10 de Outubro de 2018.

NOGUEIRA, N. M. et al. **Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada.** *Revista Brasileira de Farmácia*, n. 92, p. 44-50, Fevereiro 2011.

OMS. **Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos**, 2010. Disponível em: <https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/documents/TRS957_annex1_PORTUGUESE.pdf>. Acesso em: 04 de Dezembro de 2018.

PACHECO, S. et al. **História da Cromatografia Líquida.** *Revista Virtual de Química*, v. 7^o, p. 1225-1271, Julho-Agosto 2015.

PALADINI, E. P.; CARVALHO, M. M. D. **Gestão da Qualidade - Teoria e Casos.** 3^a Edição. ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 2006.

ROCHA, D.; QUINTÃO, F. Five Consultoria. **Data Integrity na Indústria Farmacêutica**, 2018. Disponível em: <<https://fiveconsultoria.com/a-integridade-dados-na-industria-farmaceutica/>>. Acesso em: 15 Janeiro 2019.

ROZENFELD, (. S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. 301 p.

SETA, M. H. D.; PEPE, V. L. E.; OLIVEIRA, G. O. D. **Gestão e Vigilância Sanitária, modos atuais do pensar e fazer**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2006.

SIGMA-ALDRICH. **Bulletin 826E - HPLC Troubleshooting Guide**. Bellefonte: [s.n.], 2008. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/4497.pdf>>. Acesso em: 01 de Fevereiro de 2019.

SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H.; MORE, S. **Automatic Recording Apparatus for use in the chromatography of amino acids**. Analytical Chemistry, v. 30, n. 7, p. 1190-1206, Julho 1958.

SUPELCO-ALDRICH INC. Bulletin 781E. **How to Protect Your HPLC Column and Prolong Its Life**, 2008. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/4487.pdf>>. Acesso em: 21 de Agosto de 2018.

THERMO SCIENTIFIC. **A Troubleshooting Guide - Successful HPLC Operation**. [S.l.]: [s.n.], 2016. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Product-Guides/TG-20421-HPLC-Troubleshooting-Guide-TG20421-EN.pdf>>. Acesso em: 05 de Agosto de 2018.

VALÊCIO, M. D. **COMO ESCOLHER UM HPLC PARA O CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**. Instituto de Ciência, tecnologia e qualidade, Janeiro 2018. Disponível em: <<http://www.ictq.com.br/industria-farmaceutica/641-como-escolher-um-hplc-para-o-controle-de-qualidade-na-industria-farmaceutica>>. Acesso em: 27 de Maio de 2018.

VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. **A regulação de medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: ArtMed, 2013.

WATERS CORPORATION. **HPLC Troubleshooting Guide**. [S.l.]: [s.n.], 2002. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1528445&locale=pt_BR>. Acesso em: 25 de Maio de 2018.