

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS
E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Antenor Alves de Magalhães

**ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO PARA A AVALIAÇÃO
DA PERFORMANCE DE CROMATÓGRAFOS A LÍQUIDO COM DETECTOR
DE UV-VIS**

Rio de Janeiro

2013

Antenor Alves de Magalhães

ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO PARA A AVALIAÇÃO
DA PERFORMANCE DE CROMATÓGRAFOS A LÍQUIDO COM
DETECTOR DE UV-VIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientadores: André Luiz Mazzei Albert

José Luiz Neves de Aguiar

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Magalhães, Antenor Alves de

Elaboração de procedimento para a avaliação da performance de cromatógrafos a líquido com detector de UV-Vis / Antenor Alves de Magalhães. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

80 f., il., tab.

Monografia (Especialização) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadores: André Luiz Mazzei Albert e José Luiz Neves de Aguiar

1.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. 2.Medicamentos. I.título

Antenor Alves de Magalhães

**ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO PARA A AVALIAÇÃO
DA PERFORMANCE DE CROMATÓGRAFOS A LÍQUIDO COM DETECTOR
DE UV-VIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Michele Feitoza Silva (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

Thiago Santana Novotny (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

André Sartori (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

André Luiz Mazzei Albert (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

José Luiz Neves de Aguiar (Mestre) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

*Dedico este singelo Trabalho aos
meus filhos: Bruno e Leticia Magalhães.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PAI pela oportunidade de poder estar “aqui” neste momento.

À minha mãe Ieda (*in memoriam*), por ter me dado esta vida; pela dedicação à família e pelo amor incondicional demonstrado ao longo destes 52 anos.

À minha esposa e companheira Clélia, pela compreensão e apoio diário e principalmente pelos meus filhos.

Ao meu orientador José Luiz, que gentilmente me “empurrou ladeira abaixo” para este desafio.

Aos meus superiores, por terem aceitado e endossado esta minha empreitada.

Aos meus colegas do Setor de Medicamentos, que diariamente me ouvem e ainda pacientemente permitem que eu divida com eles as minhas emoções, dúvidas, vitórias e decepções.

A todos os demais colegas do INCQS, inclusive aqueles que por alguma razão ou motivo deixaram de continuar aqui conosco, pelos momentos de convívio juntos que tivemos.

Aos “Amigos de Fé”, pela força; pelas palavras sempre amigas; pelo ombro amigo na hora que necessitei chorar e pelo sorriso quando venci; pelo empréstimo daquela “grana”; pelo reparo daquelas peças em inox; por terem desvirado o barco juntamente comigo e terem feito a maior parte da força; e principalmente, pela amizade franca.

Aos Deuses dos ventos e dos mares, Éolo e Poseidon, por me acompanharem nas minhas velejadas e me indicarem sempre os caminhos mais corretos, dentro e fora dos mares.

*“Sejam quais forem os resultados,
com êxito ou não,
o importante é que no final
cada um possa dizer:
-FIZ O QUE PUDE!”*

Louis Pasteur

RESUMO

O Setor de Medicamentos do DQ/INCQS trabalha em estreito relacionamento com a ANVISA e outras instituições de VS, realizando ensaios de perícia, participando de programas oficiais de controle da qualidade de medicamentos, estudos interlaboratoriais, desenvolvimento de novas metodologias e formação de recursos humanos na sua área de atuação. Para alcançar resultados analíticos confiáveis, este Setor faz uso da “química moderna”, onde são utilizados equipamentos diversos, capazes de alcançar resultados mais precisos e detectar quantidades mínimas do fármaco ou seus contaminantes. Dentre estes equipamentos destaca-se o cromatógrafo a líquido, utilizado na técnica de CLAE, pela sua versatilidade e quantidade de monografias que preconizam a sua utilização. Para que os resultados finais obtidos por CLAE possam ser fidedignos, devem-se tomar algumas medidas referentes à qualidade do ensaio. A RDC 11/2012 da ANVISA, por exemplo, dispõe sobre todas essas medidas que devem ser cumpridas pelos laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos à vigilância sanitária. Assim, padrões do fármaco devem ser certificados, o analista capacitado, vidrarias e equipamentos calibrados periodicamente, condições ambientais controladas e todos os cálculos verificados. Desta forma, todos os cromatógrafos a líquido são qualificados anualmente e verificações da qualificação são realizadas a cada quatro meses, seguindo o POP específico. Diversos compêndios oficiais descrevem quais parâmetros cromatográficos devem ser monitorados nessas qualificações e seus respectivos limites. Esses compêndios relatam, ainda, que todo equipamento deve ser submetido a avaliações da sua performance periodicamente. Visando atender a este item, durante o período de nove meses, dois cromatógrafos a líquido utilizados em CLAE/UV-Vis foram verificados mensalmente utilizando-se uma mistura contendo as substâncias metronidazol e antraceno. Volumes de 5, 10 e 20 μL foram injetados em quintuplicata e os valores obtidos para cada um dos parâmetros de adequação do sistema (resolução, fator de cauda, eficiência, fator de retenção e DPR% entre as áreas) foram estudados com o objetivo de se elaborar uma carta controle para cada equipamento; avaliar a correlação estatística entre o uso de cada equipamento e o intervalo de tempo necessário para realização das manutenções preventivas. O estudo demonstrou ser viável a confecção das cartas controle. Após tratamento estatístico, os dados originaram cartas para os parâmetros retenção,

assimetria e área do antraceno. Os parâmetros eficiência e resolução foram avaliados quanto à possibilidade de se gerar cartas visando o controle do desgaste de cada equipamento e a previsão de manutenções preventivas, entretanto os resultados para este fim foram inconclusivos, necessitando de um maior número de verificações. As respostas (áreas) obtidas para cada volume injetado em cada equipamento demonstraram repetibilidade ao longo do estudo e podem auxiliar no cálculo da incerteza de cada cromatógrafo, auxiliando no cálculo da incerteza de medição de ensaios realizados por CLAE.

Palavras-chave: Antraceno. CLAE. Cromatografia a Líquido. Qualificação operacional. Qualificação de performance. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The Division of Drugs DQ / INCQS works in close relationship with ANVISA and other institutions of Health Surveillance (HS), performing forensic tests by attending the official control of the quality of medicines, interlaboratorial studies, development of new methodologies and staff training in their area of expertise. To achieve reliable analytical results, this sector makes use of the "modern chemistry", resources where several equipment are used, able to achieve more accurate results and detect minute amounts of the drug or its contaminant. Among these devices stands the liquid chromatograph used in the HPLC technique, for its versatility and quantity of papers advocating their use. Aiming that the final results obtained by HPLC be trustable, some measures must be taken regarding the quality of the test. The RDC-ANVISA 11/2012 provides all these measures that must be met by the analytical laboratories that perform analyzes on products subject to Health Surveillance. Thus, drug standards must be certified, analyst trained, glassware and equipment periodically calibrated, environmental conditions controlled and all calculations checked. Thus, all liquid chromatographs are qualified annually and qualification checks are conducted every four months, following the specific standard operational procedure (SOP). Several official compendia describe which chromatographic parameters should be monitored in these qualifications and their respective limits. These compendia reported further that all equipment must be subjected to evaluation of their performance periodically. In order to satisfy this item during a nine month period, two liquid chromatographs used in HPLC / UV-Vis were checked monthly using a mixture of substances metronidazole and anthracene. Volumes of 5, 10 and 20 μL were injected in quintuplicate and the values obtained for each of the system suitability parameters (resolution, tailing factor, efficiency, retention and DPR between areas) were studied in order to develop a control chart for each device; establishes a statistical correlation between the use of each device and the time interval required for preventive maintenance. The study proved feasible the plot of the control charts. After statistical analysis, the data originated charts to the parameters retention, asymmetry and area of anthracene. The parameters efficiency and resolution were evaluated for their ability to generate control charts aiming at the equipment wear and preventative maintenance forecasting, but the results were inconclusive for this purpose, requiring a large number of scans. Data obtained for each volume injected

into each equipment shown repeatability throughout the study and can support the calculation of the uncertainty of each chromatograph, assisting in calculating the expanded uncertainty of tests performed by HPLC.

Keywords: Anthracene. Health Surveillance. HPLC. Liquid chromatography. Operacional qualification. Performance qualification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Evolução da Vigilância Sanitária no Brasil entre 1808-2008.....	21
Figura 02. Tipos de cromatografia	25
Figura 03. Cromatógrafo moderno	26
Figura 04. Cromatograma típico obtido com CLAE.....	27
Figura 05. Cromatograma de duas substâncias	28
Figura 06. Cromatógrafo a líquido “CL3”	34
Figura 07. Cromatógrafo a líquido “CL7”	35
Figura 08. Cromatograma obtido no CL7 com detector UV-Vis; solvente: a fase móvel; condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 µm, 150 mm x 3,9 mm d.i); FM: ACN grau CLAE 60:40 água; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 µL, detecção a 254nm.....	38
Figura 09. Cromatograma obtido no CL3 com detector UV-Vis (DAD), solvente: a fase móvel; condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 µm, 150 mm x 3,9 mm d.i); FM: ACN grau CLAE 60:40 água; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 µL, detecção a 254nm	38
Figura 10. Cromatograma da solução “mix”, obtido no CL7 com detector UV-Vis, solvente acetonitrila. Condições cromatograficas: coluna Nova-Pak C8 (4 µm, 150 mm x 3,9 mm); FM: água 45:55 ACN grau CLAE; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 µL, detecção a 251nm	42
Figura 11. Cromatograma da solução “mix”, obtido no CL3 com detector UV-Vis (DAD), solvente acetonitrila. Condições cromatograficas: coluna Nova-Pak C8 (4 µm, 150 mm x 3,9 mm); FM: água 45:55 ACN grau CLAE; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 µL, detecção a 251nm.....	42
Figura 12. Avaliações mensais (março a novembro) versus retenção obtida no CL7, considerando-se o valor máximo (5,18) e mínimo (4,86) mensais	45
Figura 13. Avaliações mensais (março a novembro) versus retenção obtida no CL3, considerando-se o valor máximo (8,96) e mínimo (7,93)	45
Figura 14. Injeções acumuladas (março a novembro) versus K do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (5,04), o LSC (5,15) e o LIC (4,92)	46

Figura 15. Injeções acumuladas (março a novembro) versus K do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (8,28), o LSC (8,73) e o LIC (7,84).....	47
Figura 16. Avaliações mensais (março a novembro) e o FC do antraceno obtidas no CL7. Considerando o máximo (1,18) e o mínimo (1,04).....	50
Figura 17. Avaliações mensais (março a novembro) e o FC do antraceno obtidas no CL3. Considerando o valor máximo (1,22) e o mínimo (1,05).....	50
Figura 18. Injeções acumuladas (março a novembro) versus FC do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (1,15), o LSC (1,18) e o LIC (1,12).....	51
Figura 19. Injeções acumuladas (março a novembro) versus FC do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (1,11), o LSC (1,17) e o LIC (1,06).....	51
Figura 20. Relação entre as avaliações mensais (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL7.	54
Figura 21. Relação entre as avaliações mensais (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL7	54
Figura 22. Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (40,428), o LSC (40,765) e o LIC (40,091)	55
Figura 23. Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (2175482), o LSC (2201847) e o LIC (2149118)	55
Figura 24. Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de N (número de pratos teóricos) para o antraceno, obtidos no CL7	59
Figura 25. Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de N (número de pratos teóricos) para o antraceno, obtidos no CL3.....	59
Figura 26. Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e N do antraceno obtidos no CL7	60
Figura 27. Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e N do antraceno obtidos no CL3	61
Figura 28. Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de R do antraceno obtidos no CL7	64
Figura 29. Relação entre avaliações (março a novembro) e os valores de R do antraceno obtidos no CL3	64

Figura 30_ Relação entre injeções acumuladas (março a novembro) e R do antraceno obtidos no CL7	65
Figura 31. Relação entre injeções acumuladas (março a novembro) e R do antraceno obtidos no CL3	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Valores dos parâmetros de adequação do sistema obtidos nas verificações da coluna utilizada no CL7, utilizando-se a solução “mix 1”	.39
Tabela 02. Valores dos parâmetros de adequação do sistema obtidos nas verificações da coluna utilizada no CL3, utilizando-se a solução “mix 2”	.39
Tabela 03. Número de injeções por mês e acumuladas no CL7	40
Tabela 04. Número de injeções por mês e acumuladas no CL3	41
Tabela 05. Valores de fator retenção do antraceno obtidos no CL7	43
Tabela 06. Valores de retenção do antraceno obtidos no CL3	43
Tabela 07. Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral, valores máximo e mínimo relativos a K do antraceno, a partir dos dados da tabela 05, referentes ao CL7.	44
Tabela 08. Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral, valores máximo e mínimo relativos a K do antraceno, a partir dos dados da tabela 06, referentes ao CL3.	44
Tabela 09. Valores de assimetria do antraceno obtidos no CL7	48
Tabela 10. Valores de assimetria do antraceno obtidos no CL3	48
Tabela 11. Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral e valores máximo e mínimo, relativos à assimetria do antraceno, a partir dos dados da tabela 09 no CL7	49
Tabela 12. Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral e valores máximo e mínimo, relativos a assimetria do antraceno, a partir dos dados da tabela 10 no CL3	49
Tabela 13. Monitoramento das medidas da área do antraceno obtidas no CL7	52
Tabela 14. Monitoramento das medidas da área do antraceno obtidas no CL3	52
Tabela 15. Áreas médias, LSC e LIC obtidos durante o trabalho no CL7, conforme a tabela 13	53
Tabela 16. Valores médios, LSC e LIC obtidos durante o trabalho no CL3, conforme a tabela 14	53
Tabela 17. Valores obtidos para eficiência do antraceno no CL7	58
Tabela 18. Valores obtidos para eficiência do antraceno no CL3	58

Tabela 19. Tipos de regressão entre o número de injeções acumuladas e a eficiência do sistema (número de pratos teóricos do antraceno obtidos ao longo do trabalho no CL7).....	61
Tabela 20. Tipos de regressão entre o número de injeções acumuladas e a eficiência do sistema (número de pratos teóricos do antraceno obtidos ao longo do trabalho no CL7).....	62
Tabela 21. Variação da eficiência do sistema, da diminuição relativa percentual da eficiência e da variação da eficiência por injeção acumulada do antraceno.	62
Tabela 22. Monitoramento de R do antraceno obtida ao longo do trabalho no CL7 .	63
Tabela 23. Monitoramento de R do antraceno obtida ao longo do trabalho no CL3.	63
Tabela 24. Avaliação do tipo de regressão entre o número de injeções acumuladas e R do antraceno obtido nas avaliações durante o trabalho no CL7	66
Tabela 25. Avaliação do tipo de regressão entre o número de injeções acumuladas e a resolução do antraceno, obtidos nas avaliações durante o período do trabalho no CL3.	67
Tabela 26. Determinação da variação de R, da redução relativa percentual de R e da variação de R por injeção acumulada, obtidas ao longo do trabalho	67
Tabela 27. Proposta da periodicidade para um programa de manutenção preventiva de CL	68
Tabela 28. Respostas do antraceno obtidas nas avaliações no CL7	70
Tabela 29. Respostas do antraceno obtidas nas avaliações no CL3.....	70

LISTA DE SIGLAS

α - Fator de seletividade de um analito

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CEFET – Centro Federal de Educação Tecnológica

CL - Cromatógrafo a líquido

CL3 - Cromatógrafo a líquido número 3 do LMCS, marca Shimadzu

CL7 - Cromatógrafo a líquido número 7 do LMCS, marca Dionex

CLAE - Cromatografia em fase líquida de alta eficiência

CLAE/UV-Vis – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência utilizando-se um detector de ultravioleta-visível

desv.pad - Desvio padrão

DGSP – Departamento Geral de Saúde Pública

DPR% - Desvio padrão relativo expresso em porcentagem

DQ - Departamento de Química do “INCQS”

FC - Fator de cauda ou assimetria do sinal cromatográfico

FE - Fase estacionária

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FM - Fase móvel

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

K - Fator de retenção de um analito

LACEN - Laboratórios Estaduais de Saúde Pública

LIC - Limite inferior de controle

LMCS - Laboratório de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do “DQ”

LSC - Limite superior de controle

MS - Ministério da Saúde

N - Eficiência do sistema ou número de pratos teóricos

OMS - Organização Mundial da Saúde

R - Resolução entre dois sinais cromatográficos

R^2 - Coeficiente de determinação

t_0 - Tempo necessário para a "FM" percorrer o " v_0 "

t_r - Tempo de retenção de um soluto

UV-Vis – Ultravioleta/visível

v_i - Volume interno de uma coluna cromatográfica

v_0 - Volume morto de um sistema cromatográfico

VS - Vigilância sanitária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	18
1.2. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL.....	19
1.3. O SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	21
1.3.1. Os laboratórios oficiais.....	22
1.3.2. O INCQS.....	22
1.4. VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS NO INCQS.....	23
1.5. A CROMATOGRAFIA.....	24
1.5.1. A cromatografia em fase líquida.....	25
1.5.1.1. A adequação de sistemas CLAE.....	27
1.5.1.1.1. Fator de retenção (K).....	29
1.5.1.1.2. Fator de retenção relativa, seletividade ou fator de separação (α).....	29
1.5.1.1.3. Número de pratos teóricos ou Eficiência (N).....	29
1.5.1.1.4. Resolução (R).....	30
1.5.1.1.5. Fator de cauda (FC) ou assimetria do pico cromatográfico (As).....	30
1.5.1.1.6. Desvio padrão relativo (DPR%).....	31
1.6. JUSTIFICATIVA.....	31
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAIS.....	34
3.1.1. EQUIPAMENTOS.....	34
3.1.2. PADRÕES E REAGENTES.....	36
3.1.3. DEMAIS MATERIAIS.....	36
3.2. MÉTODO.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. INFLUÊNCIA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA NOS RESULTADOS.....	37
4.2. NÚMERO DE INJEÇÕES MENSAIS E ACUMULADAS EFETUADAS NO CL7 E NO CL3.....	40
4.3. OBTENÇÃO DOS DADOS ATRAVÉS DAS INJEÇÕES.....	41

4.4.	AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA QUE PODERÃO SERVIR PARA GERAR GRÁFICOS DE CONTROLE DOS EQUIPAMENTOS CL.....	43
4.4.1.	Avaliação do parâmetro fator de retenção.....	43
4.4.2.	Avaliação do parâmetro assimetria (FC).....	48
4.4.3.	Avaliação da medida da área.....	52
4.4.4.	Avaliação do custo/benefício entre a qualificação anual e o monitoramento do desempenho dos CL, através de gráficos de controle.....	56
4.5.	AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS PARÂMETROS QUE PODERÃO SERVIR COMO ESTIMATIVA DO DESGASTE DOS CL.....	57
4.5.1.	Número de pratos teóricos ou eficiência (N).....	58
4.5.2.	Resolução (R).....	63
4.5.3.	Avaliação da eficiência e resolução em relação ao desgaste dos sistemas CLAE.....	68
4.5.4.	Desgastes detectados no CL3.....	69
4.6.	ESTUDO PRELIMINAR VISANDO A ESTIMATIVA DA INCERTEZA DOS CL7 e CL3 ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DAS CURVAS DAS RESPOSTAS OBTIDAS	69
5.	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

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. (BRASIL, 1988)

A saúde é, sem dúvida, o maior bem ou riqueza que um indivíduo pode ter ou conquistar.

O homem organizado em sociedade tenta, desde tempos remotos, exercer controle sobre os fármacos, os alimentos, o meio ambiente e o poder médico: Achados arqueológicos comprovam que o homem, cerca de 1600 a.C., já detinha a habilidade em compor drogas, assim como do seu amplo uso. Os alimentos e cosméticos eram objeto do controle por parte dos povos antigos. Algumas cidades indianas, por volta de 1000 a.C., já dispunham de banheiros e esgotos, assim como existiam leis rigorosas sobre o saneamento. Na Índia, em 300 a.C., é editada lei que proíbe a adulteração em perfumes, cereais e medicamentos (BUENO, 2005; COSTA, 2003; COSTA, 2004).

Os habitantes da Roma antiga já cuidavam das suas “águas de beber” e tratavam de descartar, longe daquela cidade, os dejetos orgânicos gerados (BUENO, 2005; COSTA, 2004).

Em 130-210, Galeno já se demonstrava preocupado com os medicamentos, associando a estes um efeito venenoso. Aumenta, assim, o controle do estado sobre o exercício da Medicina. Efetiva-se a separação entre a Medicina e a Farmácia (COSTA, 2004).

Durante a Idade Média surgem formas de proteção ao consumidor, havendo grande cuidado como a limpeza contínua dos mercados, local que gozava de grande destaque social. Surge na cidade de Viena a “vigilância dos portos”, que visava impedir a entrada da peste e outras doenças nas cidades. As embarcações e suas cargas eram submetidas a inspeções e os passageiros infectados ou suspeitos eram colocados sob o regime de “quarentena” nos lazaretos. Surgia, então, a percepção de “Epidemiologia” e “salubridade”, (BUENO, 2005; COSTA, 2004).

O homem vai, gradativamente, tomando consciência do valor da sua saúde e organizou-se para criar as leis, regras e normas visando à sua proteção, preservação da sua saúde e do ambiente onde este habitava. Dentre estas medidas, podemos destacar aquelas de “vigilância sanitária” (VS).

1.2. A VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL

Com a chegada de Tomé de Souza, em março de 1549, é inaugurada a Cidade do Salvador e muitas das práticas europeias de vigilância sanitária são aplicadas aqui no além-mar. Entretanto, somente em 1744 é elaborado um regimento que regulamenta as inspeções das boticas a cada três anos, a apreensão de drogas alteradas e a proibição do comércio de drogas/medicamentos, sem a prévia autorização. São estabelecidos valores de multas para as infrações cometidas (BUENO, 2005; COSTA, 2004).

A vinda da Família Real traz para o Brasil, além das sementes do Liberalismo e do incremento do fluxo de embarcações, avanços significativos na área da saúde com a criação da Escola de Medicina e Cirurgia da Bahia e a implantação da primeira legislação de VS brasileira (BUENO, 2005; COSTA & ROZENFELD, 2000).

Em 1851, cria-se a Junta Central de Higiene Pública que tem como atribuição a “inspeção da vacinação, o controle do exercício da medicina e a polícia sanitária de terra”, cuja incumbência é inspecionar navios, alimentos, farmácias, cemitérios, laboratórios e todos os estabelecimentos ou locais capazes de veicular qualquer dano à saúde da população, além de proceder às vacinações (BUENO, 2005; SLVA, 2000).

Findo o regime de absolutismo no Brasil em 1889, inicia-se a organização das administrações sanitárias estaduais (BUENO, 2005). Em 1923 é editado o Decreto nº 16.300 contendo 1679 artigos, primeiro Regulamento Sanitário Federal (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Nos anos 30 e 40 houve intensa produção normativa e legal devido ao aumento no desenvolvimento da indústria químico-farmacêutica e de agrotóxicos. As estruturas de saúde pública passaram por várias reformas e com a criação e especialização de órgãos e ampliação das suas funções. É criado o Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina (SNFM) e novas atribuições e

responsabilidades são dadas ao Instituto Oswaldo Cruz, futura FIOCRUZ, na área da saúde pública (COSTA & ROZENFELD, 2000).

Em 1953 é criado o Ministério da Saúde (MS) através da Lei nº 1920 e, no ano seguinte, é criado o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos (LCCDM) que, em 1955 incorpora a área de controle de alimentos, passando a sua sigla a ser LCCDMA (BRASIL, 1954).

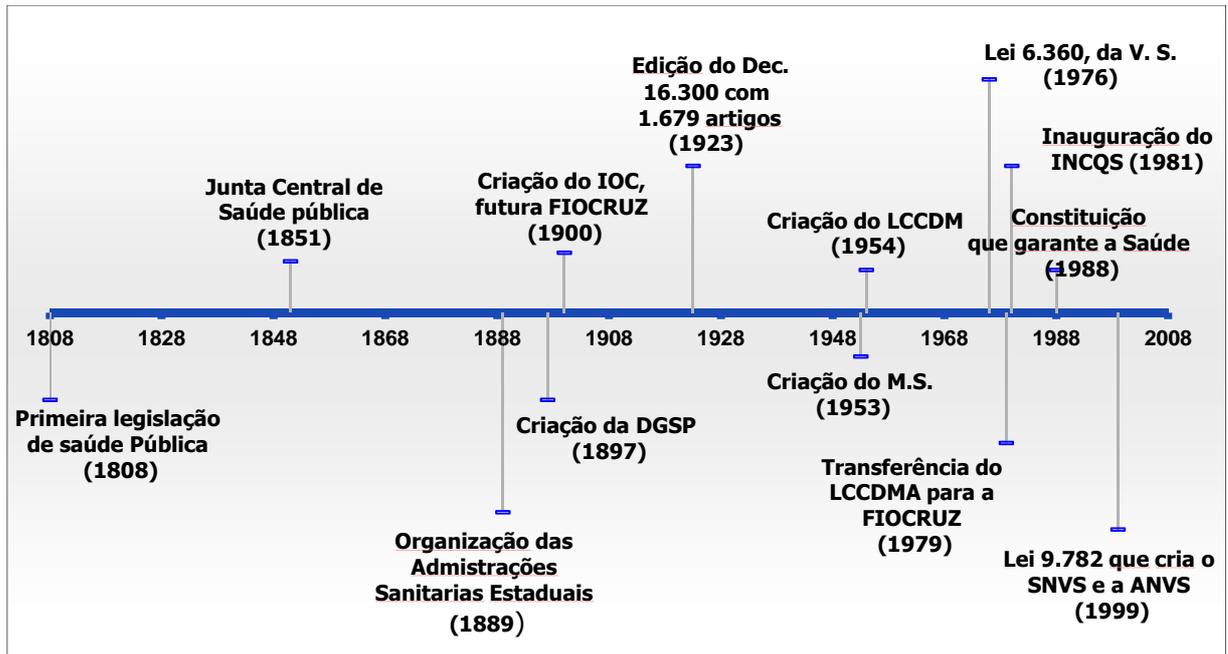
Somente em 1976, a VS no Brasil ganha importância com a edição da Lei nº 6.360, a chamada “Lei de VS”, que é posteriormente regulamentada pelo Dec. nº 79.094 de 1977 e alterada pelo Dec. nº 3.961 de 2001. Em 1977, é editada a Lei nº 6.437 que trata das infrações à legislação sanitária federal e estabelece as respectivas sanções (SILVA, 2000). Neste período, ocorrem grandes reformas administrativas com a reestruturação do MS com repercussão na área de VS; cria-se a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) (BUENO, 2005; COSTA & ROZENFELD, 2000).

Os anos 80 e 90 são fundamentais para as mudanças na saúde pública brasileira: Em 1978 o LCCDMA é transferido para a FIOCRUZ (BRASIL, 1978), sendo rebatizado no ano de 1981 com o nome de Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) (ANVISA, 2002); É editada a Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990, que age sobre o Sistema Único de Saúde (SUS) criado em 1988 e, ainda, redefine a atuação da VS (BRASIL, 1990; ANVISA, 2002); O Código de Defesa do Consumidor, criado através da Lei nº 8.078 de 1990, contribui para a reforma, atribuindo responsabilidade ao produtor pela qualidade dos seus produtos e serviços (BUENO, 2005).

Neste período, contudo, ocorrem graves falhas no sistema de VS, sobretudo na área de medicamentos com várias denúncias de falsificações. Estes episódios levam o governo a reestruturar todo o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. É criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (futura ANVISA) em substituição à SNVS (ANVISA, 2002; BRASIL, 1999; BUENO, 2005).

A figura 01 mostra uma “linha do tempo” da evolução da VS no Brasil nos seus primeiros 200 anos.

Figura 1 - Evolução da Vigilância Sanitária no Brasil entre 1808-2008.



1.3.O SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, definido pela Lei nº 9.782 de 1999, é composto por agentes das três esferas de governo: a federal, a estadual e a municipal (ANVISA, 2002).

A ANVISA, que está sob a tutela do MS, representa a esfera federal juntamente com o INCQS/FIOCRUZ. Na esfera estadual tem-se a forma organizacional de administração direta e dependente dos níveis centrais das Secretarias Estaduais de Saúde. Na esfera municipal, atuam as organizações com concepções e percepções próprias da importância das ações sanitárias. As distintas competências destas três esferas estão bem definidas no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária através da Lei nº 8.080 de 1990 (ANVISA, 2002).

A ANVISA é a instituição federal responsável pela VS no Brasil e tem por finalidade promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à VS, incluindo-se o controle de ambientes, de processos, de insumos e das tecnologias a estes relacionadas. É, também, de sua responsabilidade, o controle dos portos, aeroportos e fronteiras (ANVISA, 2002; BUENO, 2005).

1.3.1. Os laboratórios oficiais

Para cumprir o seu papel legal de proteção da saúde, a VS deve monitorar a qualidade dos produtos submetidos ao consumo da população do Brasil. Assim, a legislação brasileira estabelece padrões e normas de qualidade para produtos, entre outras as Boas Práticas de Fabricação - BPF (ANVISA, 2002; BRASIL, 2008).

Os laboratórios oficiais também fazem parte do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, tendo como função dar suporte laboratorial, contribuindo com avaliações analíticas de perícia, que fornecem subsídios às ações de VS (COSTA, 2003).

O Controle da Qualidade não deve se limitar às operações laboratoriais, mas abranger todas as decisões relacionadas à qualidade do produto.

A Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVS) é coordenada pela GGLAS, da ANVISA/MS (ANVISA, 2011). Esta Rede tem como atores principais O INCQS, os Laboratórios Estaduais de Saúde Pública (LACEN) e os demais laboratórios designados pela legislação vigente (ANVISA, 2002).

1.3.2. O INCQS

O INCQS foi criado no final da década de 70 visando à substituição do LCCDMA. Hoje está vinculado administrativamente à FIOCRUZ e tecnicamente à ANVISA. Vem atuando em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório, relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da VS, em estreita cooperação com a ANVISA, com Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde, dentre outros parceiros (INCQS, 2008a).

O INCQS tem como missão principal:

Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. (INCQS, 2008a)

O INCQS destaca-se por atuar como referência no controle da qualidade de medicamentos, alimentos; cosméticos; sangue e hemoderivados; biológicos; kits e

regentes para diagnósticos; produtos para diálise; saneantes e domissanitários; produtos para a saúde e do meio ambiente (INCQS, 2008b).

Face à sua responsabilidade, cabe ao INCQS demonstrar que os resultados analíticos, obtidos em seus ensaios, atendem às legislações atuais quanto à qualidade. Em 2012, a ANVISA editou a Resolução RDC N° 11 que norteia o INCQS e demais “laboratórios analíticos, que realizam análises em produtos sujeitos à Vigilância Sanitária”, para a obtenção de resultados analíticos fidedignos e com qualidade (BRASIL, 2012).

1.4. VIGILÂNCIA DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS NO INCQS

Os departamentos técnico-científicos do INCQS são divididos segundo as suas respectivas áreas de conhecimento. Os ensaios físico-químicos de medicamentos são realizados pelo Setor de Medicamentos do Laboratório de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes (LMCS) do Departamento de Química (DQ) (INCQS, 2008c).

As amostras encaminhadas para análise no Setor de Medicamentos são, em sua maioria, vindas de programas junto ao MS e/ou ANVISA, ou encaminhadas por uma autoridade sanitária para perícia, via análise fiscal (INCQS, 2008d). No caso da análise fiscal, uma “denúncia” acompanha a amostra e pode ser: falta de efeito ou eficiência; intoxicação; óbito ou outra.

O INCQS deve utilizar em suas análises/ensaios sempre as normas, procedimentos ou monografias mais recentes ou modernas (BRASIL, 2012). Os métodos adotados pelo Setor de Medicamentos em seus ensaios de rotina são, na sua grande maioria, aqueles descritos em farmacopeias, onde constam os critérios e padrões mínimos quanto à qualidade para a aceitação de um produto como medicamento. Dentre as farmacopeias existentes, a Brasileira e a Americana são as mais utilizadas por este Setor.

Em relação aos equipamentos utilizados, o laboratório deve dispor de procedimentos que assegurem o correto funcionamento e previna a contaminação ou deterioração destes. Deve, ainda, elaborar procedimentos para monitorar e assegurar a validade das suas análises (BRASIL, 2012).

Dentre os ensaios que tenham impacto em termos de “perícia em VS”, alguns se destacam, como a identificação, teor e dissolução do princípio ativo (fármaco).

Grande parte destes ensaios, principalmente aqueles de quantificação, utilizam a CLAE/UV-Vis, o que demonstra a importância desta técnica. A CLAE é uma técnica onde se faz uso da “cromatografia a líquido moderna”.

1.5. A CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico de separação extremamente eficiente, que encontra aplicação em todas as áreas da ciência. É a mais empregada técnica de análise instrumental e, em muitos casos, é a única opção de separação entre componentes muito semelhantes.

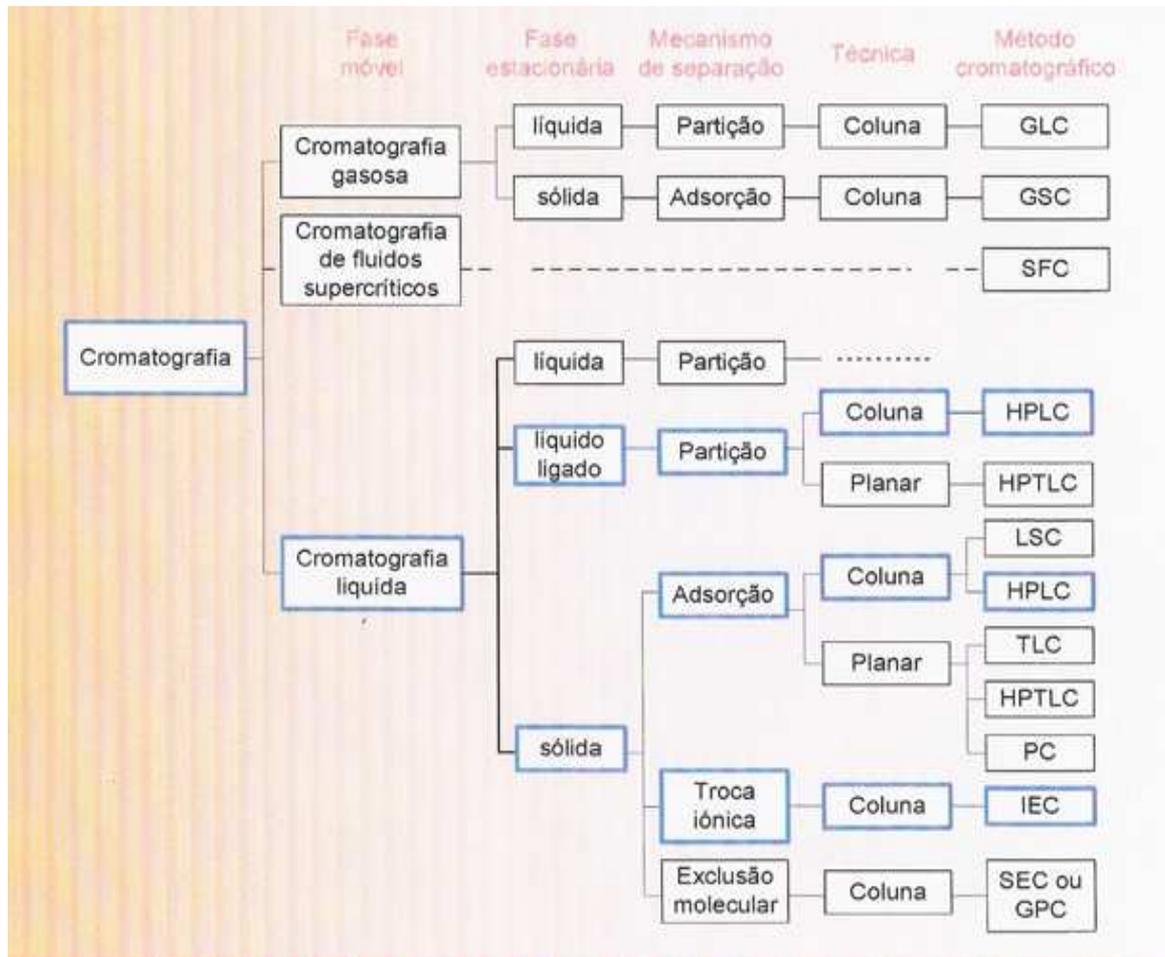
A técnica foi inventada pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século XX e foi quem a batizou como sendo a “escrita das cores”. Em seu experimento, Tswett percolou através de uma coluna de vidro, recheada com carbonato de cálcio, soluções contendo uma mistura de vários pigmentos de plantas. Ao final, ele observou que várias bandas coloridas tinham surgido ao longo da coluna e que cada banda colorida correspondia a uma única espécie, inicialmente presente na mistura (SKOOG, 2002a).

Em toda separação cromatográfica, a amostra é carregada por uma fase móvel (FM), que é forçada através de uma fase estacionária (FE) imiscível e fixa, que recheia uma coluna ou uma superfície sólida. Os componentes da amostra se distribuem de forma e graus variados, dependendo das fases escolhidas. A fase móvel pode ser um líquido, gás, ou um fluido supercrítico, enquanto a fase estacionária pode ser sólida, um líquido ou ainda “quimicamente ligada” (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002a).

O rápido avanço tecnológico das últimas décadas propiciou o aperfeiçoamento dos métodos cromatográficos que vem gradativamente elevando o seu grau de sofisticação (LANÇAS, 2009).

A figura 02 mostra os tipos mais comuns de cromatografia.

Figura 02 – Tipos de cromatografia



Fonte: (ALBERT, 2010)

1.5.1. A cromatografia em fase líquida

Na cromatografia em fase líquida, a FM que carrega consigo a amostra é um líquido, enquanto a fase estacionária é constituída por partículas sólidas, como a alumina ou a sílica, um líquido, ou ainda um líquido ligado quimicamente a partículas sólidas.

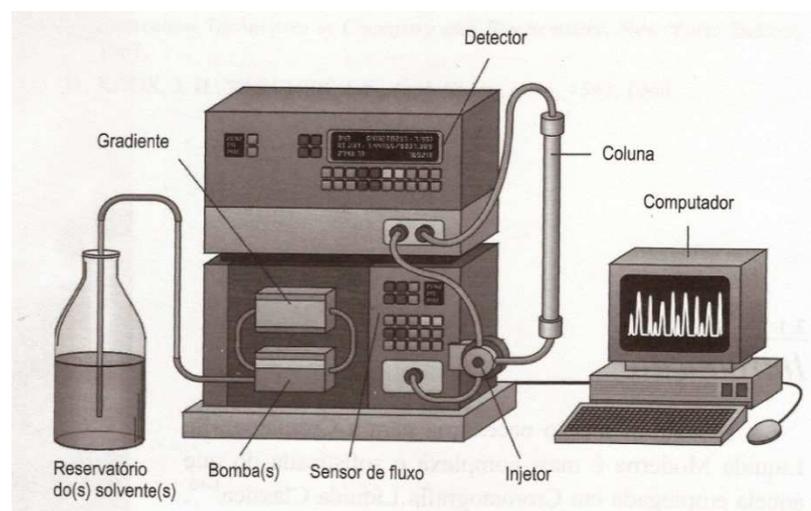
Algumas forças físicas e químicas atuam nas relações soluto/FM e soluto/FE e são responsáveis pela velocidade com que o soluto percorre a coluna cromatográfica (HARRIS, 2001b). As forças elementares que mais influenciam neste processo são as forças de Van der Waals; as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas (CEFET, 2005).

Recentemente a técnica evoluiu, objetivando-se otimizar o tempo de ensaio e baixar o consumo de solventes: bombas de alto desempenho para bombear a FM passaram a ser utilizadas; diversos tipos de detectores foram criados ou acoplados aos equipamentos, visando à melhoria nos resultados analíticos (qualitativa e quantitativamente); a informática passou a ter papel de destaque na automação e controle dos equipamentos e na aquisição e comparação de dados. As colunas cromatográficas, entretanto, foram as que mais evoluíram em relação àquelas utilizadas por Tswett. Com o emprego de substâncias diversas, com as mais variadas características físico-químicas, essas colunas passaram a ser capazes de efetuar separações cromatográficas nos mais variados tipos de matrizes (LANÇAS, 2009).

Deu-se o nome de CLAE a essa técnica cromatográfica mais recente, onde é possível ao analista otimizar e adequar o sistema cromatográfico às suas necessidades, sendo possível monitorar e interferir no processo a qualquer momento.

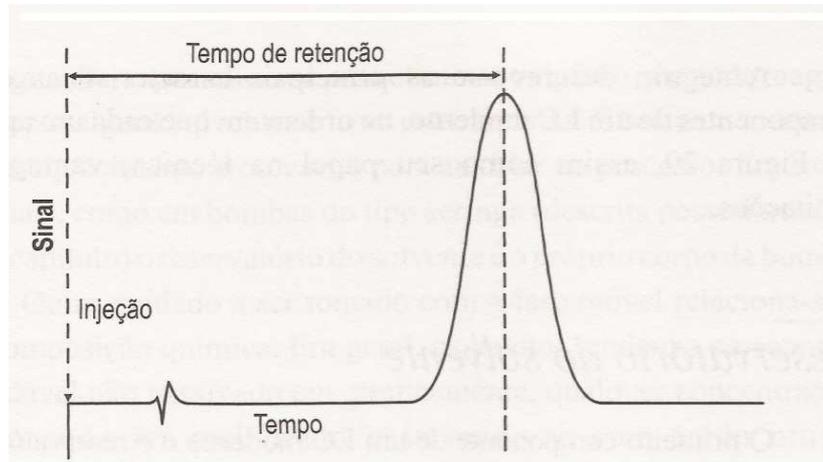
A figura 03 mostra o desenho de um cromatógrafo a líquido (CL) utilizado em CLAE e seus principais módulos (bomba, injetor, detector, coluna e sistema de integração) e a figura 04 representa um cromatograma “típico” obtido desses tipos de equipamentos.

Figura 03 – Cromatógrafo moderno



Fonte: (LANÇAS, 2009)

Figura 04 – Cromatograma típico obtido com CLAE



Fonte: (LANÇAS, 2009)

1.5.1.1. A adequação de sistemas CLAE

Os ganhos em tecnologia, principalmente no período “pós-guerra”, rapidamente passaram a ser incorporados à rotina do homem moderno. A utilização de equipamentos eletrônicos, como os computadores pessoais, é cada vez mais corriqueira e a velocidade da informação é hoje, quase que instantânea. Paralelamente, surge o conceito de “Qualidade Total”, que aponta para a necessidade da normatização dos processos, principalmente os científicos, de forma a garantir que os dados adquiridos ou os resultados apresentados são dignos de fé.

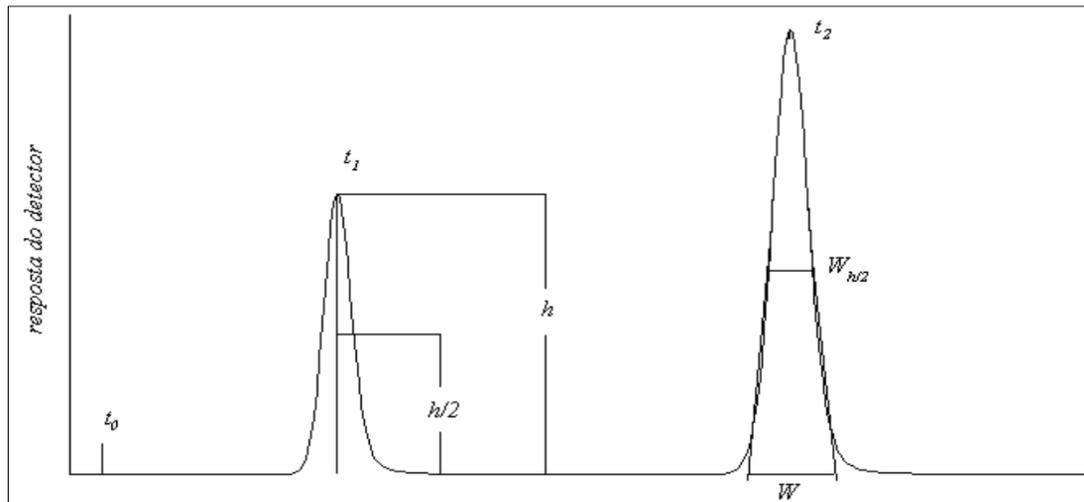
Neste contexto, para os experimentos realizados por CLAE, faz-se necessário demonstrar que o sistema está “adequado” ao ensaio em questão. O equipamento a ser utilizado deve atender, minimamente, a alguns parâmetros pré-estabelecidos (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002b).

Um conjunto de testes para a verificação da adequação é aplicado em todo o sistema cromatográfico de forma a garantir os resultados. Este fato baseia-se no conceito de que os equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema único, devendo ser avaliado como um todo (THE UNITED, 2012).

A adequação é demonstrada após verificação de alguns parâmetros do sistema cromatográfico, como a resolução (R); eficiência ou número de pratos teóricos (N); fator de retenção (K); desvio padrão relativo entre as replicatas da amostra (DPR%);

fator de cauda ou assimetria (FC) e fator de seletividade (α) (CROMATOGRAFIA, 2010). O cálculo desses indicadores baseia-se em conceitos clássicos e elementares da cromatografia moderna que podem ser melhores entendidos com o auxílio da figura 05, que representa um cromatograma de duas substâncias.

Figura 05 – Cromatograma de duas substâncias



Fonte: (FARMACOPEIA, 2010)

Para a determinação de alguns dos parâmetros mencionados, faz-se necessário, primeiramente, calcular o volume interno (v_i) da coluna cromatográfica utilizada e o seu “volume morto” (v_0).

- Calcula-se o valor de v_i pela fórmula matemática (volume do cilindro):

$$v_i: \pi \cdot r^2 \cdot h$$

O volume morto (v_0) de uma coluna cromatográfica é o volume total não ocupado pelas partículas da FE e pode ser estimado, matematicamente, levando-se em conta v_i e o tamanho/forma das partículas da FE utilizada.

É possível estimar, experimentalmente, o v_0 de todo o sistema cromatográfico: é o volume compreendido entre o injetor e o detector e pode ser obtido multiplicando-se pelo fluxo, o tempo obtido para o sinal cromatográfico de uma substância não retida (t_0), que geralmente é o solvente da amostra (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002a).

Estima-se que seja, normalmente, de 80% a 90% a contribuição do v_0 da coluna no v_0 total de um sistema cromatográfico.

1.5.1.1.1. Fator de retenção (K)

O fator de retenção ou fator de capacidade (K) indica a velocidade de migração do soluto em uma coluna (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002a). K indica o grau de afinidade que o componente possui com a FM e com a FE. Este parâmetro permite comparar o volume (v) ou tempo (t) de retenção de um analito com o valor de v_0 ou t_0 (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002a).

As expressões a seguir correlacionam o fator de retenção (K) de um soluto com o seu volume/tempo de retenção (v_r/t_r) e o volume/tempo “morto” (v_0/t_0) do sistema (ou da coluna).

$$K = \frac{v_r - v_0}{v_0} \quad \text{ou} \quad K = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

1.5.1.1.2. Fator de retenção relativa, seletividade ou fator de separação (α)

O fator de seletividade ou separação, α , é a relação existente entre os tempos que dois solutos permanecem na fase líquida, sendo proporcional aos seus coeficientes de partição (HARRIS, 2001a). O fator α compara a retenção de um componente (K_2) com a de outro componente menos retido (K_1) e indica o quanto a FM é seletiva em relação a estes dois componentes (HARRIS, 2001a). Quanto maior o valor de α , melhor será a separação alcançada, enquanto valores inferiores à unidade (1) indicam que o sistema não é capaz de separar os dois componentes.

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

1.5.1.1.3. Número de pratos teóricos ou Eficiência (N)

A eficiência ou número de pratos teóricos (N) de uma coluna cromatográfica é a medida do quanto esta coluna é capaz de realizar as separações. Quanto maior o número de pratos teóricos, mantidos os demais parâmetros, maior a eficiência da coluna e, portanto, melhor a separação (LANÇAS, 2009). N pode ser expresso em

número de pratos teóricos por coluna ou por metro da coluna cromatográfica e seu valor depende da substância analisada, FE, FM e temperatura (FARMACOPEIA, 2010):

$$N = 16(t_r/W)^2 \text{ ou } N = 5,54(t_r/W_{h/2})^2$$

onde:

t_r = Tempo de retenção da substância.

W = Largura do pico na linha de base.

$W_{h/2}$ = Largura do pico à sua meia altura.

1.5.1.1.4. Resolução (R)

A resolução (R) é uma medida quantitativa que mede o grau de separação entre dois picos, ou sinais cromatográficos, consecutivos em um determinado sistema. R pode ser calculada a partir das larguras dos picos e seus respectivos tempos de retenção. A resolução pode ser afetada por K, α , e N de forma diferente (HARRIS, 2001a; SKOOG, 2002a).

$$R = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{(W_1 + W_2)} \quad \text{ou} \quad R = 1,18 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{h1/2} + W_{h2/2})}$$

onde:

t_r = Tempo de retenção da substância.

W = Largura do pico na respectiva linha de base.

$W_{h/2}$ = Largura do pico à sua respectiva meia altura.

2 = Segundo pico

1 = Primeiro pico.

1.5.1.1.5. Fator de cauda (FC) ou assimetria do pico cromatográfico (As)

O fator de cauda (FC) indica a simetria do pico cromatográfico. A Farmacopéia Brasileira adota o fator de cauda calculado a 5 % da altura do mesmo. O valor de 1,

indica que o pico é perfeitamente simétrico. O FC aumenta à medida que a assimetria do pico se torna mais pronunciada (FARMACOPEIA, 2010).

$$FC = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Sendo:

$W_{0,05}$ = Largura do pico à 5% da sua altura

f = Valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura.

1.5.1.1.6. Desvio padrão relativo (DPR%)

O desvio padrão relativo (DPR%) é o parâmetro da adequação do sistema que mede a repetitividade dos resultados obtidos expresso em percentagem.

$$DPR = \frac{\text{Desvio}}{\text{Média}} \times 100$$

Sendo:

Desvio = desvio padrão das replicatas.

Média = Média das replicatas.

1.6 JUSTIFICATIVA

Com a finalidade de atender às normas de qualidade quanto à garantia dos seus resultados analíticos, o Setor de Medicamentos do INCQS vem aumentando o rigor quanto à aquisição, estoque e utilização de padrões, reagentes e equipamentos. Todos os ensaios por CLAE/UV-Vis, realizados neste Setor, devem atender ao POP 65.3110.050 (Adequação de Sistemas Cromatográficos Utilizados no Setor de Medicamentos), que padroniza o procedimento de adequação de sistemas cromatográficos. Este POP estabelece, caso não estejam descritos na metodologia utilizada, os parâmetros (K, N, R, FC e DPR%) e seus respectivos limites para que o ensaio possa ser realizado naquele CL (INCQS, 2012b).

Todos os equipamentos utilizados em ensaios analíticos devem ser submetidos a qualificações operacionais periodicamente e, se necessário, a verificações intermediárias entre as qualificações (ANALYTICAL, 2012).

Qualificação operacional é um conjunto de testes a serem realizados no equipamento, onde cada um dos módulos individualmente e o sistema como um todo, é checado com a finalidade de estabelecer uma relação entre os valores obtidos e os valores correspondentes das grandezas estabelecidos por padrões.

Verificação intermediária é um conjunto de testes que visa comprovar que o equipamento ainda continua qualificado.

Os cromatógrafos utilizados em CLAE/UV-Vis devem, conforme o exposto, ser qualificados e verificados periodicamente. O INCQS dispõe do POP 65.3110.034 (Qualificação/Calibração de Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência) e o POP 65.3110.044 (Programa de Verificação do Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência), onde os procedimentos para a qualificação e a verificação, respectivamente, dos CL estão descritos, assim como os critérios de aceitação. (INCQS, 2011; INCQS, 2012a). O ANEXO A e o ANEXO B deste trabalho apresentam os parâmetros avaliados e seus respectivos limites ou valores de aceitação para as qualificações e verificações de CL.

Equipamentos altamente automatizados e computadorizados, como os CL para CLAE/UV-Vis, devem ainda ser submetidos a verificações de performance (desempenho), onde a consistência da “resposta” do equipamento é checada ou monitorada contra valores obtidos anteriormente. Resposta é a razão do valor medido ou obtido como resultado do ensaio (no caso a área) pela quantidade de soluto injetado no sistema.

Atualmente o LMCS não avalia a “performance” dos seus nove CL durante o uso e entre duas qualificações. Também não está estabelecido um período para as manutenções preventivas, como é recomendado pelos protocolos oficiais (ANALYTICAL, 2012; OMS, 2011). Logo, faz-se necessário o estabelecimento de um procedimento para realizar as avaliações de performance e, se possível, a elaboração de um programa de manutenção preventiva para os CL que utilizam a técnica de CLAE/UV-Vis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar um procedimento para a avaliação da performance dos cromatógrafos a líquido do Setor de Medicamentos do DQ/INCQS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Gerar um gráfico de controle específico para cada cromatógrafo (meses x parâmetros da adequação do sistema);
- b) Relacionar o número de injeções com os resultados obtidos nas avaliações mensais para cada um dos parâmetros da adequação do sistema;
- c) Estimar o tempo necessário para a realização de manutenções preventivas e o tempo necessário para a realização das qualificações operacionais baseado nos gráficos de controle específicos para cada CL;
- d) Gerar dados que futuramente poderão ser utilizados no cálculo da incerteza de cada equipamento envolvido neste estudo com a finalidade de contribuir no cálculo da incerteza de medição (expandida) dos ensaios realizados nos mesmos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

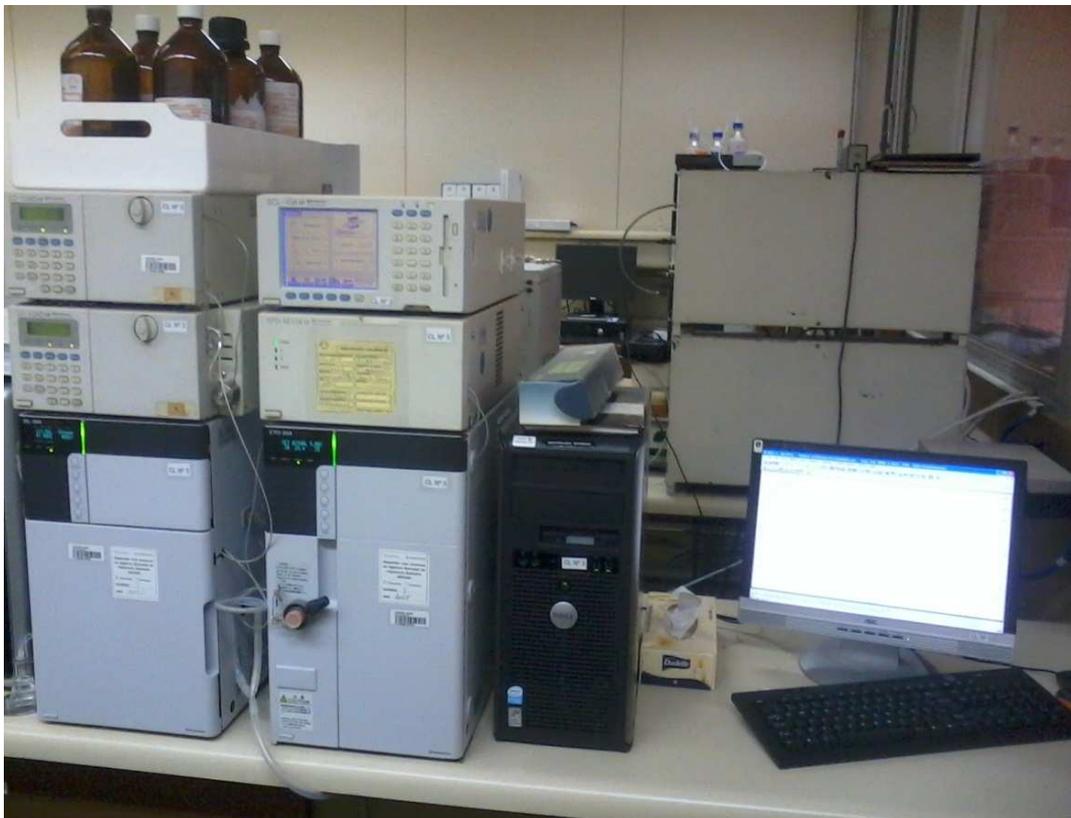
3.1 MATERIAIS

Para a execução do presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos; padrões; reagentes e demais materiais:

3.1.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Cromatógrafo a líquido (CL3) marca SHIMADZU, composto por: duas bombas LC-10ADvp; injetor automático SIL 20A; detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10Avp; condicionador de colunas CTO-20A; sistema de controle SCL-10Avp e programa de aquisição e tratamento de dados Class VP. A foto abaixo (figura 06) mostra o equipamento.

Figura 06 – Cromatógrafo a líquido “CL3”.



- ✓ Cromatógrafo a líquido (CL7) marca DIONEX e modelo UltiMate 3000, composto por: bomba quaternária LPG 3400A; injetor automático WPS-3000; detector Uv-Vis VWD 3400; condicionador de colunas TCC 3000 e programa de aquisição e tratamento de dados Chromeleon Datasystem 6.80 SR6. A foto abaixo (figura 07) mostra o equipamento.

Figura 07 – Cromatógrafo a líquido “CL7”.



- ✓ Balança analítica marca METTLER TOLEDO modelo AX 205, com resolução de 0,01 miligramas;
- ✓ Aparelho de ultrassom marca BRANSOM modelo 2510;
- ✓ Sistema de purificação de água marca MILLIPORE, composto pelos módulos MILLIQ A10 e RiOs 5.

3.1.2 PADRÕES E REAGENTES

- ✓ Metronidazol marca “FARMACOPEIA BRASILEIRA”, lote 1004;
- ✓ Antraceno marca SIGMA-ALDRICH, lote 09924AJ-288;
- ✓ Água reagente grau 1, colhida do aparelho de purificação MILLIPORE (bloco3/sala 120) no dia de seu uso;
- ✓ Acetonitrila grau CLAE marca MERCK, lote I530630;

3.1.3 DEMAIS MATERIAIS

- ✓ Vidraria de laboratório, sendo que os balões e pipetas volumétricas eram calibrados;
- ✓ Coluna cromatográfica marca WATERS modelo Nova-Pak C8 (4 μm), com 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno (2 unidades).
- ✓ Unidade filtrante 25mm, membrana em PVDF, marca MILLEX, 0,45 μm e lote B2AA82607.
- ✓ Membrana 0,22 μm em PVDF, marca Millipore, tipo GV e lote BOEA76527.

3.2 MÉTODO

Imediatamente após a qualificação dos equipamentos e a verificação das duas colunas cromatográficas, conforme os respectivos procedimentos (POP 034 e POP 051), o presente estudo teve início seguindo-se a metodologia abaixo descrita:

Acetonitrila grau CLAE e água tipo 1 foram filtradas em membrana 022 μm e acondicionadas em frascos que foram instalados em canais separados em cada CL.

Com as colunas cromatográficas devidamente instaladas nos respectivos cromatógrafos, procedeu-se o condicionamento destas, utilizando-se a proporção de 55% de acetonitrila para 45% de água, com um fluxo de FM de 1,0mL/min e temperatura do condicionador de colunas mantida em 30°C.

Preparou-se uma solução “mix” contendo aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de metronidazol e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antraceno. Uma alíquota desta solução foi filtrada em membrana Millex e transferida para vials.

Uma porção de FM foi preparada, filtrada e levada para vials.

Após o condicionamento das colunas utilizando-se o mesmo fluxo, temperatura e um comprimento de onda para detecção de 251nm, foram realizadas em cada CL, cinco injeções consecutivas dos volumes de 5, 10 e 20 µL do vial de solução mix e, a seguir, duas injeções consecutivas de 20µL do vial de FM.

Terminadas as injeções, os resultados obtidos para tempo de retenção, área, fator de cauda e DPR% da área, foram submetidos aos parâmetros do POP 65.3110.044, para que estes resultados pudessem ser considerados válidos.

Após validados, estes valores de resolução, tempo de retenção, fator de cauda, área e número de pratos teóricos referentes ao pico do antraceno, obtidos em cada equipamento, foram tratados estatisticamente com a finalidade de se estabelecer uma correlação entre eles.

Durante os meses de março a novembro de 2012 a metodologia acima descrita, foi repetida em intervalos de aproximadamente 30 dias, gerando, portanto, 09 conjuntos de dados que foram tratados estatisticamente com o programa “Microsoft Excel”.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 INFLUÊNCIA DA COLUNA CROMATOGRÁFICA NOS RESULTADOS

Foram feitas verificações de cada coluna cromatográfica utilizada nos equipamentos (CL7 e CL3), antes do início, no meio e ao final do trabalho, objetivando monitorar possíveis desgastes das colunas e o impacto destes nos resultados dos parâmetros avaliados.

Após o preparo de duas soluções “Mix” (conforme descrito nos itens 7.2 e 7.3 do POP 65.3110.051 - Gerenciamento de colunas cromatográficas utilizadas no setor de medicamentos) contendo metronidazol, diazepam e carbamazepina (mix1) e tolueno, naftaleno e antraceno (mix2), efetuaram-se os devidos ajustes na composição da fase móvel, de forma a otimizar a resolução entre os picos obtidos. A seguir, procederam-se seis injeções de 10µL em replicata, em cada CL. Utilizou-se para cada equipamento uma mistura “mix” e uma coluna cromatográfica única e exclusiva para o estudo em questão (INCQS, 2012c).

Os cromatogramas obtidos na verificação da coluna utilizada no CL7 (Figura 08) e no CL3 (Figura 09) estão demonstrados a seguir.

Figura 08 - Cromatograma obtido no CL7 com detector UV-Vis; solvente: a fase móvel; condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 μ m, 150 mm x 3,9 mm d.i); FM: ACN grau CLAE 60:40 água; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 μ L, detecção a 254nm.

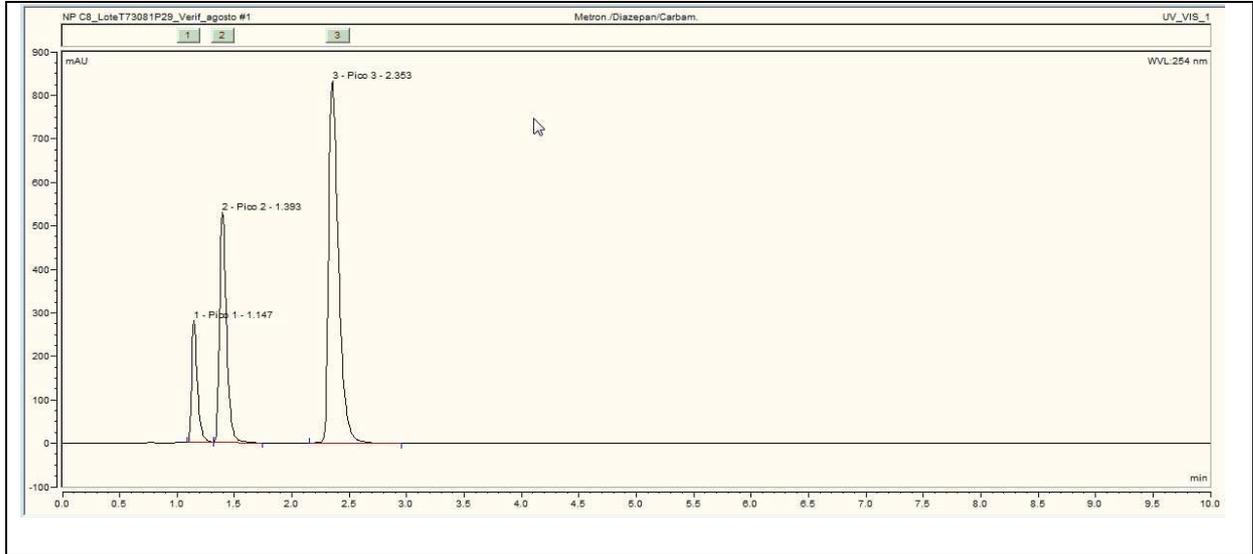
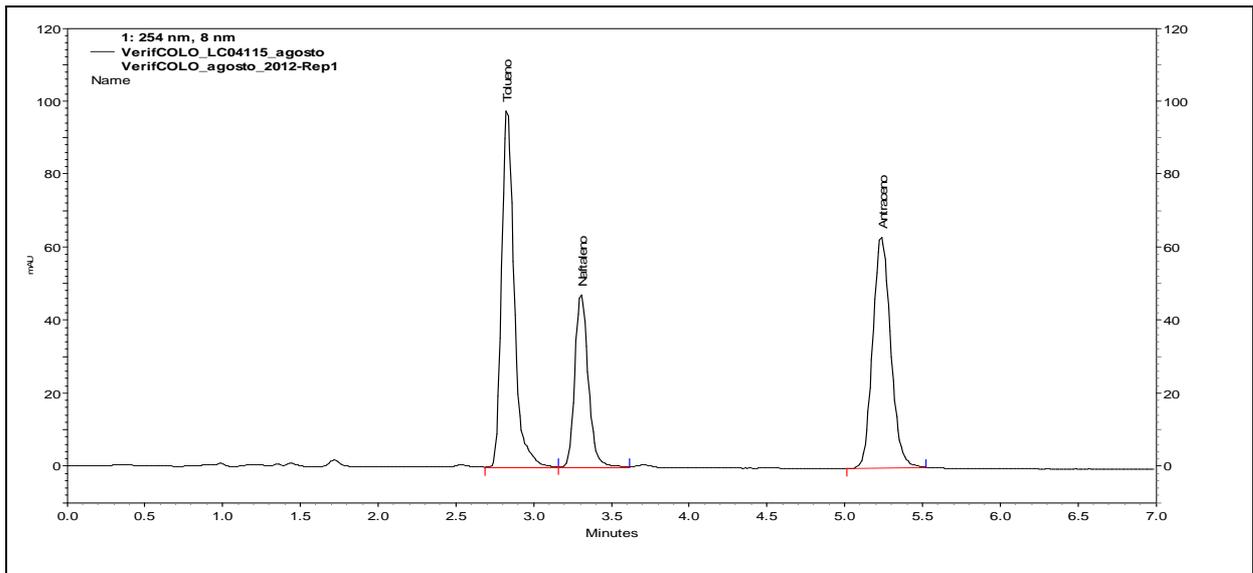


Figura 09 - Cromatograma obtido no CL3 com detector UV-Vis (DAD), solvente: a fase móvel; condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 μ m, 150 mm x 3,9 mm d.i); FM: ACN grau CLAE 60:40 água; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 μ L, detecção a 254nm.



Os valores obtidos para os parâmetros de adequação do sistema, durante as verificações das colunas cromatográficas utilizadas no CL7 e no CL3, estão demonstrados nas tabelas 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01 – Valores dos parâmetros de adequação do sistema obtidos nas verificações da coluna utilizada no CL7, utilizando-se a solução “mix 1”.

M	Fev	Ago	Dez	D	Fev	Ago	Dez	C	Fev	Ago	Dez
t_r	1,15	1,15	1,21	t_r	1,41	1,40	1,44	t_r	2,44	2,36	2,59
DPR (%)	0,00	0,33	0,32	DPR (%)	0,00	0,28	0,27	DPR (%)	0,42	0,43	0,39
FC	1,52	1,54	1,64	FC	1,44	1,38	1,40	FC	1,54	1,67	2,23
DPR (%)	4,44	3,64	5,22	DPR (%)	1,03	5,01	1,07	DPR (%)	2,79	4,12	4,29
K	0,15	0,15	0,21	K	0,41	0,40	0,44	K	1,44	1,36	1,59
DPR (%)	0,00	2,55	1,84	DPR (%)	0,00	0,97	0,87	DPR (%)	0,71	0,75	0,64
Área	12,629	16,207	47,013	Área	29,113	37,633	105,143	Área	65,199	83,878	234,358
DPR (%)	0,14	0,80	0,79	DPR (%)	0,16	0,60	0,33	DPR (%)	0,82	0,10	0,04

Onde: M= metronidazol; D= diazepam; C= carbazepina.

Tabela 02 – Valores dos parâmetros de adequação do sistema obtidos nas verificações da coluna utilizada no CL3, utilizando-se a solução “mix 2”.

T	Mar	Ago	N	Mar	Ago	A	Mar	Ago
t_r	2,84	2,83	t_r	3,33	3,31	t_r	5,27	5,24
DPR (%)	0,14	0,00	DPR (%)	0,16	0,00	DPR (%)	0,12	0,00
FC	1,23	1,49	FC	1,17	1,18	FC	1,10	1,11
DPR (%)	4,64	0,78	DPR (%)	3,91	1,29	DPR (%)	3,31	1,56
K	2,52	2,49	K	3,11	3,08	K	5,51	5,47
DPR (%)	0,32	0,00	DPR (%)	0,17	0,00	DPR (%)	0,18	0,00
Área	1909780,5	552280,0	Área	213115,8	289574,0	Área	353985,7	507633,7
DPR (%)	0,40	0,25	DPR (%)	0,39	0,37	DPR (%)	0,56	0,19

Onde: T= tolueno; N= naftaleno e A= antraceno.

Pode-se observar que não houve alterações significativas nos parâmetros de adequação do sistema, devido a possíveis desgastes das colunas cromatográficas ao longo do trabalho de avaliação da performance do CL7 e do CL3. Este fato pode estar associado ao pouco uso das colunas (inicialmente novas). As variações detectadas nos valores de área são devidas a mudanças na composição da mistura mix1 e mix2, que estavam tendo a sua proporção estudada quando da revisão do POP 65.3110.051.

Além das 18 injeções efetuadas nas três verificações de coluna, foram efetuadas, também, vinte injeções em cada avaliação. Foram executadas nove avaliações dos cromatógrafos CL7 e CL3, com intervalo de aproximadamente um mês entre elas. Durante este período de nove meses de avaliação, cada equipamento totalizou, aproximadamente, 200 injeções relacionadas ao estudo.

As variações observadas nos parâmetros de adequação do sistema durante este estudo, apresentaram valores semelhantes àqueles atribuídos à variabilidade do desempenho (performance) dos CL.

Após a avaliação destes dois conjuntos de dados, seguramente podemos concluir que as colunas cromatográficas não influenciaram nos resultados obtidos.

4.2 NÚMERO DE INJEÇÕES MENSAIS E ACUMULADAS EFETUADAS NO CL7 E NO CL3

No CL7, com auxílio de um dispositivo de registro de injeções disponível, foi possível determinar o número exato de injeções efetuadas entre duas verificações (injeções mensais) e o número total de injeções acumuladas no equipamento. Abaixo (Tabela 03) pode-se observar o detalhamento das injeções realizadas na avaliação da performance do CL7. Esta avaliação foi efetuada com base em 1088 injeções, realizadas entre os meses de março e novembro de 2012.

Tabela 03 - Número de injeções por mês e acumuladas no CL7

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Final
Mensal	0	72	205	304	150	156	43	114	44	
Acumulada	0	72	277	581	731	887	930	1044	1088	1088

Como o CL3 não possuía um dispositivo de registro de injeções, o levantamento do número de injeções efetuadas entre uma verificação e outra (injeções mensais) e o número total de injeções acumuladas foi realizado manualmente, dado a dado, no sistema de arquivos do equipamento.

Abaixo (Tabela 04), podemos destacar que a avaliação da performance do CL3 foi efetuada com base no total de 390 injeções, efetuadas no período de março a novembro de 2012.

Tabela 04 - Número de injeções por mês e acumuladas no CL3

	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Final
Mensal	0	41	20	39	21	21	20	122	106	
Acumulada	0	41	61	100	121	142	162	284	390	390

4.3 OBTENÇÃO DOS DADOS ATRAVÉS DAS INJEÇÕES

Após o preparo de uma solução (“Mix”) contendo metronidazol e antraceno, foram efetuadas injeções em quintuplicata dos volumes de 5, 10 e 20 μ L em cada CL, com as respectivas colunas cromatográficas já submetidas à verificação inicial. As áreas e os parâmetros de adequação do sistema referentes ao pico cromatográfico do antraceno foram determinados em cada equipamento.

As áreas e os demais parâmetros de adequação do sistema referente ao pico do antraceno, para cada um dos volumes injetados em cada equipamento, foram determinados ao longo de nove avaliações entre março e novembro de 2012.

Ao longo do estudo, outros testes de verificação dos cromatógrafos que fazem parte da qualificação operacional, tais como: precisão do injetor; repetitividade do fluxo; linearidade do injetor e do detector; arraste do injetor e variação da resposta, foram efetuados em cada avaliação mensal e foram considerados conformes, segundo os parâmetros do POP 65.3110.044.

As figuras 10 e 11 referem-se aos cromatogramas obtidos nos equipamentos CL7 e CL3, respectivamente.

Figura 10 – Cromatograma da solução “mix”, obtido no CL7 com detector UV-Vis, solvente acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 μ m, 150 mm x 3,9 mm); FM: água 45:55 ACN grau CLAE; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 μ L, detecção a 251nm.

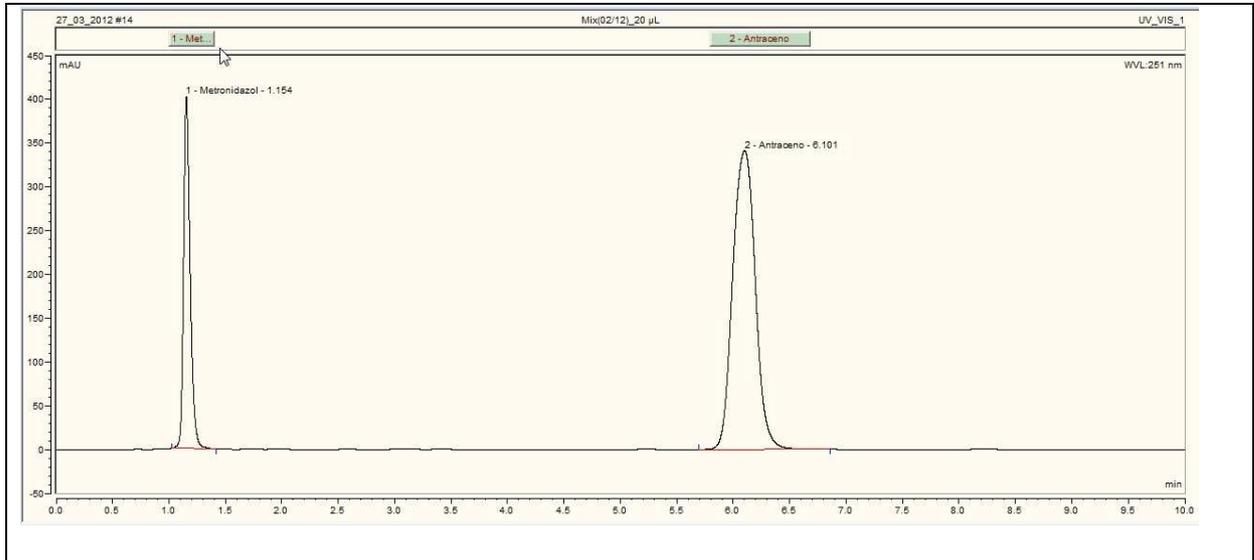
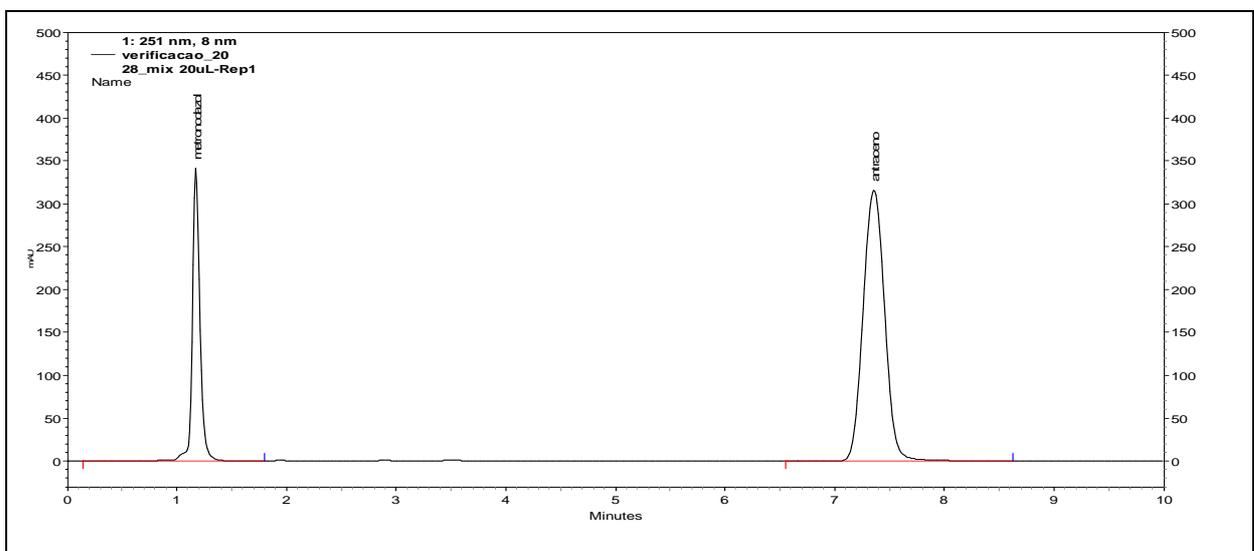


Figura 11 – Cromatograma da solução “mix”, obtido no CL3 com detector UV-Vis (DAD), solvente acetonitrila. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C8 (4 μ m, 150 mm x 3,9 mm); FM: água 45:55 ACN grau CLAE; temperatura 30° C; fluxo 1,0mL/min; volume de injeção de 10 μ L, detecção a 251nm.



4.4 AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA QUE PODERÃO SERVIR PARA GERAR GRÁFICOS DE CONTROLE DOS EQUIPAMENTOS CL

4.4.1 Avaliação do parâmetro fator de retenção

Os dados do parâmetro fator de retenção (K) do antraceno obtidos durante o período do trabalho nos CL7 e CL3 podem ser observados abaixo, através das tabelas 05 e 06, respectivamente.

Tabela 05 - Valores de fator de retenção do antraceno obtidos no CL7.

Volume (µL)	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
5	5,13	5,06	4,96	5,08	5,10	5,18	5,02	4,86	4,91
DPR (%)	0,09	0,41	0,18	0,22	0,64	0,09	0,23	0,62	0,27
10	5,12	5,05	4,96	5,08	5,06	5,17	5,05	4,93	4,92
DPR (%)	0,09	0,09	0,09	0,14	0,24	0	0,18	0,33	0,11
20	5,10	5,03	4,95	5,04	5,04	5,15	5,04	4,93	4,88
DPR (%)	0	0,11	0,09	0,09	0,11	0	0,11	0,14	0,11

Tabela 06 - Valores de fator de retenção do antraceno obtidos no CL3.

Volume (µL)	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
5	8,26	8,81	8,43	8,96	7,98	8,23	8,16	7,97	8,03
DPR (%)	0,13	0,19	0,47	0,08	0,21	0,11	0,10	0,06	0,11
10	8,24	8,78	8,34	8,86	7,99	8,21	8,16	7,96	8,01
DPR (%)	0,05	0,15	0,20	0,57	0,11	0,11	0,10	0,07	0,11
20	8,22	8,73	8,29	8,59	7,97	8,20	8,15	7,93	8,05
DPR (%)	0,16	0,16	0,23	2,15	0	0,07	0,13	0,06	0,53

Foram determinadas as médias, os DPRs (%), o limite superior de controle (LSC) e o limite inferior de controle (LIC) do parâmetro fator de retenção (K) do antraceno para cada um dos três volumes de injeção. O LSC e o LIC foram obtidos aplicando-se a fórmula a seguir:

$$LSC = \mu + \frac{3\sigma}{\sqrt{N}} \text{ e } LIC = \mu - \frac{3\sigma}{\sqrt{N}}$$

onde:

μ = Média dos resultados obtidos.

σ = Desvio padrão dos resultados obtidos.

N = Número total de replicatas.

Foi determinada, ainda, a média total (Md geral) e os valores máximo e mínimo de todas as 27 medições obtidas em cada CL. Seguem, abaixo, as tabelas contendo os valores relativos ao CL7 (Tabela 07) e ao CL3 (Tabela 08).

Tabela 07 - Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral, valores máximo e mínimo relativos a K do antraceno, a partir dos dados da tabela 05, referentes ao CL7.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC	Máximo	Mínimo
	Média	desv.pad	DPR (%)				
5	5,03	0,1059	2,10	5,18	4,89		
10	5,04	0,0853	1,69	5,15	4,92		
20	5,02	0,0845	1,68	5,13	4,90		
Md geral	5,03					5,18	4,86

Md geral: média geral dos 27 dados

Tabela 08 - Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral, valores máximo e mínimo relativos a K do antraceno, a partir dos dados da tabela 06, referentes ao CL3.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC	Máximo	Mínimo
	Média	desv.pad	DPR (%)				
5	8,31	0,3573	4,30	8,79	7,84		
10	8,28	0,3298	3,98	8,73	7,84		
20	8,24	0,2693	3,27	8,60	7,88		
Md geral	8,29					8,96	7,93

Md geral: média geral de todos os dados

A partir dos dados das tabelas 05 e 07 foi possível gerar um gráfico de controle que correlaciona “avaliação mensal X fator de retenção do antraceno”, considerando

os valores máximo (5,18) e mínimo (4,86) como os limites referentes aos três volumes injetados no CL7 (Figura 12).

Da mesma forma, com base nos dados das tabelas 06 e 08, foi possível gerar o gráfico de controle para o parâmetro retenção (K) do antraceno, considerando os valores máximo (8,96) e mínimo (7,93) como os limites referentes aos três volumes de injeções no CL3 (Figura 13).

Figura 12 - Avaliações mensais (março a novembro) versus retenção obtida no CL7, considerando-se o valor máximo (5,18) e mínimo (4,86).

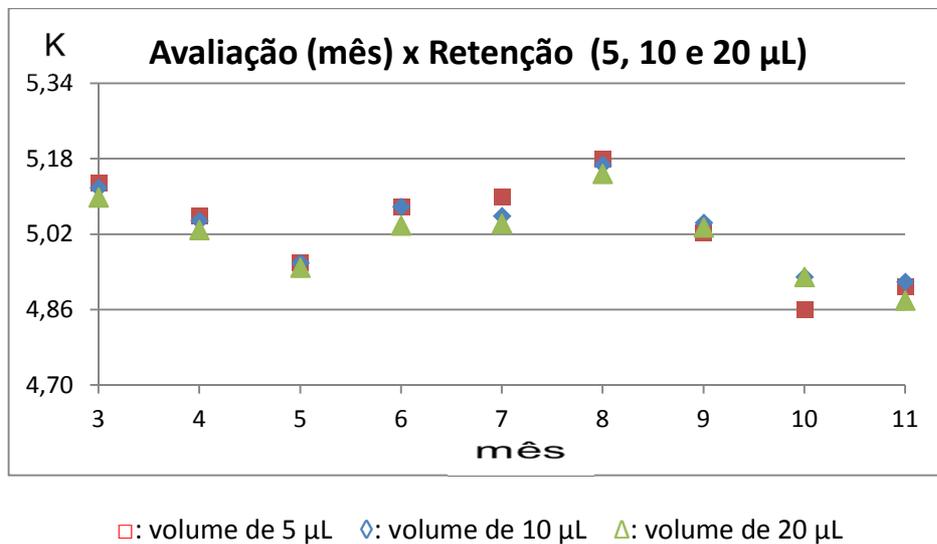
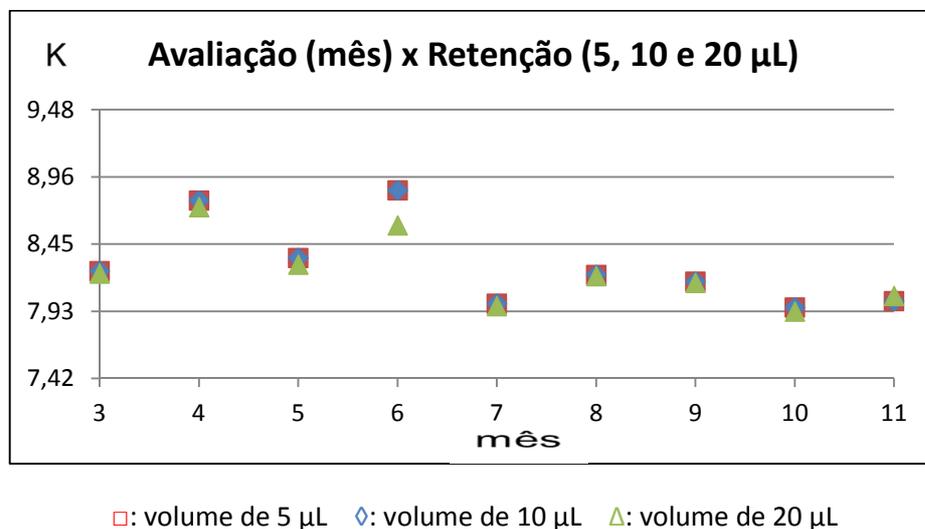


Figura 13 - Avaliações mensais (março a novembro) versus retenção obtida no CL3, considerando-se o valor máximo (8,96) e mínimo (7,93).



Comparando-se as amplitudes (do parâmetro fator de retenção K), obtidas durante o estudo em cada equipamento, foi possível observar que a amplitude observada no CL3 ($8,96 - 7,93 = 1,03$) foi, aproximadamente, 3,2 vezes maior que a amplitude nas avaliações do CL7 ($5,18 - 4,86 = 0,32$), sugerindo, possivelmente, uma pior performance ou desempenho do primeiro CL, para este parâmetro.

A avaliação destes dados, quanto a repetibilidade, sugere que gráficos de controle do parâmetro fator de retenção possa auxiliar na avaliação da performance de cromatógrafos a líquido.

Com base nas tabelas 03, 05 e 07 foi possível gerar um gráfico de controle, correlacionando o número de injeções acumuladas versus o parâmetro K do antraceno. A figura 14 mostra o gráfico onde a média (5,04), o LSC (5,15), LIC (4,92) e se refere aos dados obtidos com o volume de injeção de 10 µL no CL7.

Do mesmo modo, com base nas tabelas 04, 06 e 08, foi gerado um gráfico de controle semelhante para o CL3 (Figura 15): Média= 8,28; LSC= 8,73 e LIC= 7,84, para um volume de injeção de 10 µL.

Figura 14 - Injeções acumuladas (março a novembro) versus K do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (5,04), o LSC (5,15) e o LIC (4,92).

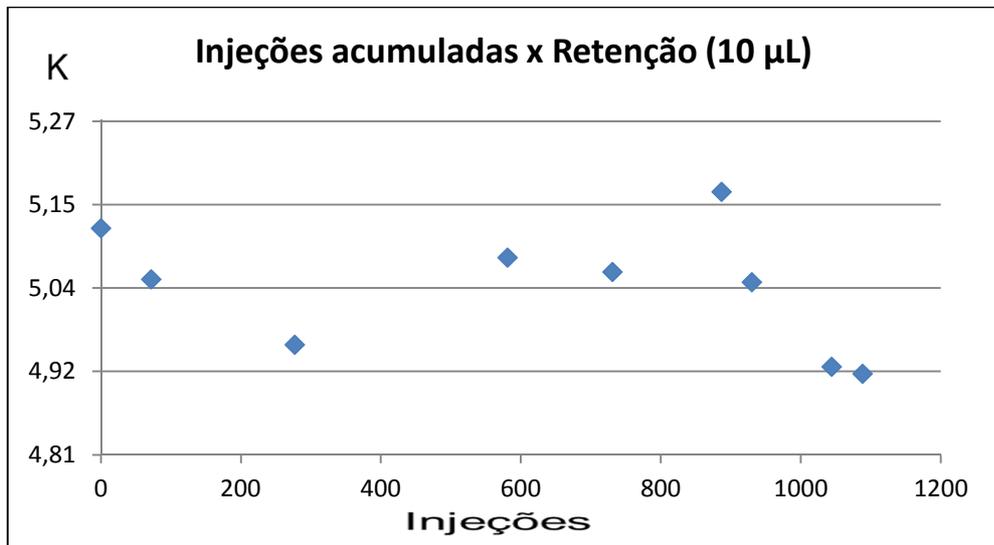
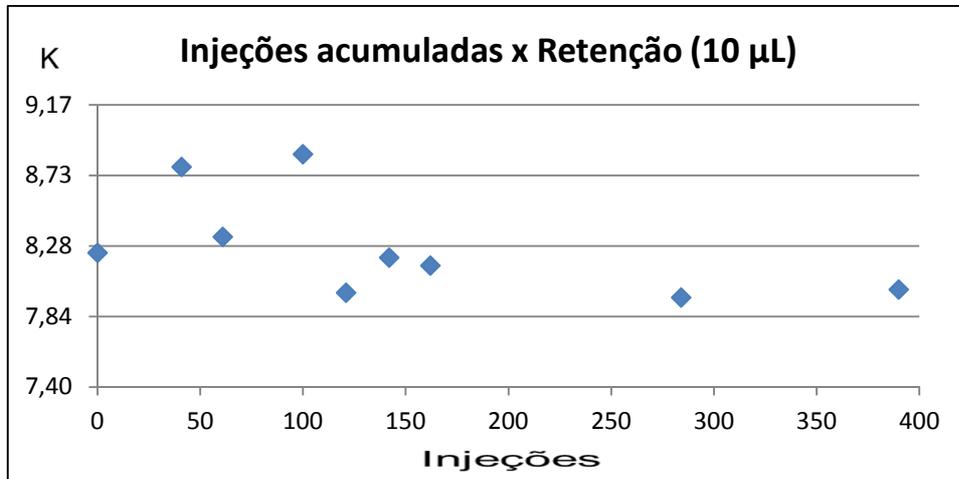


Figura 15 - Injeções acumuladas (março a novembro) versus K do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (8,28), o LSC (8,73) e o LIC (7,84).



Observou-se na figura 14 (CL7) que o K da 6ª avaliação (agosto) ficou acima do LSC. Não foi possível fazer associações, visto que se tratava de uma avaliação isolada do parâmetro retenção. As avaliações subsequentes situaram-se entre os valores de LSC e LIC, sugerindo um retorno a normalidade.

Observou-se na figura 15 (CL3) que os valores de K na 2ª e na 4ª avaliações (abril e junho), também ficaram acima do LSC. Essas avaliações tratavam-se, portanto, de avaliações intercaladas e não conformes. Foi observado que este fato ocorreu na fase em que o equipamento ficou sem ser utilizado, por um período relativamente longo (primeiro semestre de 2012), conforme consta da Tabela 4. Talvez os equipamentos que trabalham normalmente sob fluxo contínuo, não devessem ficar sem uso por longos períodos de tempo, como o ocorrido. As avaliações subsequentes voltaram a se situar entre os LSC e LIC, sugerindo o retorno à normalidade.

Mais uma vez a amplitude das avaliações do CL3 ($8,73 - 7,84 = 0,89$) para o parâmetro K durante de trabalho (para injeções de 10 μL) foi superior àquela do CL7 ($5,15 - 4,92 = 0,23$). Observou-se uma variação de aproximadamente 3,9 vezes.

4.4.2 Avaliação do parâmetro assimetria (FC)

Os valores do parâmetro assimetria do antraceno obtidos durante o período do trabalho no CL7 e CL3, estão demonstrados nas tabelas 09 e 10, respectivamente.

Tabela 09 - Valores de assimetria do antraceno obtidos no CL7

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	1,13	1,15	1,14	1,10	1,17	1,18	1,15	1,17	1,17
DPR (%)	0,005	0	0,39	0,41	0,97	0,46	0,47	0,85	0,85
10	1,13	1,15	1,14	1,10	1,18	1,17	1,16	1,16	1,15
DPR (%)	0	0,48	0	0	0,47	0,6	0,47	0,72	0,48
20	1,04	1,06	1,05	1,04	1,06	1,06	1,05	1,05	1,06
DPR (%)	0,005	0,42	0,52	0,43	0,42	0	0,43	0,67	0

Tabela 10 - Valores de assimetria do antraceno obtidos no CL3

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	1,08	1,10	1,09	1,11	1,11	1,12	1,19	1,09	1,09
DPR (%)	2,30	2,13	2,09	1,96	2,80	2,31	1,38	2,73	2,19
10	1,08	1,10	1,09	1,11	1,12	1,10	1,22	1,10	1,09
DPR (%)	1,78	1,66	2,29	1,73	2,25	1,93	1,16	1,82	0,92
20	1,05	1,05	1,07	1,07	1,07	1,06	1,15	1,07	1,06
DPR (%)	1,45	1,28	2,06	2,06	1,62	1,03	1,31	1,87	1,44

Para cada volume de injeção foi determinada a respectiva média, DPR (%) e os limites superior (LSC) e inferior de controle (LIC) do parâmetro FC do antraceno. Foi determinada, ainda, a média geral (Md geral) e os valores máximo e mínimo dentre os 27 obtidos, durante o período de trabalho, em cada equipamento. Abaixo, nas tabelas 11 e 12, os valores obtidos no CL7 e CL3, respectivamente.

Tabela 11 - Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral e valores máximo e mínimo, relativos à assimetria do antraceno, a partir dos dados da tabela 09 no CL7.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC	Máximo	Mínimo
	Média	desv.pad	DPR (%)				
5	1,15	0,0262	2,27	1,19	1,12		
10	1,15	0,0228	1,99	1,18	1,12		
20	1,05	0,0085	0,81	1,06	1,04		
Md geral	1,12					1,18	1,04

Md geral: média geral de todos os dados

Tabela 12 - Médias obtidas, limites superior e inferior de controle (LSC e LIC), média geral e valores máximo e mínimo, relativos a assimetria do antraceno, a partir dos dados da tabela 10 no CL3.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC	Máximo	Mínimo
	Média	desv.pad	DPR (%)				
5	1,11	0,0330	2,97	1,15	1,06		
10	1,11	0,0421	3,78	1,17	1,06		
20	1,07	0,0303	2,83	1,11	1,03		
Md geral	1,10					1,22	1,05

Md geral: média geral de todos os dados

Com base nas tabelas 09 e 11 (CL7), foi possível gerar um gráfico de controle que relaciona as avaliações e o FC do antraceno, considerando os valores máximo (1,18) e mínimo (1,04) como os limites referentes aos três volumes de injeções no CL7 (Figura 16). Do mesmo modo, com base nas tabelas 10 e 12 (CL3), foi possível gerar um gráfico de controle que relaciona as avaliações e o FC do antraceno, considerando os valores máximo (1,33) e mínimo (1,05), como os limites referentes aos três volumes de injeções no CL3 (Figura 17).

Figura 16 - Avaliações mensais (março a novembro) e o FC do antraceno obtidas no CL7. Considerando o máximo (1,18) e o mínimo (1,04).

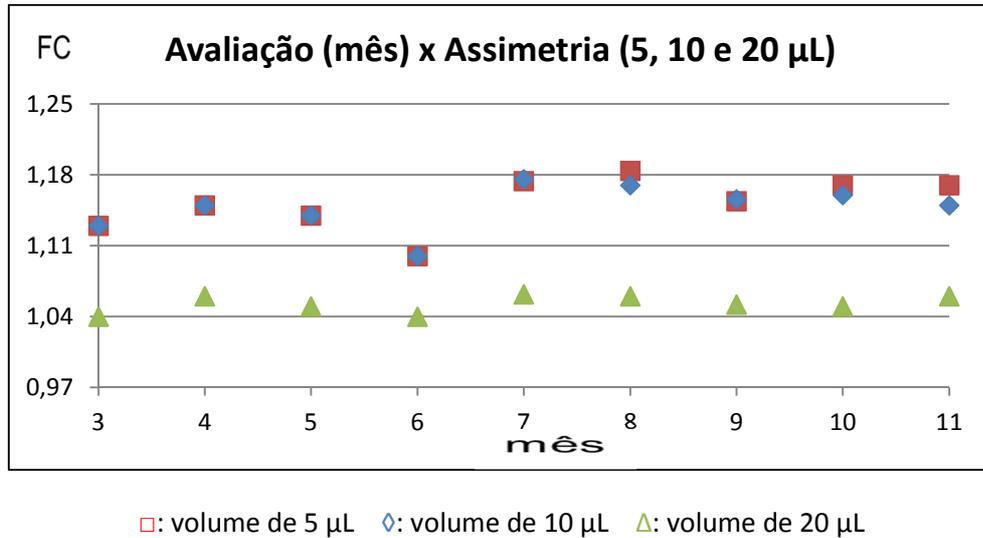
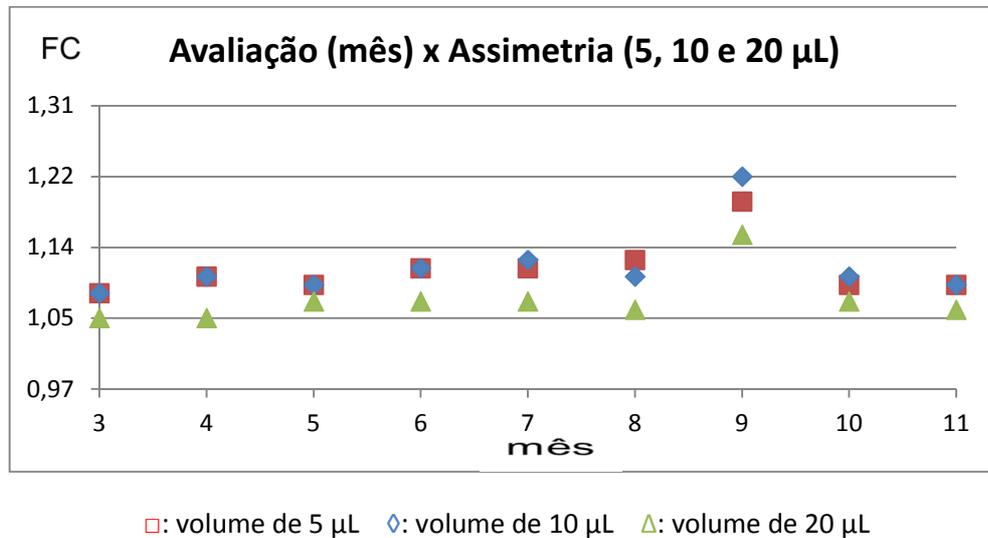


Figura 17 – Avaliações mensais (março a novembro) e o FC do antraceno obtidas no CL3. Considerando o valor máximo (1,22) e o mínimo (1,05).



Observou-se que a amplitude das avaliações do CL3 ($1,33 - 1,05 = 0,28$), durante o período do estudo, foi de 2 vezes ($0,28/0,14$) maior que a amplitude nas avaliações do CL7 ($1,18 - 1,04 = 0,14$), embora ambos os resultados estejam abaixo do limite máximo aceitável e bem semelhantes, os dados indicam uma pior performance ou desempenho do CL3 para este parâmetro. Os dados ora apresentados indicam que gráficos de controle deste parâmetro também possam ser utilizados para a avaliação do desempenho de cromatógrafos a líquido.

Com base nas tabelas 03, 09 e 11, foi possível gerar gráficos de controle que relacionassem o número de injeções acumuladas e o FC do antraceno, considerando a média (1,15) e os LSC (1,18) e LIC (1,12) referente a um determinado volume de injeção (10 μ L) no CL7 (Figura 18). Do mesmo modo, foi possível, com base nas tabelas 04, 10 e 12, gerar um gráfico de controle que relacionasse o número de injeções acumuladas e o FC do antraceno, considerando a média (1,13) e os LSC (1,22) e LIC (1,04), referente a um determinado volume de injeção (10 μ L) no CL3 (Figura 19).

Figura 18 - Injeções acumuladas (março a novembro) versus FC do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (1,15), o LSC (1,18) e o LIC (1,12).

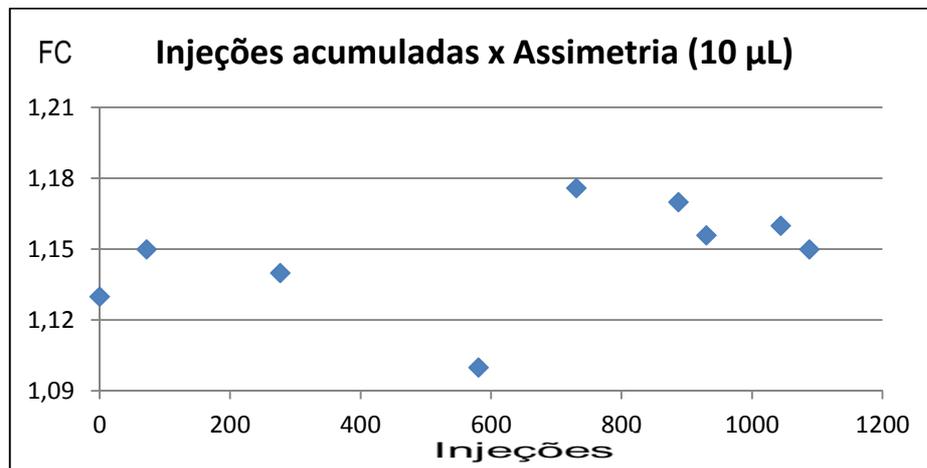
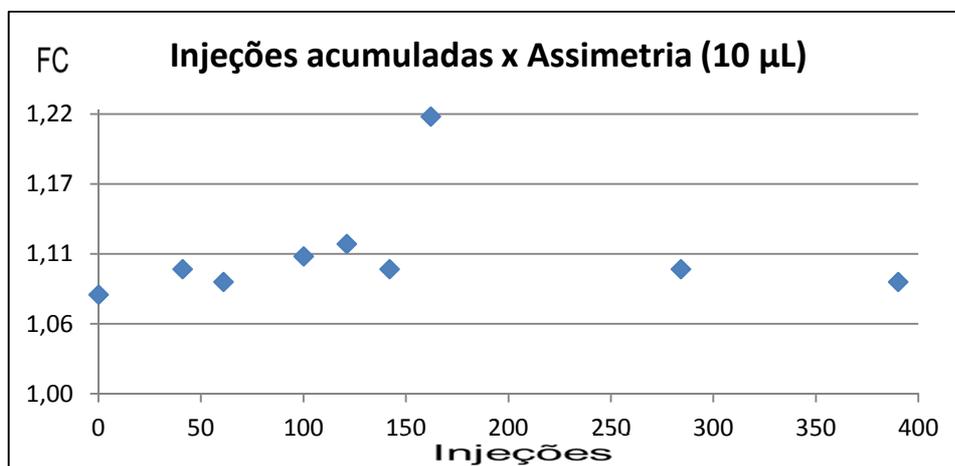


Figura 19 - Injeções acumuladas (março a novembro) versus FC do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (1,11), o LSC (1,17) e o LIC (1,06).



Observou-se no CL7 que a assimetria na 4ª avaliação (junho) ficou abaixo do LIC (Figura 18) e no CL3, a assimetria na 7ª avaliação (setembro) ficou acima do LSC (Figura 19). Tratavam-se de variações individuais do parâmetro assimetria, em determinado momento. As avaliações subsequentes voltaram a se situar entre os LSC e LIC, sugerindo um retorno as condições de normalidade.

Pode-se verificar que a amplitude das avaliações do CL3 ($1,17 - 1,06 = 0,11$), durante o período de trabalho (volume de injeção de 10 μL), foi 1,8 vezes maior do que aquela observada para o CL7 ($1,18 - 1,12 = 0,06$).

4.4.3 Avaliação da medida da área

As tabelas do monitoramento das medidas da área do sinal do antraceno obtidas durante o trabalho no CL7 e CL3 podem ser observadas abaixo (Tabelas 13 e 14 respectivamente).

Tabela 13 - Monitoramento das medidas da área do antraceno obtidas no CL7

Área	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (μL)	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5	20,153	20,453	20,313	20,303	20,346	20,416	20,420	20,587	20,512
DPR (%)	0,06	0,13	0,1	0,19	0,08	0,11	0,09	0,28	0,14
10	39,912	40,527	40,288	40,313	40,338	40,531	40,499	40,725	40,717
DPR (%)	0,07	0,06	0,06	0,03	0,06	0,09	0,04	0,06	0,07
20	78,819	80,243	79,809	79,786	79,913	80,230	80,167	80,543	80,683
DPR (%)	0,07	0,04	0,02	0,08	0,04	0,05	0,05	0,03	0,02

Tabela 14 - Monitoramento das medidas da área do antraceno obtidas no CL3

Área	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (μL)	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5	1077876	1095078	1075788	1049336	1089374	1080835	1081269	1094029	1085334
DPR(%)	0,19	0,18	0,20	0,27	0,25	0,33	0,33	1,10	0,32
10	2172397	2200274	2180031	2129867	2187036	2184821	2165284	2180680	2178953
DPR(%)	0,30	0,73	0,17	0,19	0,09	0,28	0,16	0,13	0,18
20	4294298	4345714	4329491	4227890	4337713	4339928	4298179	4317300	4325442
DPR(%)	0,21	0,38	0,17	0,68	0,72	0,07	0,61	0,26	0,03

Para cada volume de injeção foi determinada a média, o DPR (%) e os limites superior (LSC) e inferior (LIC) de controle da medida da área do antraceno para o CL7 (Tabela 15) e para o CL3 (Tabela 16).

Tabela 15 – Áreas médias, LSC e LIC obtidos durante o trabalho no CL7, conforme a tabela 13.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC
	Média	desv.pad	DPR (%)		
5	20,389	0,1279	0,63	20,561	20,217
10	40,428	0,2511	0,62	40,765	40,091
20	80,021	0,5455	0,68	80,753	79,290

Tabela 16 – Áreas médias, LSC e LIC obtidos durante o trabalho no CL3, conforme a tabela 14.

Volume (μL)	Final			LSC	LIC
	Média	desv.pad	DPR (%)		
5	1080991	13677	1,27	1099340	1062641
10	2175482	19651	0,90	2201847	2149118
20	4312884	36511	0,85	4361868	4263900

Nesta avaliação, não coube determinar a média geral (Md geral), os valores máximo e mínimo (dos 27 valores) da medida de área, durante o trabalho nos CL3 e no CL7, por ser a área uma medida proporcional à concentração do analito ou, neste caso, ao volume de injeção.

Com o objetivo de avaliar o perfil da variação da área referente a um determinado volume de injeção, foi possível com base na tabela 13, gerar um gráfico (Figura 20) que relacionasse cada avaliação com as respectivas medidas da área do antraceno no CL7. Do mesmo modo, com base na tabela 14, foi possível gerar um gráfico (Figura 21) semelhante para o CL3.

Figura 20 - Relação entre as avaliações mensais (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL7.

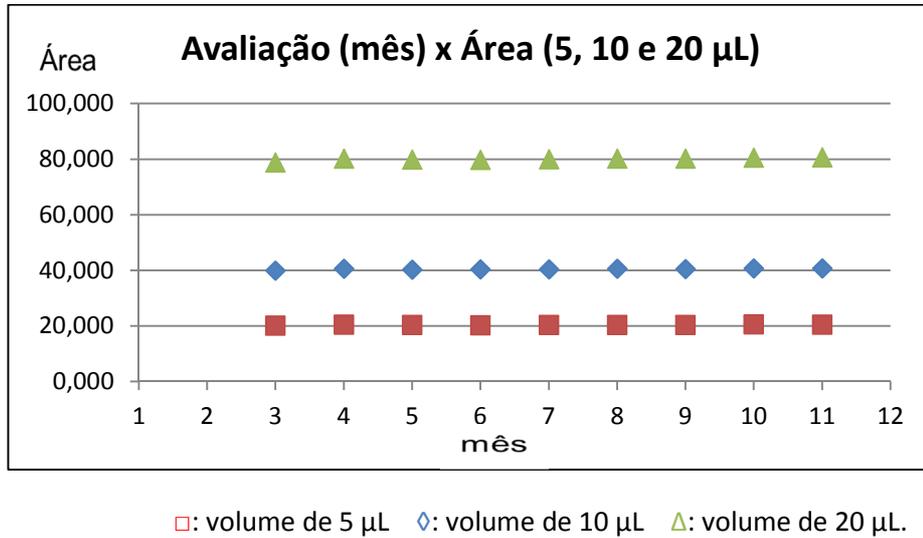
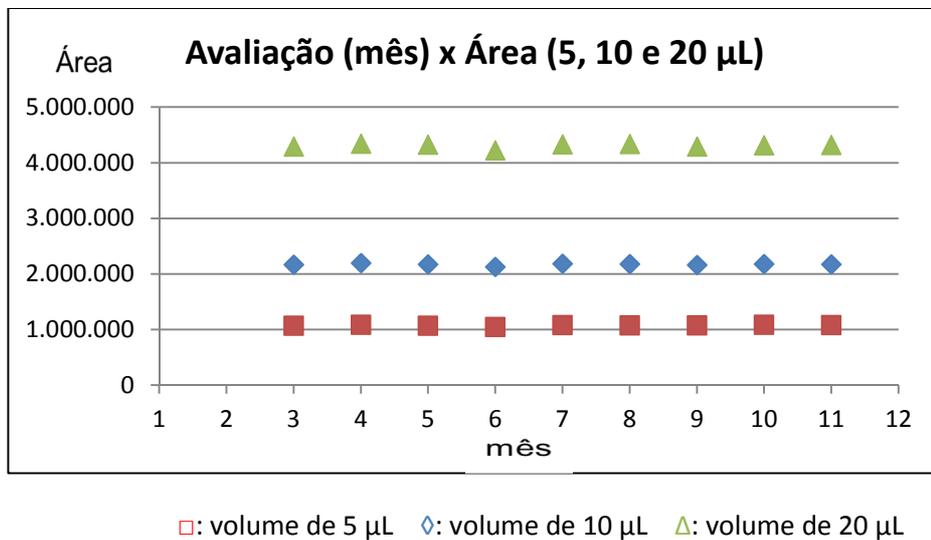


Figura 21 - Relação entre as avaliações mensais (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL3.



Igualmente foi possível, com base nas tabelas 03, 13 e 15, gerar um gráfico de controle que relacionasse o número de injeções acumuladas e a medida da área do antraceno, considerando a média (40,428) e os LSC (40,765) e LIC (40,091), referentes ao volume de injeção de 10 µL, no CL7 (Figura 22). Do mesmo modo, foi possível com base nas tabelas 04, 14 e 16, gerar um gráfico de controle que relacionasse o número de injeções acumuladas e a medida da área do antraceno,

considerando a média (2181648) e os LSC (2217733) e LIC (2145563) referente ao mesmo volume de injeção (10 µL) no CL3 (Figura 23).

Figura 22 - Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL7. Considerando a média (40,428), o LSC (40,765) e o LIC (40,091).

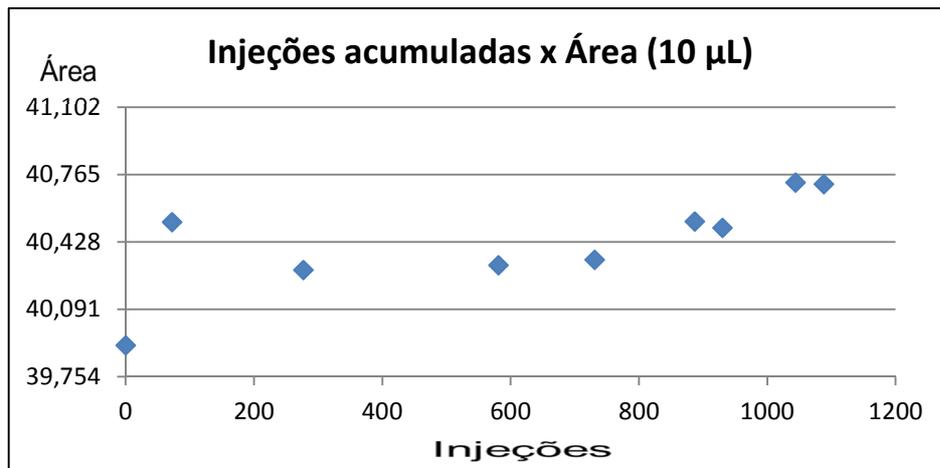
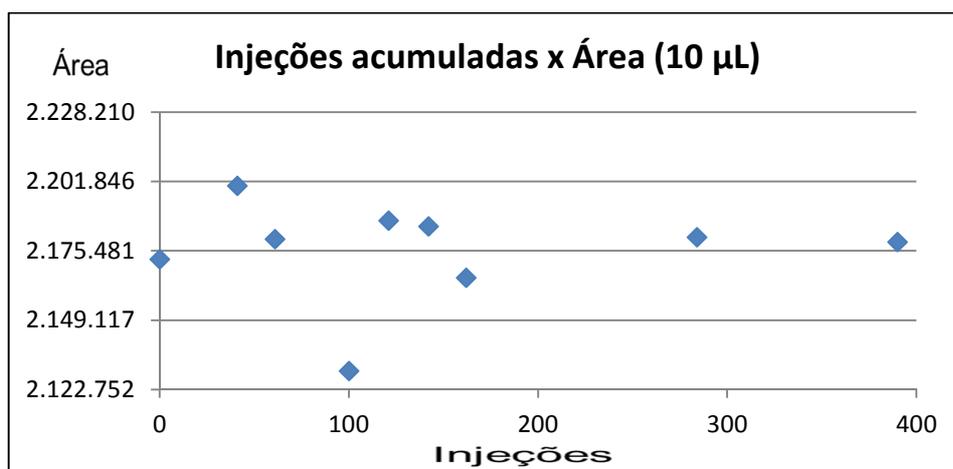


Figura 23 - Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e a medida da área do antraceno obtidos no CL3. Considerando a média (2175482), o LSC (2201847) e o LIC (2149118).



Observa-se, no CL7 que a medida da área na avaliação de março (1ª avaliação) ficou abaixo do LIC (Figura 22) e no CL3, que a medida da área, na

avaliação de junho (4ª avaliação), ficou abaixo do LIC (Figura 23, abaixo), porém tratava-se de variações individuais da área em determinado momento. As avaliações subsequentes voltaram a se situar entre os LSC e LIC.

4.4.4 Avaliação do custo/benefício entre a qualificação anual e o monitoramento do desempenho dos CL, através de gráficos de controle.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o monitoramento dos CL através de gráficos de controle de K, FC e área, quando comparado às qualificações anuais, é mais rápido e poderá gerar economia. Fornecem, ainda, informações mais precisas, quanto a performance ou desempenho do equipamento naquele instante.

A qualificação operacional, com periodicidade anual, realizada conforme o POP interno do INCQS gera economia (o preço médio do suporte técnico de empresas é de cerca de dois mil dólares por equipamento), porém trata-se de um procedimento que dura em torno de 5 a 7 dias. O equipamento fica, portanto, fora de uso durante este período. Já o monitoramento através de gráficos de controle requer cerca de 3 a 4 horas, com periodicidade mensal, podendo ser efetuada no período da noite, evitando interferir na rotina do laboratório.

Através dos resultados obtidos, recomenda-se que a periodicidade de monitoramento nestes dois cromatógrafos (CL7 e CL3) no qual já são feitas avaliações mensais poderia ser estendida para cada 3 meses.

O monitoramento dos CL, através destes gráficos de controle, permite avaliar a performance em função de números de injeções acumuladas para um determinado equipamento, que é o fator mais importante para a relação entre o desempenho e o desgaste das peças, do que o fator temporal, conforme especificada na qualificação operacional (anual).

Para elaboração de um procedimento operacional (POP) poderiam ser usados os LCS e LIC específicos, para cada volume, para os gráficos que relacionam os parâmetros retenção, assimetria e área, em conjunto com os limites máximo e mínimo, para os parâmetros retenção e assimetria, que não dependem do volume de injeção.

Avaliando-se os gráficos de controle, foi possível verificar uma boa performance do CL7 e do CL3 no que concerne aos parâmetros analisados, em

relação ao número de injeções acumuladas, quando comparada às condições iniciais obtidas. Entretanto, no CL7, o número de injeções (1088) foi 2,8 vezes (1088/390) maior, durante o estudo em relação ao CL3 (390).

Os dados obtidos sugerem também, que o CL7, por ser um equipamento relativamente novo (instalação em 2010) comparado ao CL3 (instalação em 1999), não necessitaria de qualificações operacionais com periodicidade anual.

4.5 AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS PARÂMETROS QUE PODERÃO SERVIR COMO ESTIMATIVA DO DESGASTE DOS CL

Na segunda etapa deste trabalho, foram feitas avaliações iniciais dos potenciais parâmetros de adequação do sistema que poderiam servir para se estimar o desgaste de cada equipamento. Os resultados do trabalho evidenciaram que a eficiência e a resolução são adequadas a este fim. Entretanto, para que essas avaliações sejam conclusivas, faz-se necessário a obtenção de mais dados. Estes poderiam ser obtidos diminuindo-se a periodicidade das avaliações dos equipamentos. Acreditamos que avaliações trimestrais, realizadas durante um período de dois anos, seriam suficientes para a complementação destes dados. Um período de estudo mais amplo, certamente, iria contribuir para a elaboração de um “programa de manutenção preventiva” dos CL do INCQS, ainda inexistente.

A manutenção preventiva, além de evitar perda de tempo devido a paradas para manutenções corretivas, evita ainda o consumo de verbas e perda de tempo com os “trâmites legais entre o fabricante e o laboratório” que consome muito tempo até a efetiva finalização do reparo do equipamento. Finalmente, as manutenções preventivas têm a vantagem de aumentar a vida útil dos equipamentos e, principalmente, mantê-lo trabalhando sempre nas condições ótimas.

Programas de manutenção preventiva de equipamentos utilizados em ensaios é uma exigência de todos os protocolos referentes à qualidade (ANALYTICAL, 2012; BRASIL, 2012; OMS, 2011).

O programa de manutenção preventiva, através do monitoramento da eficiência (número de pratos teóricos) e da resolução em função de números de injeções acumuladas para um determinado cromatógrafo é o fator mais coerente para avaliar o desgaste das peças daquele equipamento do que o fator temporal

arbitrário (anual, por exemplo) para todos os equipamentos, o que acarretaria, inclusive, um custo desnecessário.

4.5.1 Número de pratos teóricos ou eficiência (N)

As tabelas 17 e 18 contêm os valores obtidos para o número de pratos teóricos do antraceno durante o trabalho no CL7 e no CL3, respectivamente.

Tabela 17 - Valores obtidos para eficiência do antraceno no CL7.

Pratos teóricos	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	11094	10947	10904	10900	10958	10880	10796	10857	10655
DPR (%)	0,21	0,49	0,49	1,09	0,31	0,18	0,33	3,13	1,03
10	9147	9033	9005	9070	9006	9003	8943	8813	8793
DPR (%)	0,39	0,34	0,13	1,39	0,82	0,34	0,33	0,51	0,6
20	4870	4857	4844	5017	4785	4813	4763	4720	4786
DPR (%)	0,07	0,44	0,35	1,18	0,51	0,40	0,24	1,12	0,27

Tabela 18 - Valores obtidos para eficiência do antraceno no CL3.

Pratos teóricos	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	11850	12289	11828	11890	11616	11818	7872	9740	9579
DPR (%)	3,36	1,38	2,40	2,80	1,86	0,79	2,72	2,62	2,19
10	10489	10550	10293	10619	10079	10249	6993	9030	8593
DPR (%)	2,13	2,16	2,86	1,00	3,31	2,06	2,56	2,86	0,75
20	6618	6739	6751	6725	6327	6531	4942	6038	5910
DPR (%)	2,62	2,19	0,59	1,54	0,45	1,34	1,83	1,83	1,52

A partir dos dados contidos nas tabelas 17 e 18 foi possível gerar gráficos que relacionassem cada avaliação com o respectivo resultado obtido. Levou-se em consideração os três volumes de injeção. A figura 24 contém os dados obtidos no CL7 e a figura 25 contém os dados do CL3.

Figura 24 - Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de N (número de pratos teóricos) para o antraceno, obtidos no CL7.

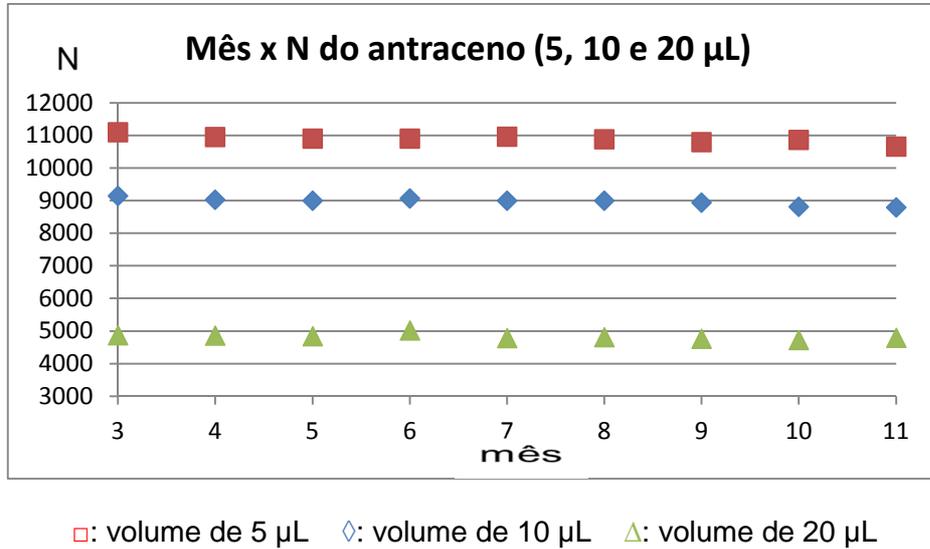
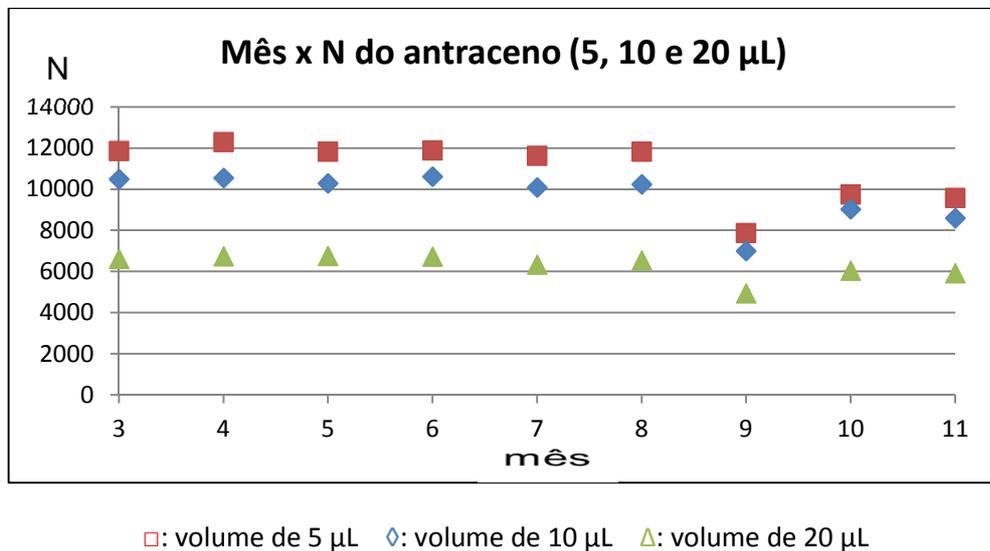


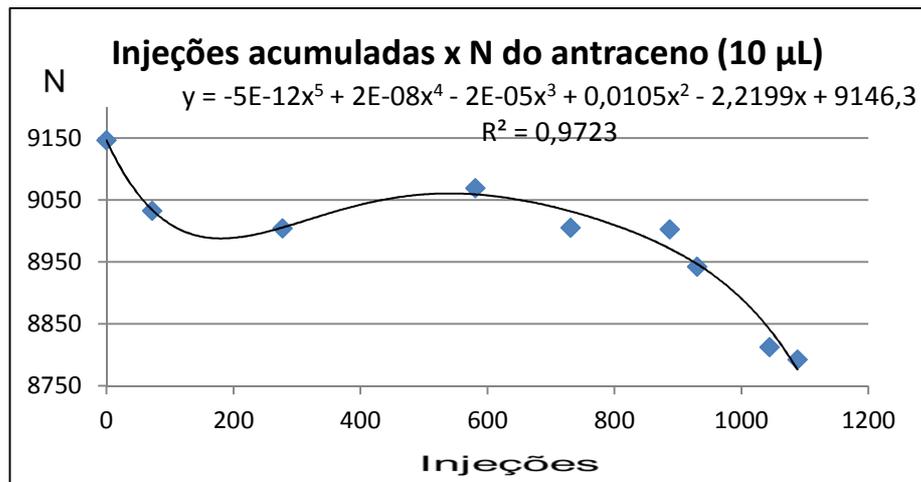
Figura 25 - Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de N (número de pratos teóricos) para o antraceno, obtidos no CL3.



Analisando as figuras 24 e 25, observou-se que houve uma tendência de diminuição de N ao longo do período de trabalho tanto no CL7, quanto no CL3, independentemente do volume de injeção avaliado.

Foi possível com base nas tabelas 03 e 17 (referentes ao CL7) gerar um gráfico que relacionasse o número de injeções acumuladas e o parâmetro N do antraceno, para um volume de injeção de 10 µL (Figura 26).

Figura 26 - Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e N do antraceno obtidos no CL7. Gráfico gerado no MS/Excel 2010.



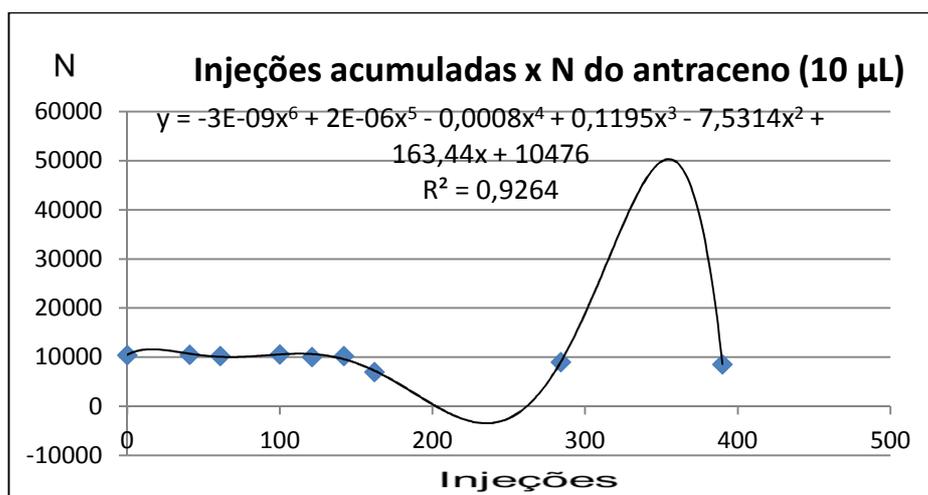
Através da figura acima, foi possível observar que a linha de tendência/regressão da diminuição da eficiência do sistema durante o período do trabalho no CL7 obteve-se um melhor coeficiente de determinação (R^2 próximo de 1), conforme a regressão do tipo polinomial de ordem 5, não apresentando diferença significativa em relação à de ordem 6, conforme apresentado (a seguir) na tabela 19. A ratificação desta tendência/regressão, aqui detectada, deverá ser realizada posteriormente. A obtenção de pelo menos mais oito medições, com periodicidade trimestral, poderá auxiliar na conclusão final da avaliação deste parâmetro e se esta correlação pode ser significativa.

Tabela 19 - Tipos de regressão entre o número de injeções acumuladas e a eficiência do sistema (número de pratos teóricos do antraceno obtidos ao longo do trabalho no CL7).

Tipo de regressão	Equação	Coef. Deter.
Linear	$y = -0,2208x + 9116,9$	$R^2 = 0,6430$
Exponencial	$y = 9117,6e^{-2E-05x}$	$R^2 = 0,6413$
Polinomial (2ª ord.)	$y = -0,0004x^2 + 0,1779x + 9068,2$	$R^2 = 0,7720$
Polinomial (3ª ord.)	$y = -2E-06x^3 + 0,0023x^2 - 0,9313x + 9122,4$	$R^2 = 0,9495$
Polinomial (4ª ord.)	$y = 2E-09x^4 - 5E-06x^3 + 0,0046x^2 - 1,4283x + 9134,7$	$R^2 = 0,9623$
Polinomial (5ª ord.)	$y = -5E-12x^5 + 2E-08x^4 - 2E-05x^3 + 0,0105x^2 - 2,2199x + 9146,3$	$R^2 = 0,9723$
Polinomial (6ª ord.)	$y = 8E-15x^6 - 3E-11x^5 + 5E-08x^4 - 4E-05x^3 + 0,0144x^2 - 2,5345x + 9149$	$R^2 = 0,9745$

Aplicou-se a mesma metodologia aos dados constantes das tabelas 04 e 18, gerando o respectivo gráfico (Figura 27) que relaciona o número de injeções acumuladas e o parâmetro N do antraceno, referente ao volume de injeção de 10 µL no CL3.

Figura 27 - Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e N do antraceno obtidos no CL3. Gráfico gerado no MS/Excel 2010.



Observou-se que nesta avaliação inicial, conforme a tabela 20 (a seguir), que avalia a linha de tendência/regressão da diminuição do número de pratos teóricos do

sistema durante o trabalho no CL3, e visualizada na figura 20, obteve-se um melhor coeficiente de determinação (R^2 próximos a 1) na regressão do tipo polinomial de ordem 6. É importante observar que, principalmente até a sexta avaliação (agosto), o equipamento foi pouco utilizado. Assim, este resultado pode não ter valor conclusivo. Acreditamos que estes dados/resultados deverão ser reavaliados após a inclusão de novos dados obtidos com a realização de, pelo menos, mais oito medições com periodicidade trimestral, auxiliando assim na conclusão final da avaliação deste parâmetro e se esta correlação pode ser significativa. Idealmente estas novas avaliações deveriam ser realizadas num período em que o equipamento estivesse sendo utilizado rotineiramente.

Tabela 20 - Tipos de regressão entre o número de injeções acumuladas e a eficiência do sistema (número de pratos teóricos do antraceno obtidos no CL3).

Tipo de regressão	Equação	Coef. Deter.
Linear	$y = -5,9044x + 10509$	$R^2 = 0,3528$
Exponencial	$y = 10480e^{-6E-04x}$	$R^2 = 0,3037$
Polinomial (2ª ord.)	$y = 0,0191x^2 - 13,434x + 10940$	$R^2 = 0,4033$
Polinomial (3ª ord.)	$y = 0,0001x^3 - 0,043x^2 - 5,1514x + 10741$	$R^2 = 0,4201$
Polinomial (4ª ord.)	$y = -3E-06x^4 + 0,0028x^3 - 0,6667x^2 + 40,787x + 10234$	$R^2 = 0,5465$
Polinomial (5ª ord.)	$y = -1E-07x^5 + 1E-04x^4 - 0,0266x^3 + 2,6713x^2 - 82,236x + 10561$	$R^2 = 0,7996$
Polinomial (6ª ord.)	$y = -3E-09x^6 + 2E-06x^5 - 0,0008x^4 + 0,1195x^3 - 7,5314x^2 + 163,44x + 10476$	$R^2 = 0,9264$

Foi possível, com base nas tabelas 17 e 18, calcular a variação da eficiência do sistema (N final – N inicial), avaliar a diminuição relativa percentual da eficiência ($\text{variação} \cdot 100 / N$ inicial) do sistema e calcular a variação de N por injeção acumulada ($\text{variação} / \text{número de injeções acumuladas}$) nos CL7 e CL3 (Tabela 21, a seguir).

Tabela 21 - Variação da eficiência do sistema, da diminuição relativa percentual da eficiência e da variação da eficiência por injeção acumulada do antraceno.

CL7	Março	Novembro	Variação	DEf (%)	Ef./inj acum
Eficiência	9147	8793	-354	-3,87	
Inj. acum.	0	1088	1088		-0,325
CL3	Março	Novembro	Variação	DEf (%)	Ef./inj acum
Eficiência	10489	8593	-1896	-18,08	
Inj. acum.	0	390	390		-4,862

DEf: diminuição relativa (%) da eficiencia, Inj. acum.: número de injeções acumuladas, Ef.: eficiência

Com base na tabela 21 foi possível verificar que a queda relativa percentual da eficiência do CL3 foi de aproximadamente 4,7 vezes (-18,08/-3,87) superior à redução relativa percentual da eficiência do CL7, mesmo tendo sido 2,8 vezes maior (1088/390) o número de injeções efetuadas no CL7, em relação ao CL3.

Ainda analisando a tabela 21, percebeu-se que a redução de N no CL3 foi de -4,862 por injeção acumulada. Este valor foi, aproximadamente, 15 vezes superior (-4,862/-0,325) àquela queda da eficiência por injeção acumulada detectada no CL7 (-0,325).

4.5.2 Resolução (R)

As tabelas do monitoramento da resolução do antraceno, obtidas durante o trabalho no CL7 e no CL3, podem ser observadas, respectivamente, a seguir (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22 - Monitoramento de R do antraceno obtida ao longo do trabalho no CL7

Resolução	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	31,00	30,73	30,65	30,76	31,09	30,62	30,39	30,05	29,94
DPR (%)	0,10	0,31	0,29	0,56	0,61	0,22	0,16	1,17	1,30
10	28,36	28,09	28,01	28,33	28,34	28,13	27,96	27,55	27,50
DPR (%)	0,12	0,18	0,05	0,47	0,46	0,22	0,13	0,2	0,40
20	21,87	21,65	21,87	22,29	21,87	21,79	21,64	21,49	21,39
DPR (%)	0,08	0,27	0,17	0,52	0,25	0,22	0,12	0,43	0,35

Tabela 23 - Monitoramento de R do antraceno obtida ao longo do trabalho no CL3

Resolução	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro
Volume (µL)									
5	30,37	31,14	30,09	30,70	28,72	29,47	26,40	27,26	27,61
DPR (%)	1,97	0,55	2,22	3,43	0,59	1,78	2,30	1,30	0,70
10	28,11	29,59	28,92	29,28	27,36	27,85	24,21	26,09	26,08
DPR (%)	2,30	1,60	3,85	1,74	2,62	1,55	2,01	2,02	3,16
20	23,68	23,77	24,34	24,28	22,63	23,64	21,25	22,47	22,70
DPR (%)	1,54	2,93	0,27	2,10	0,32	1,41	0,94	0,50	0,85

Com base nessas tabelas, foi possível gerar gráficos que relacionam as avaliações e as resoluções do antraceno, onde foi levado em consideração os três volumes de injeções no CL7 (Figura 28) e os três volumes de injeções no CL3 (Figura 29).

Figura 28 - Relação entre as avaliações (março a novembro) e valores de R do antraceno obtidos no CL7.

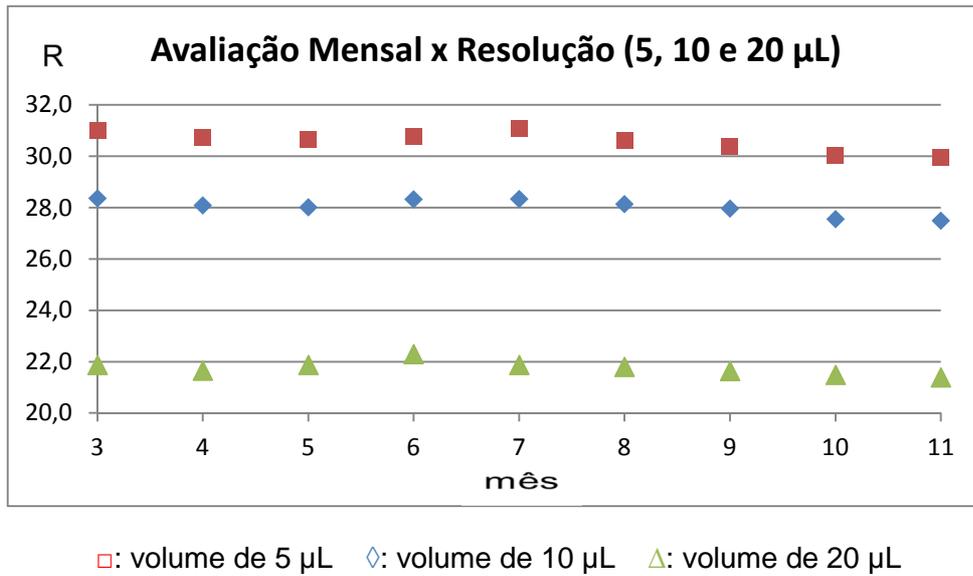
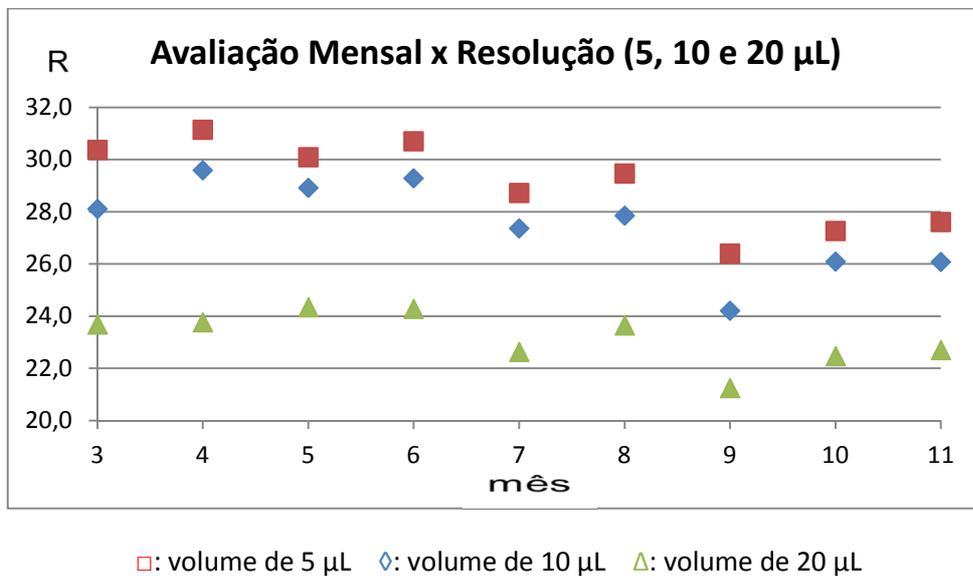


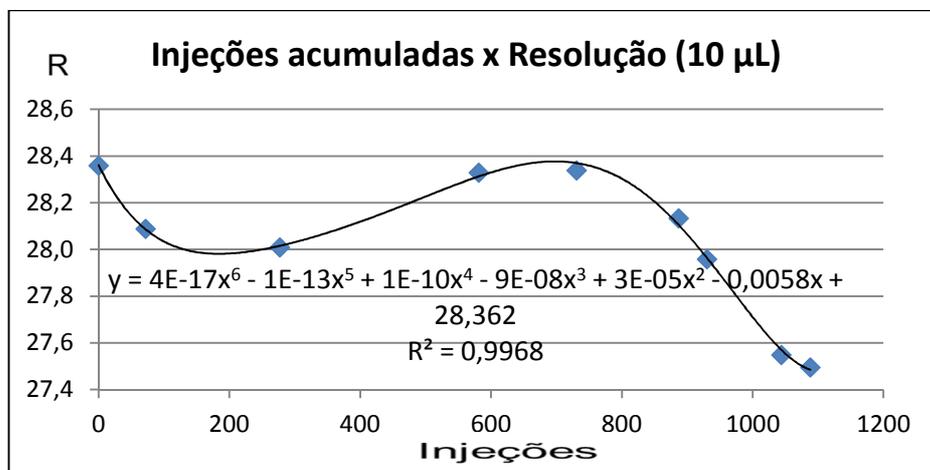
Figura 29 - Relação entre avaliações (março a novembro) e os valores de R do antraceno obtidos no CL3.



Pode-se observar, nas figuras 28 e 29, que houve uma tendência de diminuição de R do antraceno ao longo do trabalho no CL7 e no CL3, independentemente do volume de injeção avaliado.

Da mesma forma, com base nas tabelas 03 e 22, foi gerado um gráfico relacionando o número de injeções acumuladas e R do antraceno, referente ao volume de injeção de 10 µL no CL7 (Figura 30).

Figura 30 - Relação entre injeções acumuladas (março a novembro) e R do antraceno obtidos no CL7. Gráfico gerado no MS/Excel 2010.



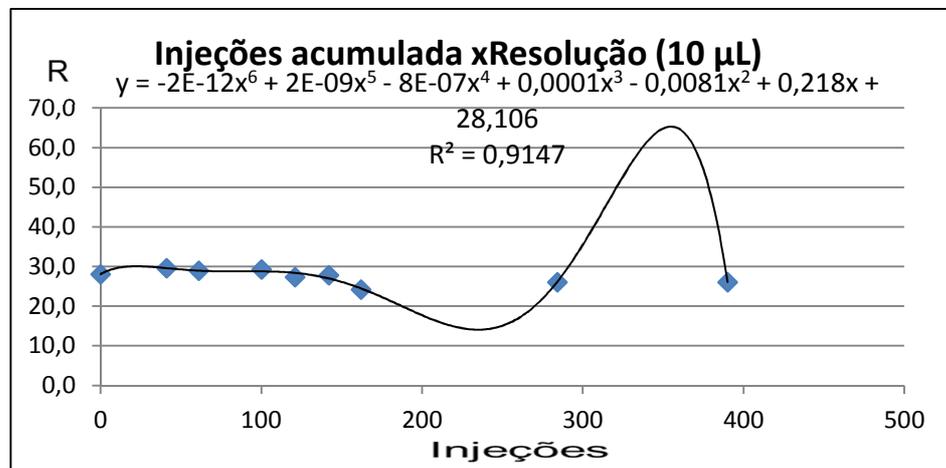
Foi possível visualizar, nesta avaliação inicial, segundo a tabela 24 a seguir, que a linha de tendência/regressão de diminuição da resolução do antraceno durante o trabalho no CL7 apresentou um melhor coeficiente de determinação (R^2) na regressão do tipo polinomial de ordem 6. Sugerimos que estes resultados sejam ratificados, após a inclusão de dados de, pelo menos, mais oito medições com periodicidade trimestral que poderá auxiliar na conclusão final da avaliação deste parâmetro e se esta correlação pode ser significativa.

Tabela 24 - Avaliação do tipo de regressão entre o número de injeções acumuladas e R do antraceno obtido nas avaliações durante o trabalho no CL7.

Tipo de regressão	Equação	Coef. Deter.
Linear	$y = -0,0005x + 28,325$	$R^2 = 0,3741$
Exponencial	$y = 28,327e^{-2E-05x}$	$R^2 = 0,3749$
Polinomial (2ª ord.)	$y = -2E-06x^2 + 0,0013x + 28,114$	$R^2 = 0,6823$
Polinomial (3ª ord.)	$y = -5E-09x^3 + 8E-06x^2 - 0,0026x + 28,304$	$R^2 = 0,9604$
Polinomial (4ª ord.)	$y = 6E-12x^4 - 2E-08x^3 + 2E-05x^2 - 0,0047x + 28,357$	$R^2 = 0,9894$
Polinomial (5ª ord.)	$y = 4E-15x^5 - 4E-12x^4 - 9E-09x^3 + 1E-05x^2 - 0,0042x + 28,348$	$R^2 = 0,9901$
Polinomial (6ª ord.)	$y = 4E-17x^6 - 1E-13x^5 + 1E-10x^4 - 9E-08x^3 + 3E-05x^2 - 0,0058x + 28,362$	$R^2 = 0,9968$

Aplicou-se a mesma metodologia aos dados das tabelas 04 e 23, obtendo-se um gráfico semelhante ao da figura anterior. Abaixo segue o gráfico elaborado com os dados obtidos no CL3 (figura 31).

Figura 31 - Relação entre as injeções acumuladas (março a novembro) e R do antraceno obtidos no CL3. Gráfico gerado no MS/Excel 2010.



Observando a tabela 25 abaixo, percebeu-se que, nesta avaliação inicial, a linha de tendência/regressão do decaimento da resolução, ao longo do trabalho no CL3, apresentou um melhor coeficiente de determinação (R^2) na regressão do tipo polinomial de ordem 6. Era sabido, porém, que foram efetuadas poucas injeções neste equipamento, principalmente até a sexta avaliação (mês de agosto). Como o CL3 praticamente não foi usado ao longo deste estudo, este resultado não foi

considerado conclusivo. Faz-se necessário que os resultados, ora obtidos, sejam reavaliados após a obtenção de, pelo menos, mais oito medições com periodicidade trimestral e, se possível, durante um período onde o CL3 esteja numa condição normal de uso (maior frequência de injeções).

Tabela 25 - Avaliação do tipo de regressão entre o número de injeções acumuladas e a resolução do antraceno, obtidos nas avaliações durante o período do trabalho no CL3.

Tipo de regressão	Equação	Coef. Deter.
Linear	$y = -0,0091x + 28,815$	$R^2 = 0,4032$
Exponencial	$y = 28,798e^{-3E-04x}$	$R^2 = 0,3900$
Polinomial (2ª ord.)	$y = 3E-05x^2 - 0,0211x + 29,5$	$R^2 = 0,4644$
Polinomial (3ª ord.)	$y = 3E-07x^3 - 0,0002x^2 + 0,0045x + 28,884$	$R^2 = 0,5417$
Polinomial (4ª ord.)	$y = -7E-09x^4 + 5E-06x^3 - 0,0014x^2 + 0,0935x + 27,903$	$R^2 = 0,7695$
Polinomial (5ª ord.)	$y = -1E-10x^5 + 8E-08x^4 - 2E-05x^3 + 0,0015x^2 - 0,0131x + 28,186$	$R^2 = 0,8608$
Polinomial (6ª ord.)	$y = -2E-12x^6 + 2E-09x^5 - 8E-07x^4 + 0,0001x^3 - 0,0081x^2 + 0,218x + 28,106$	$R^2 = 0,9147$

Com base nas tabelas 22 e 23, foi possível calcular a amplitude da resolução (R final – R inicial), avaliar a redução relativa percentual de R do antraceno (amplitude*100/R inicial) e calcular a variação de R por injeção acumulada (amplitude/número de injeções acumuladas) no CL7 e no CL3. Estes dados estão relacionados na tabela 26.

Tabela 26 - Determinação da variação de R, da redução relativa percentual de R e da variação de R por injeção acumulada, obtidas ao longo do trabalho.

CL7	Março	Novembro	Variação	DRs (%)	Rs/inj acum
Resolução	28,36	27,50	-0,86	-3,03	
Inj. acum.	0	1088	1088		-0,001
CL3	Março	Novembro	Variação	DRs (%)	Rs/inj acum
Resolução	28,11	25,18	-2,93	-10,42	
Inj. acum.	0	390	390		-0,008

DRs: diminuição relativa (%) da resolução, Inj. acum.: número de injeções acumuladas, Rs.: resolução

Com base na tabela 26, foi possível verificar que a diminuição relativa no percentual da resolução, no CL3, foi aproximadamente 3,4 vezes (-10,42/-3,03) maior que a diminuição relativa no percentual da resolução do CL7, embora seja 2,8 vezes maior (1088/390) o número de injeções efetuadas no CL7 comparado ao CL3. Verificou-se ainda, que no CL3, R do antraceno diminuiu de -0,008 a cada injeção acumulada, valor aproximadamente 8 vezes maior que a diminuição de R por injeção acumulada no CL7 (-0,001).

4.5.3 Avaliação da eficiência e resolução em relação ao desgaste dos sistemas CLAE

Ficou evidenciado, através deste estudo, primeiramente, que apesar de no CL7 (Instalação 2010) o número de injeções tenha sido 2,8 vezes maior durante o período do trabalho do que o número de injeções realizadas no CL3 (Instalação 1999), a diminuição percentual da eficiência do CL3 foi, aproximadamente, 4,7 vezes maior do que aquela do CL7. Observou-se, ainda, uma diminuição relativa percentual da resolução do CL3 sendo, aproximadamente, 3,4 vezes maior que diminuição relativa percentual da resolução do CL7. Estes fatos demonstram que no equipamento mais novo houve um menor desgaste das peças do que no mais antigo, durante o período das verificações (março a novembro/2012). Isso ratificou a necessidade de se levar em conta a “idade” de cada equipamento (instalação) na elaboração de um programa de manutenção preventiva. Uma sugestão que seria razoável é apresentada na tabela 27.

Tabela 27 - Proposta da periodicidade para um programa de manutenção preventiva de CL.

	instalação < 5 anos	5 < instalação < 10 anos	instalação > 10 anos
Manutenção	2,5 anos	2,0 anos	1,0 ano

Em geral, equipamentos mais novos necessitam de uma manutenção preventiva com periodicidade menor do que equipamentos mais antigos, devido ao fato de estes últimos terem sido geralmente mais usados (maior número de injeções durante a sua vida útil), entretanto, é sabido que existem equipamentos que, apesar de serem mais “antigos”, foram pouco utilizados e apresentam bons resultados.

Neste caso haveria a necessidade do monitoramento periódico da performance e do desgaste do equipamento.

Uma proposta seria a complementação dos dados obtidos e aqui apresentados, futuramente em um estudo mais aprofundado, onde o aluno poderia dispor de um período de tempo maior, levando a conclusões mais sólidas.

4.5.4 Desgastes detectados no CL3

Após a finalização deste estudo em dezembro de 2012, durante uma análise de rotina, o equipamento CL3 apresentou valores inconsistentes relacionados ao fluxo. O INCQS providenciou, internamente, a substituição de alguns selos e retentores da bomba “A” e o problema foi momentaneamente solucionado.

Em março de 2013 o equipamento voltou a apresentar o mesmo problema e foi solicitada a visita dos técnicos da fabricante (representantes da Shimadzu). Foi realizada a análise do sistema via software. O ANEXO 3 mostra o relatório gerado, onde é apresentado um histórico minucioso de cada módulo daquele equipamento.

Analisando-se o referido relatório, observamos que de acordo com os critérios do fabricante, alguns itens já deveriam ter sido substituídos. Selos e válvulas de retenção das bombas e a lâmpada de deutério do detector estavam com aproximadamente 400% do tempo de uso recomendado.

Cabe ser colocado para reflexão que o CL3 vem sendo calibrado e verificado normalmente conforme preconizado, sendo sempre considerado “apto” e, ainda, que os resultados obtidos durante o trabalho para este equipamento apresentavam um desvio sempre superior àqueles obtidos no CL7.

4.6 ESTUDO PRELIMINAR VISANDO A ESTIMATIVA DA INCERTEZA DOS CL7 e CL3 ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DAS CURVAS DAS RESPOSTAS OBTIDAS

Nesta terceira parte do trabalho foram feitas avaliações iniciais das respostas referentes ao antraceno, as tabelas do monitoramento das respostas do antraceno (volume x área) obtida durante o período do trabalho no CL7 e CL3 podem ser observadas abaixo (Tabela 28 e 29 respectivamente).

Tabela 28: Respostas do antraceno obtidas nas avaliações no CL7

CL 7	Volume	Volume	Volume	Eq. Reta	R ²	a	b
	(μ L)	(μ L)	(μ L)				
	5	10	20	(Área=b.Volume + a)			
Março	20,1528	39,9120	78,8193	Área=3,9082.volume + 0,6991	1,0000	0,6991	3,9082
Abril	20,4532	40,5266	80,2432	Área=3,9840.volume + 0,5949	1,0000	0,5949	3,984
Mai	20,3133	40,2876	79,8090	Área=3,9643.volume + 0,5526	1,0000	0,5526	3,9643
Junho	20,3028	40,3125	79,7855	Área=3,9629.volume + 0,5663	1,0000	0,5663	3,9629
Julho	20,3457	40,3384	79,9133	Área=3,9692.volume + 0,5593	1,0000	0,5593	3,9692
Agosto	20,4156	40,5307	80,2297	Área=3,9851.volume + 0,5661	1,0000	0,5661	3,9851
Setembro	20,4200	40,4993	80,1671	Área=3,9815.volume + 0,5808	1,0000	0,5808	3,9815
Outubro	20,5870	40,7250	80,5430	Área=3,9949.volume + 0,6780	1,0000	0,6780	3,9949
Novembro	20,5120	40,7170	80,6830	Área=4,0093.volume + 0,5290	1,0000	0,5290	4,0093
Mínimo	20,1528	39,9120	78,8193			0,5290	3,9082
Máximo	20,5870	40,7250	80,6830			0,6991	4,0093
Média	20,3891	40,4277	80,0215			0,5918	3,9733
dpad	0,1279	0,2511	0,5455			0,0580	0,0286
DPR (%)	0,63	0,62	0,68			9,8	0,72

Tabela 29: Respostas do antraceno obtidas nas avaliações no CL3

CL 3	Volume	Volume	Volume	Eq. Reta	R ²	a	B
	(μ L)	(μ L)	(μ L)				
	5	10	20	(Área=b.Volume + a)			
Março	1077876	2172397	4294298	Área=214108.volume + 16925	0,9999	16925	214108
Abril	1095078	2200274	4345714	Área=216400.volume + 22357	0,9999	22357	216400
Mai	1075788	2180031	4329491	Área=216632.volume + 1058	1,0000	1058	216632
Junho	1049336	2129867	4227890	Área=211603.volume + 324,5	0,9999	325	211603
Julho	1089374	2187036	4337713	Área=216343.volume + 14035	1,0000	14035	216343
Agosto	1080835	2184821	4339928	Área=217021.volume + 3282	1,0000	3282	217021
Setembro	1081269	2165284	4298179	Área=214293.volume + 14822	1,0000	14822	214293
Outubro	1094029	2180680	4317300	Área=214710.volume + 25719	1,0000	25719	214710
Novembro	1085334	2178953	4325442	Área=215813.volume + 12090	1,0000	12090	215813
Mínimo	1049336	2129867	4227890			325	211603
Máximo	1095078	2200274	4345714			25719	217021
Média	1080991	2175482	4312884			12290	215214
dpad	13677	19651	36511			9105	1720
DPR (%)	1,3	0,90	0,85			74	0,80

Foi possível com base nas Tabelas 28 e 29 determinar o coeficiente de determinação (R^2) da relação volume versus área, os valores mínimo e máximo, a média, o desvio-padrão e o DPR (%) dos coeficientes angulares e lineares das curvas da resposta do antraceno no CL7 e no CL3. Pode-se verificar, inicialmente,

que o DPR (%) dos coeficientes angulares dos CL7 e CL3 (0,72 e 0,80 respectivamente) não apresentaram diferenças significativas, entretanto o DPR (%) dos coeficientes lineares (9,8 e 74) apresentou uma diferença que necessita de uma melhor avaliação. Para realizar estas avaliações estatísticas finais, faz-se necessário a obtenção de mais dados e é aconselhado a expansão para cinco dos níveis da curva (acrescentando-se os volumes de 40 e 80 μL). Os referidos dados poderão ser obtidos aumentando-se a periodicidade do monitoramento para verificações trimestrais durante dois anos. Os dados assim obtidos poderão subsidiar a elaboração de um procedimento capaz de determinar a incerteza de medição através do estudo dos coeficientes angulares e lineares das curvas de resposta nos CL (volume x área), item imprescindível na determinação da incerteza expandida de medição dos ensaios realizados nestes equipamentos.

5 CONCLUSÃO

Após um período de nove meses foi gerado dados que evidenciam a possibilidade da utilização de alguns parâmetros da adequação do sistema para elaboração de gráficos de controle com o objetivo de monitorar a performance dos CL. Fator de retenção (K), assimetria (FC) e área do antraceno mostraram-se apropriadas a este fim e deram origem a três gráficos de controle. Após a implantação destes gráficos, verificações “instantâneas” poderão ser realizadas com a finalidade de se aferir a performance de cada CL.

Os dados obtidos para os parâmetros resolução (R) e número de pratos teóricos (N) foram avaliados objetivando a obtenção de gráficos que demonstrassem o desgaste de cada CL para auxiliar na elaboração de um “programa de manutenção preventiva” para estes equipamentos. Estes dados, entretanto, não apresentaram uma tendência. É sugerida a complementação deste estudo com a incorporação de novos dados gerados a partir de oito verificações trimestrais.

As áreas do antraceno obtidas em cada CL para os volumes de 5, 10 e 20 μL deram origem a curvas que poderão auxiliar na estimativa da incerteza de cada CL. É, contudo, necessário que sejam incorporados novos dados que incluam também os volumes de 40 e 80 μL para que as curvas finais obtidas contenham o mínimo de cinco níveis, aumentando assim, a confiabilidade destas curvas.

REFERÊNCIAS

ALBERT, A. L. M.; AGUIAR, J. L. N. **Curso de Cromatografia a Líquido Aplicada a Análise de Medicamentos: Teoria, Desenvolvimento, Otimização e Validação de Métodos Analíticos**. Rio de Janeiro: INCQS, 2010. Apresentação em Microsoft Power Point.

ANALYTICAL instrument qualification. In: THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 35^a ed., Rockville, 2012. p. 594.

ANVISA. **Cartilha de Vigilância Sanitária**. 2. ed. Brasília; 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/institucional/snvs/coprh/cartilha.pdf>> Acesso em: 25 out. de 2012.

ANVISA. Laboratórios. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Laboratorios>>. Acesso em: 02 mai. 2013.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990.

BRASIL. Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 ago. de 1977.

BRASIL. Dec. n.º82.201, de 30 de agosto de 1978. Dispõe sobre a transferência do Laboratório Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos da estrutura da Administração Direta do Ministério da Saúde para a Fundação Oswaldo e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 ago. de 1978.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 out. 1988.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Brasília, DF, 11 fev. 1999.

BRASIL. Lei nº 2.187, de 16/02/54. Cria o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos, e dá outras providências. Rio de Janeiro, em 16 de fevereiro de 1954. Disponível em:

<<http://legis.senado.gov.br/legislacao/ListaTextoIntegral.action?id=83019>>

Acesso em: 25 abr. 2013.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012. Dispõe sobre o funcionamento de laboratórios analíticos que realizam análises em produtos sujeitos à Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 fev. 2012. Seção 1.

BUENO, E. **À Sua Saúde: A Vigilância Sanitária na História do Brasil**. Brasília: Editora Anvisa, 2005.

CEFET-QUÍMICA-RJ. **Cromatografia líquida de alta resolução**. Rio de Janeiro, [2005].

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: Proteção e Defesa da Saúde**. 2ª ed. São Paulo: Sobravime, 2004.

COSTA, E. A. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rozenfeld, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p.15-40.

COSTA, E. A. Vigilância Sanitária e proteção da saúde. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. **Direito Sanitário e Saúde Pública**, Brasília, DF, v. 1, p. 189-218, 2003.

CROMATOGRAFIA. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v1.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. v1.

HARRIS, D.C. Introdução às Separações Analíticas. In: ANÁLISE Química Quantitativa. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001a. p. 551-578.

HARRIS, D.C. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: ANÁLISE Química Quantitativa. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001b. p. 613-649.

INCQS. **Apresentação**. Rio de Janeiro, 2008a. Disponível em:

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=61&Itemid=57>. Acesso em: 25 out. 2012.

INCQS. **Atividades**. Rio de Janeiro, 2008b. Disponível em:

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=73&Itemid=68>. Acesso em 29 abr. 2013.

INCQS. **Estrutura**. Rio de Janeiro, 2008c. Disponível em:

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=74&Itemid=70>. Acesso em: 29 abr. 2013.

INCQS. **Modalidades de análise realizadas no INCQS**. Rio de Janeiro, 2008d. Disponível em:

<http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=244>. Acesso em: 29 abr. 2013.

INCQS. **POP 65.3110.034: QUALIFICAÇÃO/CALIBRAÇÃO DE CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**. Rev. 03. Rio de Janeiro, 2012a. 19 p. (Manual da Qualidade. Secção 4.3).

INCQS. **POP 65.3110.044: PROGRAMA DE VERIFICAÇÃO DO CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA**. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2011. 09 p. (Manual da Qualidade. Secção 4.3).

INCQS. **POP 65.3110.050: ADEQUAÇÃO DE SISTEMAS CROMATÓGRAFICOS UTILIZADOS NO SETOR DE MEDICAMENTOS**. Rev. 01. Rio de Janeiro, 2012b. 08 p. (Manual da Qualidade. Secção 4.3).

INCQS. **POP 65.3110.051: GERENCIAMENTO DE COLUNAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS NO SETOR DE MEDICAMENTOS**. Rev. 00. Rio de Janeiro, 2012c. 08 p. (Manual da Qualidade. Secção 4.3).

LANÇAS, F. M.; **Cromatografia Líquida Moderna - HPLC / CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

OMS. Parte dois. Materiais, equipamentos, instrumentos e outros dispositivos: calibração, verificação de desempenho e qualificação de equipamentos, instrumentos e outros dispositivos. In: _____. **Boas práticas da OMS para Laboratórios de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (Série de Relatórios Técnicos da OMS, nº957, 2010 – relatório 44, anexo 1) e Documento de auto-avaliação de Boas Práticas de Laboratório (BPL)**. Washington, DC, 2011. p. 24-25.

SILVA, A. C. P. O laboratório oficial na avaliação analítica. In: Rozenfeld, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000. p.271 – 301.

SKOOG, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Introdução às Separações Cromatográficas. In: **PRINCÍPIOS de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora, 2002a. p. 598-617.

SKOOG, D. A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: PRINCÍPIOS de Análise Instrumental. 5. ed. Porto Alegre: Bookman Companhia Editora, 2002b. p. 641-677.

THE UNITED States Pharmacopoeia 35^a ed., Rockville, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA OS TESTES DE “QUALIFICAÇÃO/CALIBRAÇÃO DE CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA”.

4.2 - Para efeito deste POP, são adotados os seguintes critérios de aceitação:

5.5 - Detector	Critério de aceitação
5.5.1 ou 5.5.2 - Exatidão	251 ± 3 nm e 340 ± 3 nm (antraceno)
5.5.3 - Ruído	0,5 mUA
5.5.4 - Deriva	3,0 mUA
5.7.3 - Linearidade	$r^2 \geq 0,999$
5.6 - Bomba	
5.6.1- Exatidão do Fluxo	1,00 ± 0,03 mL/minuto
5.6.2- Exatidão da Composição	± 1%
5.7 - Injetor automático	
5.7.1- Precisão do Injetor	DPR ≤ 1,0%
5.7.1- Repetitividade do Fluxo	DPR ≤ 2,0%
5.7.2- Linearidade do Injetor e Detector	$r^2 \geq 0,999$
5.7.4- Carryover ou Arraste do Injetor	≤ 1%
5.7.5- Exatidão do Injetor	50 ± 2 µL
5.8 - Forno	
5.8 - Exatidão do Forno	35 ± 2 °C

Tabela 1: Critérios de aceitação para os parâmetros checados

Fonte: POP 65.3110.034 do INCQS/FIOCRUZ.

ANEXO B – CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA OS TESTES DE “PROGRAMAÇÃO DE VERIFICAÇÃO DO CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA”.

3.3 - Critérios de aceitação para a Qualificação de Performance:

<i>Parâmetros da QO a serem avaliados</i>	Critério de aceitação
Precisão do Injetor	$DPR \leq 1,0\%$
Repetitividade do Fluxo	$DPR \leq 2,0\%$
Linearidade do Injetor e Detector	$r^2 \geq 0,999$
Arraste do Injetor	$AI \leq 1\%$
Varição da Resposta	$\Delta R \leq 5,0\%$
Fator de Cauda (assimetria)	$FC \leq 2$

Tabela 1: Critérios de aceitação para os parâmetros checados na QP

Fonte: POP 65.3110.044 do INCQS/FIOCRUZ.

ANEXO C – CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA OS TESTES DE “ADEQUAÇÃO DE SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS UTILIZADOS NO SETOR DE MEDICAMENTOS”.

Tabela 1: Condições gerais para teste de adequação de sistemas cromatográficos

Parâmetro	Critério de aceitação
Fator de retenção (K)	$2 < K < 20$
Número de pratos teóricos (N)	Mínimo 2000
Fator de cauda (T)	Menor ou igual a 2,0
DPR% entre áreas	Menor ou igual a 2,0%

Fonte: POP 65.3110.050 do INCQS/FIOCRUZ.

ANEXO D – CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA OS TESTES DA “PROGRAMAÇÃO DE VERIFICAÇÃO DO CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA”.

I

3.3 - Critérios de aceitação para a Qualificação de Performance:

<i>Parâmetros da QO a serem avaliados</i>	Critério de aceitação
Precisão do Injetor	$DPR \leq 1,0\%$
Repetitividade do Fluxo	$DPR \leq 2,0\%$
Linearidade do Injetor e Detector	$r^2 \geq 0,999$
Arraste do Injetor	$AI \leq 1\%$
Variação da Resposta	$\Delta R \leq 5,0\%$
Fator de Cauda (assimetria)	$FC \leq 2$

Tabela 1: Critérios de aceitação para os parâmetros checados na QP

Fonte: POP 65.3110.044 do INCQS/FIOCRUZ.

ANEXO E – SYSTEM CHECK REPORT DO CL3

2 CHECK VALVE IN - LC-10ADVP

Instrument: HPLC 3 - QM 0352

CLASS-VP System Check Report

Date Tested	20/3/2013 10:01					
Operator	System					
Unit Name	Serial Number	Unit ID	Version	Address		
LC-10ADvp	C20963605314	LC-10ADvp	V5.25	3		
LC-10ADvp	C20963605309	LC-10ADvp	V5.25	4		
CTO-20A	L20204301424	CTO-10Avp	V1.06	5		
SIL-20A	L20164301255	SIL-HTA	V1.04	1		
SCL-10Avp	C21014318221	SCL-10Avp	V6.10			
SPD-M10Avp	C20903602713KG	C20903602713	V3.2			
Unit Name	LC-10ADvp	Link Address	3			
Date Tested	20/3/2013 09:59	Serial Number	C20963605314	Unit ID	LC-10ADvp	
ROM Version	V5.25	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass	
Optical I/F Check	Pass	Leak Sensor Check	Pass	Leak Sensor Level	17/11/1999 15:23	
Total Operating Time (hr)	2110	R Seal Delivered (L)	143	60	(238%)	***
L Seal Delivered (L)	143	60	(238%)	***		
Total Revolution	7178469	Flow Compensation Factor	T000023(hr)	5.30		
Pressure Sensor Compensation Factor	T000334(hr)	5466.00				
Flow Rate Accuracy Check(%)	T000000(hr)	0.00				
Pulsation Check(kgf)	17/11/1999 15:09	0.10				
Maintenance Log No.1	T008897(hr)	P/N:228-3146-				
Maintenance Log No.2	T008897(hr)	P/N:228-3146-				
Maintenance Log No.3	T008897(hr)	P/N:228-32784-91				
Maintenance Log No.4	T008897(hr)	P/N:228-32784-91				
Maintenance Log No.5	T008897(hr)	P/N:228-35281-91				
Maintenance Log No.6	T008897(hr)	P/N:228-35281-91				
Maintenance Log No.7	T008897(hr)	L SEAL REPLACED				
Maintenance Log No.8	T008897(hr)	R SEAL REPLACED				
Error Log No.1	T021108(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.2	T021105(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.3	T021104(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.4	31/1/2013 10:19	ERROR P-MAX				
Error Log No.5	5/1/2013 10:15	ERROR P-MAX				

Instrument: HPLC 3 - QM 0352

Error Log No.6	T020805(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.7	T020805(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.8	T020803(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.9	T020778(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.10	T020778(hr)	ERR LEAK DETECT				
Unit Name	LC-10ADvp	Link Address	4			
Date Tested	20/3/2013 10:00	Serial Number	C20963605309	Unit ID	LC-10ADvp	
ROM Version	V5.25	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass	
Optical I/F Check	Pass	Leak Sensor Check	Pass	Leak Sensor Level	17/11/1999 15:01	
Total Operating Time (hr)	2113	R Seal Delivered (L)	265	60	(441%)	***
L Seal Delivered (L)	265	60	(441%)	***		
Total Revolution	13299833	Flow Compensation Factor	T000000(hr)	5.00		
Pressure Sensor Compensation Factor	T000334(hr)	5170.00				
Flow Rate Accuracy Check(%)	T000000(hr)	0.00				
Pulsation Check(kgf)	17/11/1999 14:53	0.30				
Error Log No.1	T021616(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.2	T021612(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.3	T021612(hr)	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.4	12/3/2013 11:59	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.5	12/3/2013 10:02	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.6	12/3/2013 09:20	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.7	11/3/2013 15:20	ERR LEAK DETECT				
Error Log No.8	23/1/2013 12:22	ERROR HOME POS				
Error Log No.9	23/5/2011 14:23	ERROR HOME POS				
Error Log No.10	19/4/2011 19:05	ERROR HOME POS				
Unit Name	CTO-20A	Link Address	5			
Date Tested	20/3/2013 10:00	Serial Number	L20204301424	Unit ID	CTO-10Avp	
ROM Version	V1.06	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass	
Optical I/F Check	Pass	Leak Sensor Check	Pass	Leak Sensor Level	10/6/2007 08:41	
Total Operating Time (hr)	8744					

Report Date: 20/3/2013 10:10:10

Report Date: 20/3/2013 10:10:10

Instrument: HPLC 3 - QM 0352

Rotary Valve(L)	NONE						
Rotary Valve(R)	NONE						
Column Management Device	NONE						
Temperature Accuracy Check	T000000(hr)	Pass					
Temperature Stability Check	T000000(hr)	Pass					
Temperature1 Calibration	T000000(hr)	40.2 (at 40.0)					
Temperature2 Calibration	T000000(hr)	60.0 (at 60.0)					
Operation Log No.1	T000000(hr)	INITIALIZE PARAM					
Error Log No.1	T008727(hr)	ERR LEAK SENS					
Error Log No.2	T008727(hr)	ERR LEAK SENS					
Error Log No.3	10/7/2012 20:13	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.4	28/3/2012 10:15	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.5	28/3/2012 10:14	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.6	23/3/2012 14:01	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.7	23/3/2012 14:01	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.8	13/3/2012 09:48	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.9	13/3/2012 09:47	ERR OVER T.MAX					
Error Log No.10	13/3/2012 09:43	ERR OVER T.MAX					
Unit Name	SIL-20A	Link Address	1				
Date Tested	20/3/2013 10:00	Serial Number	L20164301255	Unit ID	SIL-HTA		
ROM Version	V1.04	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass		
Optical I/F Check	Pass	Leak Sensor Check	Pass	Leak Sensor Level	T000000(hr)		
Total Operating Time (hr)	8923	Rack Position Adjustment	29/6/2006 12:07	Injection Port Adjustment	29/6/2006 12:07	Injection Compensation Factor	T000000(hr)
Needle Seal Used	13039	40000	(32%)	Pass			
6-Port Valve Rotation	13038	20000	(65%)	Pass			
Low Pressure Valve Rotations	49276	50000	(98%)	Pass			
External Rinsing Pump Used(sec)	0	700000	(0%)	Pass			
Position Sensor Check	T000000(hr)						
Operation Log No.1	9/4/2010 05:02	NO VIAL 13					
Error Log No.1	6/1/2010 14:51	NO VIAL 4					
Error Log No.2	11/8/2009 15:38	NO VIAL 14					
Error Log No.3	11/8/2009 15:37	NO VIAL 14					
Error Log No.4	11/8/2009 15:36	NO VIAL 13					
Error Log No.5	11/8/2009 15:35	NO VIAL 3					
Error Log No.6	9/2/2009 16:28	NO VIAL 3					
Error Log No.7	18/1/2009 13:01	NO VIAL 3					
Error Log No.8	10/9/2008 03:34	NO VIAL 7					
Error Log No.9	5/9/2008 09:01	NO VIAL 2					

Report Date: 20/3/2013 10:10:10

Instrument: HPLC 3 - QM 0352

Unit Name	SCL-10Avp	Link Address	1			
Date Tested	20/3/2013 10:01	Serial Number	C21014318221	Unit ID	SCL-10Avp	
ROM Version	V6.10	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass	
Total Operating Time (hr)	8396	Maintenance Log No.1	29/6/2006 02:23	Operation Log No.1	23/2/2006 09:08	P/N:228-45051-32
Error Log No.1	12/3/2013 11:59	0034				
Error Log No.2	12/3/2013 10:02	0034				
Error Log No.3	31/1/2013 10:20	0030				
Error Log No.4	23/1/2013 12:22	0032				
Error Log No.5	23/1/2013 10:22	0019				
Error Log No.6	23/1/2013 10:22	0019				
Error Log No.7	23/1/2013 10:22	0019				
Error Log No.8	4/1/2013 10:15	0030				
Error Log No.9	23/1/2013 10:21	0019				
Error Log No.10	16/11/2012 14:54	0032				
Unit Name	SPD-M10Avp	Link Address	1			
Date Tested	20/3/2013 10:08	Serial Number	C20903602713KG	Unit ID	C20903602713	
ROM Version	V3.2	D2 Lamp Operating Time (hr)	8917	2000	(445%)	***
W Lamp Operating Time (hr)	1717	2000	(85%)	***		
D2 Lamp Energy	902	5000				
W Lamp Energy	5031	3000				
Date Tested	20/3/2013 10:08	ROM Check	Pass	RAM Check	Pass	
Wavelength Accuracy Check	20/3/2013 10:09	D2 Lamp(656.1nm)	656.10(nm)	0.00(nm)	(Pass)	
D2 Lamp(486.0nm)	486.10(nm)	0.10(nm)	(Pass)			
Ho Filter(287.6nm)	287.50(nm)	-0.10(nm)	(Pass)			
Ho Filter(360.8nm)	360.90(nm)	0.10(nm)	(Pass)			
Wavelength Accuracy Check Data	(mV)	652.1(nm)	95	***		
653.1(nm)	83	***				
654.1(nm)	0	***				
655.1(nm)	969	*****				
656.1(nm)	2495	*****				
657.1(nm)	1781	*****				
658.1(nm)	363	*****				
659.1(nm)	0	***				
660.1(nm)	34	***				
482.0(nm)	426	***				
483.0(nm)	446	***				
484.0(nm)	546	*****				
485.0(nm)	824	*****				

Report Date: 20/3/2013 10:10:10