

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

## *Good practices for high performance liquid chromatography: an approach to pharmaceutical quality control*

**Rodolpho Guilherme Menezes Gama\***, **Marcelo Henrique da Cunha Chaves**<sup>2</sup>

Instituto de Tecnologia em Fármacos –  
Farmanguinhos/FIOCRUZ.

Unidade CTM. Laboratório Físico-  
Químico/ Controle da Qualidade Prédio  
70

Avenida Comandante Guarany 447,  
Jacarepaguá, Rio de Janeiro – RJ,  
22775-903

Tel. Celular: +55 21 98669-6756

\* [rodolpho.gama@far.fiocruz.br](mailto:rodolpho.gama@far.fiocruz.br)

<sup>2</sup> Tel. Comercial: +55 21 3882-9042

Tel. Celular: +55 21 99875-7888

[marcelo.chaves@far.fiocruz.br](mailto:marcelo.chaves@far.fiocruz.br)

### Resumo

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) constitui-se como uma das técnicas mais avançadas e utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas, devido a sua grande versatilidade. Boas Práticas Cromatográficas (BPC) apresentam lógica semelhante àquela dos protocolos das Boas Práticas de Fabricação e Laboratoriais, oriundas de órgãos reguladores nacionais e internacionais e voltadas para o nicho farmacêutico, de forma a auxiliarem no cumprimento de todas estas normas de qualidade. As BPC estão presentes do início ao fim do desenvolvimento e prática dos processos cromatográficos e são comumente transmitidas, de forma empírica, pelos fabricantes de equipamentos e consumíveis cromatográficos. Procedimentos práticos de CLAE apoiados em conceitos teóricos são abordados, com base em pesquisa bibliográfica em bancos de dados de artigos científicos e também na consulta a documentos dos maiores fabricantes de itens de CLAE. A discussão das BPC para preparação de amostras e soluções utilizadas nos ensaios e na limpeza dos acessórios e consumíveis de CLAE traz a compreensão de que as mesmas são práticas fundamentais para indústria farmacêutica, agregando maior confiabilidade nos seus processos, culminando em possível redução de custos com manutenção e no pleno cumprimento dos requisitos dos órgãos reguladores. É importante, portanto que a abordagem das BPC se torne uma realidade dentro dos laboratórios de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, de forma que as mesmas sigam preceitos harmonizados para todos os analistas e usuários, já que estas ferramentas são indispensáveis para que resultados confiáveis sejam produzidos na rotina de laboratório.

**Palavras chaves:** Boas Práticas Cromatográficas. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Controle de Qualidade, Indústria Farmacêutica

### Abstract

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is one of the most advanced techniques used in quality control laboratories in the pharmaceutical industry, due to its great versatility. Good Chromatographic Practices (GCP) have a logic similar to that of the Good Manufacturing and Laboratory Practices protocols, coming from national and international regulatory bodies and aimed at the pharmaceutical niche, in order to assist in complying with all these quality standards. GCP are present from the beginning to the end of the development and practice of chromatographic processes and are commonly transmitted, empirically, by chromatographic equipment and consumables manufacturers. Practical HPLC procedures based on theoretical concepts are addressed, based on bibliographic research in databases of scientific articles and also in the consultation of documents from the major manufacturers of HPLC items. The discussion of GCP for the preparation of samples and solutions used in the testing and cleaning of HPLC accessories and consumables brings the understanding that they are fundamental practices for the pharmaceutical industry, adding greater reliability to their processes,

culminating in possible cost reduction with maintenance and in full compliance with the requirements of regulatory bodies. Therefore, it is important that the GCP approach becomes a reality within the quality control laboratories of the pharmaceutical industries, so that they follow harmonized precepts for all analysts and users, since these tools are indispensable for reliable results to be produced in the laboratory routine.

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

## 1. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade ao redor do mundo (1). Devido a sua versatilidade, refletida por seus diferentes modos de separação (fase normal, fase reversa, supressão iônica, troca iônica, interação hidrofílica, dentre outros), bem como pela redução dos preços dos sistemas cromatográficos, miniaturização dos equipamentos, avanços tecnológicos, tem-se um ambiente favorável ao desenvolvimento e uso de métodos analíticos baseadas em CLAE na indústria farmacêutica (2).

De acordo com os preceitos de vigilância sanitária, um método de análise que se torna fundamental e crítico nesse tipo de técnica irá necessitar de um maior controle com relação aos seus parâmetros. As boas práticas de fabricação (BPF) na produção de medicamentos se fazem então necessárias para garantir a diminuição de quaisquer riscos inerentes à produção farmacêutica, que podem não ser detectáveis pelos ensaios já realizados nas etapas de controle de qualidade. Esses riscos são, por exemplo, a ação de contaminação cruzada, contaminação por partículas e troca/mistura de produto, que podem acarretar em sérios danos para a saúde e o bem-estar da sociedade (3).

Dentro da indústria farmacêutica, um dos pilares de sustentação técnica para a certificação e vivência das BPF, é o gerenciamento da garantia e controle de qualidade, que entre outros requisitos, nos traz a vivência das Boas Práticas de Laboratório (BPL),

isto é, um sistema de qualidade que abrange o processo organizacional e as condições nas quais estudos não-clínicos de saúde e de segurança ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (4). Para o devido cumprimento das BPL, os equipamentos geradores de dados devem possuir procedimentos que garantam seu adequado uso, conforme preconizado pelos fabricantes de equipamentos de CLAE (3). Estes, em caráter sinérgico com seus usuários, também recomendam práticas para serem utilizadas nos seus equipamentos, intitulados como Boas Práticas Cromatográficas (BPC), as quais propiciam que os equipamentos possam atingir o máximo desempenho, gerando resultados que garantam confiabilidade, reprodutibilidade para o atendimento dos requisitos de órgãos regulatórios.

O presente trabalho compila respostas a questionamentos pragmáticos relativos a preparo de soluções e amostras, à utilização e manutenção de consumíveis e acessórios de CLAE, que estão no bojo das BPC, de forma a servir de auxílio para aqueles que enfrentam dificuldades laboratoriais, nesta área. Traz também um panorama das mesmas, e apresenta as técnicas sugeridas atualmente, relacionando-as ao padrão de qualidade desenvolvido ao longo de décadas na indústria farmacêutica.

## 2. Boas Práticas Cromatográficas

O conceito de Boas Práticas Cromatográficas pode ser definido como um conjunto de orientações

teóricas e práticas, que visam ao melhor aproveitamento e maximização da eficiência dos equipamentos e acessórios de CLAE, garantindo assim que requisitos regulatórios sejam plenamente atendidos. As BPC dizem respeito a toda e qualquer etapa de uma operação cromatográfica, desde a instalação e qualificação de um equipamento, passando pelo correto preparo e adequação de seus consumíveis, até a geração e rastreabilidade de dados gerados.

## **2.1. Boas Práticas Cromatográficas nos processos de preparação de amostras e fases móveis/ solventes utilizados na análise.**

### *2.1.1. Reagentes, solventes e fase móvel - Maximizando a eficiência do sistema cromatográfico*

Reagentes ou soluções preparadas que estiverem contaminadas, degradadas, fora da validade, malconservadas ou sem informações relativas ao fabricante, lote de produção, data de validade e grau de pureza não podem ser utilizados para o controle de qualidade de quaisquer medicamentos (3). A utilização de reagentes dentro do prazo de validade e em perfeitas condições de uso é parâmetro mínimo para garantir a confiança nos resultados obtidos através de um cromatógrafo. Um dos pontos de criticidade para a realização de ensaios é a qualidade e pureza dos reagentes consumidos, sendo recomendados para análises cromatográficas reagentes de grau CLAE ou, em sua falta, de grau analítico (5).

É considerado reagente grau CLAE os solventes que possuem propriedades químicas e limites de temperatura que são também os aplicados à tal análise; possuam transparência óptica ou baixo índice de absorção no UV, especialmente para análises que requerem alta sensibilidade espectrofotométrica; sejam livres de partículas na faixa de exclusão em torno de 0,2 a 0,45  $\mu\text{m}$ ; e que apresentem baixos níveis de corrosão em aço inox SS316; além de serem livres de íons halogêneos tais como HCl, KCl, NaCl e NH<sub>4</sub>Cl, livres de gases

dissolvidos (possibilidade de formação de bolhas) e por fim, que apresentem baixos índices de viscosidade (6).

A utilização de reagentes grau CLAE traz de início um pouco mais de custos ao processo analítico, já que são reagentes mais caros devido aos inúmeros processos de eliminação de impurezas a que são submetidos. Em alguns casos, a utilização de reagentes que não sejam grau CLAE ocasionam o surgimento de picos de impurezas oriundas do próprio solvente ou ainda oriundos da degradação do analito a ser quantificado, atrapalhando a sua adequada quantificação, seja isto devido à diminuição do sinal resposta do analito, da quantificação inadequada de impurezas como se fossem o analito ou da co-eluição dessas impurezas com os compostos de interesse (7).

A coluna cromatográfica, irá reter qualquer material particulado que esteja contido na fase móvel do sistema de CLAE. Quando o laboratório opta em não usar reagentes de grau CLAE ou reagentes impuros, por questões de corte de custos, por exemplo, acaba invariavelmente tendo problemas analíticos, já que a utilização de solventes de menor pureza no sistema cromatográfico provoca adsorção irreversível de impurezas na entrada e saída da coluna. Estas impurezas podem bloquear sítios de adsorção, mudar a seletividade da coluna e eventualmente levam à distorção dos picos no cromatograma. Na eluição com gradiente, por exemplo, estas impurezas podem produzir picos fantasmas, que são picos que sempre aparecem na mesma posição no cromatograma. Sua origem não é a amostra, mas as impurezas de solventes ou outros aditivos encontrados nos solventes.

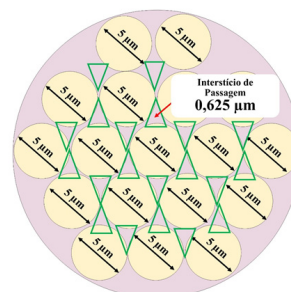
Além desses pontos, o reagente a ser utilizado em análise cromatográfica precisa de uma série de cuidados a fim de evitar a presença de bolhas (formadas por gases dissolvidos) ou contaminantes, visando-se também a não formação de fungos ou algas nas soluções tampão. A utilização de frascos limpos evita grande parte das contaminações, porém, sempre se faz necessária a lavagem destes frascos com o solvente que se for utilizar, ainda que o solvente de guarda seja água ultra

purificada (8). O próprio armazenamento de soluções constitui-se como uma BPC, já que as mesmas podem sofrer oxidação ou reações fotoquímicas. Recomenda-se a utilização de frascos de vidro borossilicato âmbar, que é inerte à maioria dos reagentes utilizados nas técnicas de CLAE, a fim de evitar quaisquer reações indesejadas (8).

Os processos de filtração e desgaseificação da fase móvel são descritos como fundamentais em diversos guias de otimização das análises de CLAE. A utilização de sistemas de filtração em  $0,45\ \mu\text{m}$  é justificada também no Guia de Resolução de Problemas (do inglês, *Troubleshooting Guide*) da fabricante *Terumo Scientific*, pois o uso desse tipo de filtro irá reter material particulado que possa vir a bloquear ou mudar a seletividade da coluna, além de permitir um melhor desempenho e maximização da vida útil da bomba, selos e das válvulas de retenção (do inglês, *check valves*) (7). A escolha da porosidade de  $0,45\ \mu\text{m}$  se deve ao fato de que, no geral, os recheios das colunas cromatográficas usadas em laboratórios de controle de qualidade são fabricados com tamanho de partícula de  $5\ \mu\text{m}$ , sendo que os interstícios de passagem do leito desse tipo de coluna possui o tamanho de  $0,625\ \mu\text{m}$ , isto é  $1/8$  do diâmetro da fase estacionária, conforme pode ser visto na ilustração da Figura 1. Desse modo as membranas de  $0,45\ \mu\text{m}$  permitiriam apenas a passagem de partículas com tamanho inferior a  $0,45\ \mu\text{m}$  não havendo o entupimento do leito cromatográfico. Quando a fase estacionária das colunas cromatográficas contém partículas de diâmetros inferiores a  $4\ \mu\text{m}$ , recomenda-se como boa prática cromatográfica a utilização de membranas de filtração com porosidade de  $0,22\ \mu\text{m}$ . Em alguns casos, fases móveis que possuem grande quantidade de solução tampão de alta concentração em sua composição, recomenda-se como BPC a sua filtração diária, a fim de evitar precipitação de sais dentro do frasco de armazenamento (9).

O tipo da membrana também influenciará a qualidade da filtração da fase móvel. Membranas de ésteres de celulose são indicadas para filtração de água, solução tampão ou água acidificada. Membranas de nylon

permitem a passagem de água e solventes em geral, com exceção de clorofórmio, éteres, diclorometano e ácidos



**Figura 1.** Ilustração do diâmetro de passagem do leito ( $0,625\ \mu\text{m}$ ) de uma coluna cromatográfica com partículas de diâmetro de  $5\ \mu\text{m}$  em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Fonte: Próprio Autor

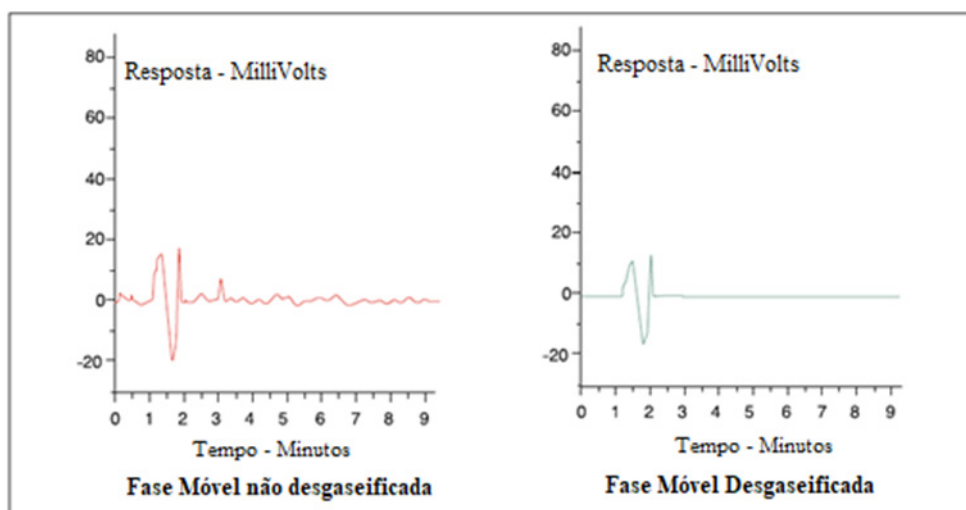
fortes (9). Dessa forma, convém que o usuário da técnica de CLAE faça uso de tabelas de compatibilidade de solventes *versus* materiais de fabricação das membranas. Todos os fabricantes disponibilizam tais catálogos de modo a evitar que o analista utilize um material incompatível com seu método analítico. Ressalta-se que em casos de análises que necessitem de alta sensibilidade, não é recomendada a filtração de acetonitrila ou de soluções que contenham acetonitrila, a fim de evitar vestígios de produtos da reação da acetonitrila com a membrana, em especial o nylon (8).

O processo de desgaseificação das soluções utilizadas nos sistemas cromatográficos permite uma melhor eficiência dos resultados obtidos por CLAE, proporcionando maior estabilidade ao sistema, evitando mudança de tempo de retenção de picos e até o surgimento de picos indesejados, além de evitar desgaste prematuro de peças, acessórios e componentes dos equipamentos. Essa instabilidade do sistema ocorre pelo fato de que o gás  $\text{O}_2$  absorve em comprimento de onda abaixo de  $215\ \text{nm}$ , trazendo instabilidade em métodos de varredura ou que trabalhem nessa faixa de comprimentos de onda (9). Os gases dissolvidos podem ser retirados pelos processos de sonicação, filtração à vácuo e borbulhamento com gás hélio (7). Na Figura 2 pode ser vista a diminuição da razão sinal/ruído e consequentemente a melhora

da qualidade da linha de base de um cromatograma resultante de uma fase móvel que sofreu desgaseificação. Cabe ainda ressaltar que, segundo a fabricante Thermo Scientific, o método mais efetivo para desgaseificação é o borbulhamento de gás hélio, porém devido ao menor custo, recomenda-se a utilização dos dois primeiros processos citados anteriormente na retirada dos gases dissolvidos na fase móvel, gerando uma combinação de

filtração com sonicação (por pelo menos 20 minutos) e agitação constante (9).

Os cuidados no preparo e manipulação das fases móveis serão os mesmos para quaisquer reagentes utilizados para CLAE. A mistura dos solventes a serem empregados como fase móvel deve ser feita, levando-se em consideração que, em alguns casos, como em



**Figura 2.** Comparativo do sinal resposta cromatográfico quando da utilização de uma fase móvel que não sofreu desgaseificação e de outra que passou pelo processo de desgaseificação. Fonte: Adaptado de THERMO SCIENTIFIC – Aviso Legal - Vale a pena ressaltar que a propriedade intelectual relacionada ao equipamento é de propriedade exclusiva da Thermo Fisher Scientific, bem como os direitos relacionados à marca e copyright. Todo e qualquer uso dependerá de autorização prévia e por escrito da Thermo Fisher Scientific.” (2016).

misturas de água com solventes orgânicos (por exemplo, metanol e etanol), ocorre a contração de volume devido a interações moleculares. Em alguns outros procedimentos, recomenda-se inclusive o preparo diário de solução tampão utilizada como fase móvel (9).

Por fim, resumidamente, outras medidas de boas práticas com foco em solventes, seguem as seguintes diretrizes:

- Caso o solvente esteja em uso pelo equipamento, garantir que não existe entrada

de ar entre a tampa e o canal, para que não ocorram reações indesejáveis, além da formação de bolhas. Utilizar filtros de entrada para proteger o sistema cromatográfico de possíveis partículas contaminantes (8).

- Não reciclar solventes que já tenham tido contato com os canais do equipamento para o preparo de amostras, a fim de evitar possíveis contaminações (6).

- Troca diária do frasco que tiver 100% de água ultra purificada, para que não aconteça crescimento microbiano (10).
- Substituição semanal do solvente que for utilizado para limpeza da seringa de injeção e do selo do tampão (11).

### 2.1.2. Escolhendo o tipo apropriado de água para análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A utilização de água em sistemas cromatográficos é de grande importância, seja no preparo de tampão/fase móvel, ou na limpeza e regeneração de colunas, para sistemas de fase reversa. Os diversos fabricantes de sistemas cromatográficos preconizam a utilização de água ultra purificada, a fim de evitar o surgimento de picos espúrios na linha de base, além da detecção de impurezas indesejáveis no processo analítico (7). A água ultra purificada possui baixa concentração iônica, baixa carga microbiana e baixo nível de Carbono Orgânico Total (COT). Os baixos níveis de COT são importantes para garantir que a água não tenha em sua composição diversos tipos de compostos químicos orgânicos que possam interferir no processo de quantificação e identificação dos analitos. A água ultra purificada pode ser considerada estéril, já que uma de suas membranas de filtração é de 0,22  $\mu\text{m}$ , havendo também durante a sua produção, o uso de outros componentes de filtração e eliminação de micro-organismos, através de lâmpadas de ultravioleta. Os requisitos mínimos preconizados são: possuir condutividade menor que 0,1  $\mu\text{S cm}^{-1}$  à 25 °C, resistividade maior que 18,0  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  e 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  de Carbono Orgânico Total (12).

### 2.1.3. Soluções Tampão – Cuidados no preparo

Diversos métodos analíticos de CLAE utilizam soluções tampão no preparo de amostras ou no transporte das mesmas, como fração total ou parcial de uma fase móvel, de modo a contribuir para o processo de separação,

identificação e quantificação dos analitos. Uma das propriedades de uma solução tampão é sua efetividade na separação de analitos, proporcionando a estabilidade química necessária ao resistir a variações indesejáveis de pH, que podem ocorrer devido a diluições no preparo ou no processo de separação de componentes das amostras. O tamponamento das soluções proporciona controle dos mecanismos de reações relacionados à precipitação de sais e formação de cristais, processos indesejáveis na CLAE (13)

O preparo das soluções tampão requer cuidados especiais, visto que por conter água é natural o processo de crescimento microbiano. Conseqüentemente, a determinação da vida útil destas soluções constitui-se como uma BPC, que traz benefícios como a economia de reagentes, a diminuição da frequência de preparo e a manutenção das condições cromatográficas ideais para a análise (7).

A utilização de água ultra purificada para o preparo de soluções tampão é indispensável para o atendimento das normas técnicas e para maximização do desempenho do equipamento de CLAE, visto que seu pH, condutividade e índice de COT, minimizam a presença de interferências na análise, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira, em sua sexta edição (12).

Soluções tampão preparadas em laboratórios ou adquiridas de fornecedores externos também devem passar por filtração, já que precipitação e cristalização podem ocorrer durante o processo cromatográfico. Isto é especialmente importante, quando se utiliza gradiente, visto que ocorrem mudanças no coeficiente de solubilidade no leito cromatográfico. (11)

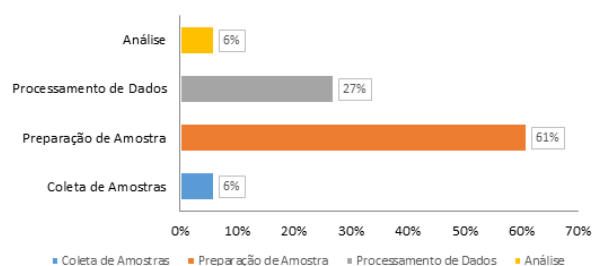
O intervalo de variação de valores de pH a ser observado para uma solução tampão deve ser de  $\pm 0,05$ . Isso significa que para um pH de 6,80, será possível ajustar o pH da solução entre 6,75 a 6,85. No geral, é recomendado como uma boa prática que o valor final de pH da solução tampão fique dentro de um intervalo de  $\pm 0,02$  unidades de pH (11).

O momento mais apropriado para o ajuste de pH da fase móvel, quando a mesma é constituída por uma mistura de solventes orgânicos, também é uma questão que levanta dúvidas entre os analistas. Este ajuste pode ocorrer durante o preparo da solução tampão ou após sua mistura com solventes orgânicos. De acordo com o Guia de Resolução de Problemas para CLAE da fabricante *Waters Corporation*, o ajuste do pH deve ocorrer na solução tampão antes da adição de qualquer solvente orgânico na mesma, já que a adição de solventes orgânicos deslocará a concentração de íons  $H^+$  para além da escala para a qual o medidor de pH foi calibrado. Além disso, os ajustes pertinentes a um medidor de pH são feitos para que se tenha resultados confiáveis em solução aquosas. Porém, existem exceções, como o caso de determinados sais, como por exemplo aminas de cadeia longa, que possuem solubilidade limitada em água. Nessas situações, são adicionados os solventes orgânicos na fase aquosa antes do ajuste do pH, com o intuito de melhorar a solubilidade dos sais e em seguida é realizado o ajuste do pH da fase móvel. Em outros casos, com a adição de solventes orgânicos, um novo equilíbrio é atingido, com mudanças bruscas do pH da solução final. Recomendando-se assim, um pequeno ajuste do pH da fase móvel final, que deverá ser feito em equipamento apropriado, diferente dos potenciômetros comuns que são calibrados somente para soluções aquosas (11). Sendo possível, recomenda-se um estudo da capacidade de tamponamento da solução aquosa e da fase móvel (isto é, da solução tampão com pH ajustado, misturada com solvente orgânicos), através de uma curva de titulação, onde é realizada a adição de base e ácido, em ambas as soluções, a fim de verificar se a adição antes ou depois do solvente orgânico não estará interferindo na capacidade de tamponamento da fase móvel (11).

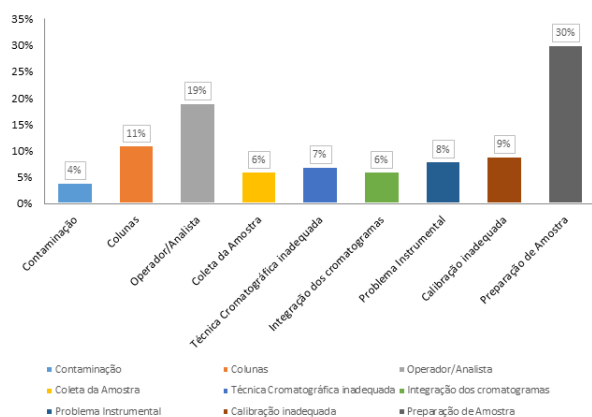
#### 2.1.4. O preparo da amostra e sua criticidade no processo de ensaio cromatográfico.

Segundo Majors em 1991, no escopo de um procedimento analítico cromatográfico padrão, 61% do tempo é utilizado no processamento da amostra, informação que pode ser visualizada na Figura 3. Consequentemente, esta será a etapa que proporcionará também maior possibilidade de erros. De acordo com a Figura 4, 30% dos erros gerados nos processos analíticos que envolvem cromatografia são oriundos da etapa do preparo de amostra, além de indicar que o analista é responsável por 20% dos erros do procedimento completo. Logo, o melhoramento do processo de preparação de amostras e o treinamento adequado do analista poderá diminuir em até 50% os erros (14). Ainda no âmbito do preparo de amostras; e de modo a garantir a adequada quantificação do(s) analito(s), é necessário que as substâncias a serem quantificadas ou detectadas, estejam totalmente solubilizadas na solução preparada, objetivo que pode ser atingido também pelo uso de outras técnicas, como ultrassom, como já mencionado anteriormente (8).

As amostras depois de preparadas são usualmente filtradas em filtros de seringa, contendo uma membrana de filtração, descartável e não reutilizável, ou ainda, membrana funcionalizada, que possui atividade química



**Figura 3.** Tempo empregado em uma típica análise cromatográfica. Fonte: Baseado em MAJORS (1991)



**Figura 4.** Fontes de erros durante uma análise cromatográfica. Fonte: Baseado em MAJORS (1991)

e reatividade alta a certos compostos. É importante a utilização de membranas compatíveis com os solventes empregados, para não ocorrer extração de componentes das membranas, que podem interferir no processo cromatográfico (7). Os filtros de membrana mais utilizados para análises cromatográficas típicas são os de celulose regenerada (CR ou RC, do inglês *regenerated cellulose*), acetato de celulose (AC ou CA, do inglês *cellulose acetate*), nitrato de celulose (NC ou CN, do inglês *cellulose nitrate*), nylon, poli-tetra-fluoro-etileno (PTFE, do inglês *Polytetrafluoroethylene*) e fluoreto de poli-vinilideno (PVDF, do inglês *Polyvinylidene Fluoride*). Um dos materiais mais utilizados é a celulose regenerada, por ter baixa reatividade e ser eficaz para amostras orgânicas, como por exemplo de hidrocarbonetos poliaromáticos, soluções aquosas multicomponentes, amostras biológicas, apresentando menor adsorção de proteínas e, proporcionando recuperação compatível para amostras de diversos tipos (15). Cabe ressaltar que existe variabilidade em materiais do mesmo tipo, empregados para fabricação do corpo do filtro de seringa, os quais são produzidos por fabricantes distintos, o que pode implicar em risco de contaminações indesejadas e diferentes umas das outras, a depender da marca comercial.

Alguns profissionais definem a marca e o fabricante do filtro, a fim de evitar quaisquer interferências por

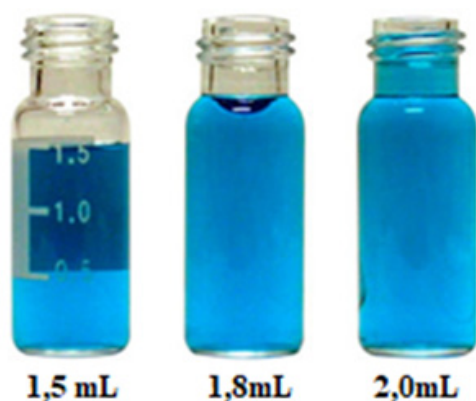
causa desta etapa do processo (16). Desse modo, é uma boa prática que se verifique possíveis interferências no uso de determinado tipo de filtro de seringa em um ensaio cromatográfico. Essa verificação deverá ser realizada tanto por meio de literatura técnica e/ou científica deste campo do conhecimentos, como através de ensaios de validação que comprovem, experimentalmente, a não interferência de nenhum material nas análises a serem realizadas.

A disposição das amostras em frascos (comumente e erroneamente chamados, em linguagem coloquial de laboratório, de *vials*, do inglês,) também se configura como importante, já que eles serão os suportes analíticos de armazenamento da amostra, durante todo o ensaio realizado pelo cromatógrafo. Após a colocação das amostras em seu interior, eles recebem uma tampa para que fiquem vedados até a retirada de uma alíquota para injeção no equipamento, impedindo desta forma a evaporação dos solventes. Essas tampas são acompanhadas dos septos que podem ser inteiriços ou apresentar um pré-corte pequeno na sua parte central, para facilitar a penetração da agulha no frasco. A escolha de uma tampa adequada a um amostrador de frascos é uma BPC, pois evita, por exemplo, que a agulha de injeção quebre ou entorte durante o processo de injeção das amostras, minimizando prejuízos financeiros e analíticos.

Os frascos de amostras cromatográficas para laboratórios de controle de qualidade podem ser de vidro borossilicato ou de poliuretano, sendo utilizados de forma geral os do primeiro tipo, já que o vidro é inerte e de baixa reatividade. Eles podem ser incolores ou de coloração âmbar, de acordo com a foto sensibilidade de cada analito. Podem possuir diferenças no seu corpo, bocal ou interior, e sua forma de fechamento com tampa pode ser com rosca ou por pressão (17). Nos equipamentos portadores de amostradores automáticos, o uso de frascos de 2 mL é padrão, estes possuindo 12 mm de largura e 32 mm de altura. Os mesmos podem ser utilizados na sua capacidade máxima, isto



é, até o gargalo do frasco, ou ainda, na marca de 1,5 mL, gravada no corpo do frasco, conforme se pode verificar na Figura 5 (17). Em alguns equipamentos, o preenchimento dos frascos até seu gargalo pode resultar em dados imprecisos, devido à produção de vácuo na agulha do amostrador, que ocasionaria uma sucção maior de amostra, gerando desvios nos resultados. Como BPC recomenda-se verificar junto o fabricante do cromatógrafo se a orientação do mesmo é usar o frasco com preenchimento total ou parcial de sua capacidade (15).



**Figura 5.** Diferentes tipos de preenchimento de frascos (*vials*) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Fonte: ANALÍTICA (2017)

Por fim, algumas técnicas de BPL auxiliam na diminuição da probabilidade de ocorrência de erros na análise cromatográfica, tais como: diluição e acerto do volume das amostras em temperatura adequada para o laboratório, cumprimento do protocolo de procedimento analítico reportado na literatura técnica e/ou científica, e observância da sequência correta de diluições, caso as soluções das amostras apresentem instabilidade química e/ou fotoquímica, a fim de evitar a utilização de amostras já degradadas (8).

## 2.2. Boas Práticas Cromatográficas para a manutenção e limpeza de equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e seus consumíveis.

### 2.2.1. Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas são indispensáveis para uma operação cromatográfica, já que é nelas que ocorrem as separações dos analitos, permitindo assim a sua quantificação, através de resultados comparados a um padrão preparado e também inserido no sistema, em concentrações conhecidas (12). Sem uma coluna cromatográfica em boas condições de uso, os resultados gerados podem estar comprometidos, não ocorrendo da forma pretendida a separação dos analitos.

Os entupimentos nas colunas cromatográficas ocorrem devido à formação de canais preferenciais de empacotamento na coluna, principalmente nas suas extremidades. Este fenômeno é, muitas vezes, irreversível, alterando a seletividade da coluna, já que pode ocorrer absorção de impurezas; que bloqueiam os sítios de adsorção das colunas e resultam em degradação química da fase estacionária.

A degradação química da coluna é ocasionada pelos reagentes que passam por seu interior, sendo que a vida útil de determinadas colunas se esvai devido à destruição da camada que recobre a sílica, no caso de colunas à base de sílica. Esse tipo de coluna possui estabilidade para trabalhar com solventes e soluções que estejam na faixa de pH de 2 a 8. O ideal é sempre consultar o fabricante, ainda que seja através do manual de operações contido na caixa da coluna, para identificar o pH de trabalho suportado pela mesma. Algumas colunas à base de sílica possuem faixa de pH de trabalho maior, operando entre valores de 1 e 12. A armazenagem correta da coluna também evita o fenômeno da degradação química, sendo que as colunas cromatográficas a base de sílica, que são maioria em laboratórios de controle de qualidade farmacêutico, devem ser armazenadas com solvente aprótico, para evitar a acidificação ocorrida pela liberação de prótons  $H^+$  contidas em solventes próticos.

Desse modo, colunas de fase reversa, contêm grupos hidrofóbicos, tais como C30, C18, C8, C4, C1, CN e fenila e, devem ser armazenadas em acetonitrila:água, na proporção 50:50, caso a coluna venha a ser utilizada em período inferior a um mês. Caso fique mais de um mês armazenada, recomenda-se aumentar a proporção de acetonitrila:água para 90:10.

Colunas específicas de alguns fabricantes deverão ser estocadas também em uma proporção maior de solvente orgânico, independente do tempo de guarda estipulado. Em alguns casos, o solvente de estocagem também é acetonitrila: água, na proporção 90:10. Desse modo, recomenda-se a verificação da proporção e do tipo de solvente de estocagem contido no certificado de garantia, ou ainda, o que for preconizado pelo fabricante da coluna. No caso das colunas de fase normal, de sílica, diol, nitro, ciano ou amino, recomenda-se a estocagem em hexano:isopropanol na proporção de 90:10(5). O adequado fechamento das pontas das colunas, com seus respectivos adaptadores de extremidades, possibilitam a vedação completa das mesmas, evitando que suas fases estacionárias sequem,

durante o período de sua armazenagem. Adicionalmente, o adequado condicionamento da coluna, isto é o tempo de equilíbrio necessário antes da realização da injeção das substâncias, minimiza uma possível degradação química, por conta do equilíbrio das substâncias da fase estacionária, garantindo assim uma melhor reprodutibilidade e evitando que ocorram desvios dos tempos de retenção dos ativos analisados (11). Em geral, é necessário que o equivalente a 20 volumes internos da coluna cromatográfica, traduzidos em fase móvel, fluam pelo sistema, para que sejam alcançadas as condições de equilíbrio (5). Levando em consideração um fluxo adequado de trabalho e o volume interno da coluna devido ao seu tamanho, chegar-se-á ao tempo estimado de equilíbrio de acordo com a Tabela 1.

Após o uso da coluna cromatográfica, a mesma deve ser submetida a um processo de lavagem, que terá como objetivo a remoção de pequenas sujidades que tenham sido levadas para o interior da coluna, ou ainda, a solubilização de micro cristais que possam ter se formado, devido ao uso de soluções tampão. Este procedimento minimiza a possibilidade entupimento

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

Dimensão da Coluna (mm)	Volume interno da coluna (mL)	Vazão (mL.min <sup>-1</sup> )	Tempo de equilíbrio estimado (s)
250 x 4,6	2,91	1,00	58
150 x 4,6	1,74	1,00	35
100 x 4,6	1,16	1,00	23
50 x 4,6	0,58	1,00	12
250 x 4,0	2,20	1,00	44
125 x 4,0	1,10	1,00	22
250 x 2,0	0,55	0,25	44
150 x 2,0	0,33	0,25	26
50 x 2,0	0,11	0,25	9

Fonte: Adaptado de DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES (2017)

do leito cromatográfico após seu uso ou mudança da seletividade da fase estacionária.

Conforme os Guias de Resolução de Problemas da *Waters Corporation* (2002), *Thermo Scientific* (2016) e *Agilent Technologies* (2016) dois tipos principais de limpezas para colunas cromatográficas: básica e profunda. O objetivo da limpeza básica é garantir que o período de estocagem futura não altere as condições físico-químicas da coluna, além de retirar pequenas impurezas ou cristais de sais do seu interior. Comumente, para cromatografia em fase reversa é usado água e acetonitrila para esse tipo de lavagem, podendo ser lavada de forma isocrática ou através de um gradiente destes dois solventes. É recomendada após o término de uma análise bem-sucedida, no que tange aos parâmetros cromatográficos (10). A limpeza profunda ou também regeneração da coluna, é uma limpeza com a utilização de diversos solventes, cujo objetivo é a restauração das condições físico-químicas ideais da fase estacionária, após a mesma estar apresentado problemas como por exemplo, distorção de picos e aparecimento de picos fantasmas. Alguns processos de regeneração são específicos para colunas de determinados fabricantes e outros assumem um caráter generalizado para outros tipos de coluna. Recomenda-se que a limpeza seja realizada de modo a não permitir o transporte dos solventes para dentro do detector do sistema cromatográfico, pois o mesmo conterà sujidades. Para tanto, a saída da coluna pode ser desconectada do equipamento, durante a limpeza, ou realizada com uma bomba avulsa, fazendo-se o recolhimento dos solventes usados para seu adequado descarte. Em algumas colunas, o processo terá um desempenho melhor se realizado em conjunto com a limpeza dos filtros de entrada e saída da coluna, conforme será visto ainda no item a seguir. Esses processos de limpeza profunda podem remover, ainda que pouco, parte da fase química ligada à  $\pi$  sílica e, por isso, não é apropriado que a saída do fluxo dos solventes esteja ligada a um detector de CLAE (10).

Para a limpeza básica de colunas de fase reversa com base de sílica, recomenda-se a passagem

inicial de água ultra purificada com acetonitrila na mesma proporção em que se encontram na fase móvel, equivalente a 10 ou 20 volumes da coluna. Neste momento, a coluna pode ser aquecida para temperatura entre 40 a 50 °C, caso sua temperatura de trabalho seja a ambiente, para forçar a solubilização de sais. Em seguida, efetua-se um gradiente, invertendo a proporção de água e acetonitrila, até que se atinja 90% de solvente orgânico e 10% de água. Novamente, este procedimento será realizado com a passagem do equivalente a 10 a 20 volumes da coluna cromatográfica da mistura de eluentes. Após a limpeza, a coluna cromatográfica será armazenada com uma proporção adequada de solvente orgânico e água, levando-se em consideração as especificidades do fabricante e do tempo estimado de guarda. Se caso a amostra tiver sido solubilizada em solventes orgânicos de baixa polaridade ou contenha substâncias que reconhecidamente se adsorvem com facilidade à fase estacionária, pode ser realizada antes da limpeza, injeções com tetra-hidro-furano (THF), com o objetivo de fazer a remoção dos materiais orgânicos que ainda estiverem adsorvidos na coluna (9). Em algumas colunas de fase reversa, não é indicada a passagem de 100% de água ou solução aquosa na coluna, ainda que exclusivamente para limpeza, pois devido ao tipo de revestimento de suas sílicas, pode ocorrer um colapso da fase hidrofóbica, levando justamente a um bloqueio do fluxo da fase móvel. Antes de qualquer procedimento de limpeza, é recomendado a leitura do manual de instrução da coluna, a fim de se detectar qualquer tipo de instrução relacionada a cuidados preventivos. Por isso é indicado que se inicie sempre uma limpeza com no mínimo 5% de solvente orgânico, ainda que se tenha utilizado uma fase móvel com grande concentração de sais (18).

Para colunas cromatográficas de fase normal, o processo de regeneração poderá ser realizado através da passagem de 30 a 50 mL dos seguintes solventes: hexano/octano/heptano, cloreto de metileno, isopropanol, THF, metanol e de mistura equivalente à fase móvel, que não contenha sais (9).

No caso de limpeza profunda para colunas de fase reversa à base de sílica, recomenda-se os seguintes procedimentos. Colunas cromatográficas que foram utilizadas, durante muito tempo, com amostras que dissolvidas em alguma proporção de água, devem ser primeiramente submetidas à passagem de água ultrapura. A passagem de 50 mL de água a 60 °C, além de 50 mL de metanol, 50 mL de acetonitrila, 25 mL de metanol e 25 mL de mistura equivalente à fase móvel, sem a presença de sais. (19). Ou ainda, 25 mL de mistura equivalente à fase móvel utilizada sem a presença de sais, 25 mL de metanol, 100 mL de acetonitrila, 25 mL de solução 75:25 de acetonitrila: isopropanol, 25 mL isopropanol, 25 mL cloreto de metileno e 25 mL de hexano (11). Por outro lado, aquelas colunas cromatográficas utilizadas durante muito tempo, com amostras que não foram dissolvidas em nenhuma proporção de água devem ser submetidas à passagem de 50 mL de isopropanol, 50 mL de cloreto de metileno, 50 mL de hexano, 25 mL de isopropanol e 25 mL de solução equivalente à da fase móvel, sem a presença de sais (19).

O processo de regeneração poderá ser potencializado pela limpeza dos filtros de entrada e saída da coluna. É uma prática que deverá ser realizada por analista experiente, a fim de não haver perda da fase estacionária da coluna, que culminaria em perda de eficiência e até na inutilização da coluna cromatográfica, conforme pode ser visto na Figura 6.

Por fim, seguem mais algumas BPC relacionadas ao uso das colunas cromatográficas, de acordo com Guias da *Agilent Technologies* (2016) e da *Thermo Scientific* (2016):

- Utilizar, preferencialmente, a coluna apenas na direção do fluxo marcada em seu corpo. Em caso de utilização no sentido invertido, manter esta condição até que seja realizado um processo de limpeza dos filtros. Isto evita o bloqueio de ambas as extremidades e mudanças bruscas no leito cromatográfico,

que podem alterar a seletividade e a resposta da coluna.

- Criar formulários individuais para cada coluna cromatográfica utilizada no laboratório, com o intuito de ter um registro documentado do histórico de desempenho da mesma. Esse formulário possuirá informações como os produtos analisados, caso o laboratório não trabalhe com colunas dedicadas a determinados produtos, fluxo de trabalho utilizado, pressão média de trabalho, além de informações que servem para medir o desempenho analítico da coluna, tais como assimetria e tempo de retenção dos picos analisados, além do número de pratos teóricos para compostos de interesse. Este formulário também poderá conter informações sobre em qual (is) equipamento (s) a coluna foi utilizada, se foi realizada limpeza ao término da análise, se a coluna respondeu ao ensaio em relação aos parâmetros metodológicos e até mesmo se a coluna foi utilizada no sentido indicado pelo fabricante ou no sentido invertido. É indispensável que este formulário possua um campo de observações, para que o usuário aponte fatos relevantes relacionados ao uso da coluna. Em caso de desativação da coluna, devido à perda de eficiência da mesma, sugere-se que seja colocado um anexo à coluna, contendo um cromatograma, para que em caso de troca de produto ou tentativa de recondicionamento da mesma, tenha-se a ideia do estado real em que a coluna se encontra.
- Utilizar conectores apropriados para a coluna, sejam eles de polietileno ou de aço inoxidável. Existem equipamentos que possuem conectores específicos para colunas de determinados fabricantes, não sendo possível adaptações, devido à especificidade



Figura 6. Passo a passo para limpeza do filtro de uma coluna cromatográfica de CLAE.

da coluna. Forçar a colocação de um conector, pode trazer prejuízos ao sistema e à coluna.

- Realizar uma limpeza básica sempre ao término de uma sequência de análises, ou ainda, em caso de uso intensivo. Determinar um número de análises para proceder-se à limpeza da coluna.
- Armazenar a coluna cromatográfica em ambiente com temperatura e umidades controladas, independente da coluna ser nova

ou usada. Ambientes com excessiva umidade podem provocar a formação de fungos na cabeça da coluna, somente pelo contato do ar, caso a mesma não esteja devidamente fechada.

- Evitar lugares com vibração mecânica para a armazenagem da coluna cromatográfica, assim como se deve minimizar a possibilidade de quedas ou movimentos bruscos com a mesma. Sem estes cuidados, pode ocorrer

deslocamento da fase estacionária e/ou alterações nos caminhos dos leitos cromatográficos, modificando a capacidade de resposta analítica da fase estacionária.

- Armazenar as colunas cromatográficas sempre na horizontal, para que não aconteça o deslocamento da fase estacionária para alguma das extremidades, caso a mesma seja armazenada incorretamente na vertical.
- Realizar o processo de regeneração da fase estacionária sempre que se observar pontos falhos na análise cromatográfica. Contudo, existem limites para a recuperação de uma coluna, não sendo possível fazê-lo diversas vezes.
- Realizar de forma separada a guarda das colunas cromatográficas novas e usadas, garantindo relatório de uso das colunas usadas e separação adequada para as colunas.

### 2.2.2. Cuidados e manutenção com equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os equipamentos de CLAE possuem canais de entrada para a passagem de soluções específicas. Alguns equipamentos possuem 2, 4, 6 e até 8 canais de entrada diferentes. Recomenda-se como BPC a utilização de canais dedicados, isto é, de canais específicos para determinadas soluções, caso a rotina do laboratório empregue largamente os mesmos tipos de solvente. Destaca-se que alguns equipamentos já vêm com a orientação de que tipo de solução ou solvente se deve utilizar em determinados canais, a fim de maximizar o desempenho em casos de métodos com gradiente de solvente (8).

Quando acontece a cristalização e posterior precipitação de sais, oriundos das soluções tampão dentro do sistema cromatográfico, podem ocorrer travamentos e desgastes das válvulas de retenção e dos

selos dos pistões, levando a uma possível quebra e danos à câmara de mistura da fase móvel. Isto induziria falhas no equipamento, levando a vazamentos, alterações no fluxo, mistura da fase móvel, que seriam detectados por alterações drásticas na pressão da bomba do equipamento (20).

A fim de proteger as tubulações de quaisquer partículas, além do processo de filtração, é recomendado como BPC, a utilização de filtros de fase móvel na entrada dos canais, garantindo assim que o eluente que percorrerá o leito cromatográfico não sofrerá interrupções. Esses filtros comumente são de aço inoxidável 316, de polietileno de altíssima densidade ou ainda de vidro de borossilicato com elemento filtrante poroso de 2µm, sendo facilmente limpos por processo de retro lavagem e sonicação (21).

De acordo com Agilent Technologies (2016) é recomendável a periodicidade de algumas boas práticas relacionadas a manutenção dos cromatógrafos. As mesmas estão apresentadas no Quadro 1.

### 2.2.3. A Técnica de Resolução de Problemas (Troubleshooting) como ferramenta de Boas Práticas de Cromatografia

O número de artigos científicos, teses ou dissertações que apresentam, de forma pragmática, a aplicação e os benefícios das BPC é reduzido. O referido tema é discutido por diversas vezes em Guias de Resolução de Problemas, onde são apresentados diversos desafios referentes à utilização da técnica de CLAE com suas respectivas resoluções e procedimentos para evitá-los, minimizá-los e/ou eliminá-los.

Defende-se, portanto, o incentivo à escrita de artigos científicos que discutam as BPC e também as soluções para os desafios que são encontrados durante a operação da CLAE. Sabe-se que as informações iniciais oferecidas a um analista, sem experiência prévia, transmitem algumas noções de BPC, mas isso ainda é incipiente quando comparado aos desafios e situações

**Quadro 1.** Boas Práticas Cromatográficas para manutenção de equipamentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Frequência de manutenção	Boas Práticas Cromatográficas recomendadas
Diária	Purgar cada canal, em que tenha ocorrido troca de solvente, com 2,5 mL a 3 mL, durante 5 min, para evitar transporte de bolhas.
	Aquecer a (s) lâmpada(s) durante, pelo menos, 1 hora, antes do início da análise.
	Equilibrar o sistema por 15 minutos antes da análise com os solventes de aplicação.
	Não deixar o frasco utilizado para lavagem do selo do pistão esvaziar. Colocar proporção de água ultrapura e solvente orgânico, conforme indicado no método de análise, a fim de evitar a precipitação de sal nas válvulas de retenção. Caso não seja indicado, utilizar a mesma proporção de água ultrapura e solvente orgânico contida na fase móvel empregada. A adequada limpeza dos selos garante a remoção de partículas, cristais de sal e outros resíduos não voláteis que podem danificar o pistão e os selos, além de que a limpeza garante a lubrificação da interface selo/pistão e o resfriamento dos pistões ao longo do uso.
	Ao término da análise, programar limpeza do sistema, para que fique nas tubulações do sistema cromatográfico, a solução de água/metanol na proporção 1:1.
Semanal	Purgar o amostrador do equipamento, seja antes ou depois de uma sequência de amostras. Alguns equipamentos já realizam a purga do amostrador de forma automática após a corrida de uma sequência de amostras.
	Realizar a limpeza do selo do pistão com solução de água e isopropanol (90:10)
	Lavar todos os canais com água (2,5 mL a 3 mL) durante 5 minutos para remoção de depósitos de sal que forem formados dentro do equipamento devido ao uso de soluções tampão. Em seguida repetir o procedimento com a solução destinada ao canal.
Longo Prazo em caso de não utilização	Inspeccionar os filtros de solvente quanto a sujeiras e bloqueios e limpar através de sonicação. Caso nenhum fluxo esteja saindo do canal, recomenda-se a troca de filtro.
	Realizar a limpeza externa dos módulos de CLAE, com tecido não tramado com água ultrapura, sem a utilização de solventes ou abrasivos químicos.
	Limpar o sistema todo com água ultrapura para remoção de solução tampão, além de depósitos de sais. Remover todas as amostras do amostrador. Realizar limpeza de todo o sistema com solução de água/metanol na proporção 1:1. Desligar o equipamento da rede elétrica.

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

vividas em uma rotina de laboratório de controle de qualidade. Atualmente, em muitas ocasiões, só é possível compreender um problema cromatográfico depois que ele foi detectado e resolvido. A prevenção de situações como esta só surge depois que o dano já ocorreu. Inclusive, em alguns casos, problemas relacionados à

cromatografia são demorados para serem descobertos, justamente por falta de um método adequado para a abordagem preventiva ou corretiva dos mesmos (20).

De acordo com Neto (2009), a “abordagem de resolução de problemas em cromatografia tem o objetivo de observar, isolar e corrigir problemas, de maneira

direta, simples, racional e eficiente”. Assim, através da elaboração de um método prático de resolução de problema, é possível a pronta identificação dos mesmos, a identificação eficiente de suas causas e a solução ágil, de forma a corrigi-los e evitá-los em futuras utilizações.

É importante destacar que o uso da abordagem de resolução de problemas para cromatografia não elimina a necessidade da visita de técnicos especializados para correções e ajustes nos equipamentos de CLAE, já que existem procedimentos que podem ser realizados apenas por analistas devidamente treinados e outros que só podem ser implementados por assistência técnica especializada. É importante que o analista saiba em qual momento ele deve solicitar auxílio especializado. Realizar resolução de problemas cromatográficos não significa ter acesso ilimitado à manutenção e operacionalização do equipamento de CLAE (20).

A seguir são listados passos para uma correta resolução de problemas cromatográficos, adaptado de NETO (2009), inserindo-se, após cada parágrafo, frases simples em negrito, que pretendem trazer um lembrete mnemônico ao analista de CLAE.

a) O operador deve conhecer um pouco da teoria geral de cromatografia, e de forma mais profunda, da técnica de CLAE, incluindo noções relacionadas aos equipamentos em que estiver operando. Existem situações que se aplicam a alguns cromatógrafos, independente do fabricante e outras que serão únicas e exclusivas de determinados modelos de CLAE, devido a suas particularidades. O operador precisa ser observador, cuidadoso e monitorar o equipamento antes, durante e depois de cada análise. **O conhecimento e observação são requisitos essenciais para qualquer etapa analítica.**

b) A prevenção de certas falhas e o planejamento da adequada manutenção é indispensável para a adequada Resolução de Problemas cromatográficos, minimizando concomitantemente os custos. **A prevenção evitará gastos desnecessários em ações corretivas.**

c) Toda e qualquer alteração precisará ser devidamente documentada nos cadernos ou livros de registros do equipamento. Assim evita-se, por exemplo, que uma determinada peça danificada seja reutilizada em outro cromatógrafo. A abertura de registro de ocorrência é indispensável para o planejamento da manutenção do laboratório, além do manutenção das anotações do histórico dos problemas, assim como das soluções encontradas. **Sem registro, perde-se o histórico das resoluções encontradas.**

d) Todo o problema a ser resolvido, precisa ser abordado de forma linear e lógica. Qualquer alteração deverá ser realizada de forma individual, para que se localize rapidamente um determinado problema. Se o analista realiza a mudança de duas variáveis para uma problemática, qual terá sido a causa raiz do problema? A realização dos testes individuais é o caminho para se isolar um problema, reconhecendo-o de forma rápida. **As variáveis de um problema devem ser alteradas uma por vez.**

e) Quando houver a suspeita de identificação do problema, importante testar as variáveis para confirmar se realmente a causa raiz foi identificada. **A resolução de um problema só poderá ocorrer se houver a certeza da identificação do problema.**

f) A troca de peças, consumíveis ou partes que estejam sob dúvidas de mau funcionamento por outras novas ou que sabidamente sejam identificadas como boas, garantirá que a causa raiz foi corretamente identificada. **A reutilização de peças danificadas ou impróprias não auxiliará na resolução do problema.**

g) Deve-se realizar a divulgação da compilação de relatórios de mudanças no equipamento para todos os que usam os cromatógrafos no laboratório. A criação de um formulário que facilite o registro do problema, seus indícios de surgimento, origens e posteriores soluções, trará a economia de tempo almejada, caso o mesmo problema ocorra com outro operador. Em determinados ensaios, por particularidades dos métodos e dos ativos



sob análise, alguns problemas são recorrentes. **A divulgação e compartilhamento de informações relevantes melhoram a qualidade da rotina analítica do laboratório.**

### 3. Comentários finais

As BPC se apresentam como ferramentas indispensáveis aos laboratórios de controle de qualidade pertencentes à indústria farmacêutica, e formam os alicerces técnicos para a sustentabilidade e segurança na aplicação das técnicas de cromatografia. É inegável que existem diferenças técnicas relacionadas a diferentes equipamentos, consumíveis e *software*, portanto, é necessário que as BPC sigam preceitos harmonizados, através da definição de conceitos gerais, com o intuito de normalizar o conhecimento comum.

Recomenda-se a realização de mais pesquisas, que promovam cruzamentos de informações de diversos fabricantes, além do desenvolvimento de novos procedimentos, que aliados a testes práticos, possam mensurar, de forma inequívoca, o benefício da aplicabilidade das BPC para a indústria farmacêutica. É possível inferir que com a adoção das BPC os resultados obtidos tenderão a ser mais confiáveis e robustos, pois serão oriundos de sistemas e processos cromatográficos que atingirão uma maximização de seu desempenho. Tais resultados atenderão aos requisitos dos órgãos reguladores, além de proporcionar, possivelmente, uma redução de custos para o usuário. Defende-se, portanto, que o emprego das BPC seja realidade dentro dos laboratórios de controle de qualidade farmacêutico, onde a cultura da prevenção acaba não sendo, em alguns casos, mais interessante do que a cultura da correção ou reparo.

## Referências

- [1] Valécio, M. Como escolher um HPLC para o controle de qualidade na indústria farmacêutica. Instituto de ciência, tecnologia e qualidade 2018. Disponível em: <http://www.ictq.com.br/industria-farmaceutica/641-como-escolher-um-hplc-para-o-controle-de-qualidade-na-industria-farmaceutica>. Acesso em 10 Abril 2020
- [2] Ahuja S, Dong MW. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Oxford: Elsevier Academic Press; 2005. 6 v..
- [3] Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 17 - 16 de Abril de 2010. Brasília. 2010.
- [4] Inmetro. Princípios das Boas Práticas de Laboratório - BPL - Norma nº NIT-DICLA-035. (2011)
- [5] Dc Tech Laboratory Technologies. O Guia Definitivo de solução de problema sem HPLC. São Paulo. 2017.
- [6] Dc Tech Laboratory Technologies. Compatibilidade de solventes e reagentes com sistemas HPLC. Blog da DC Tech Laboratory Technologies, 2017. Disponível em <https://www.dctech.com.br/compatibilidade-de-solventes-e-reagentes-com-sistemas-hplc/>. Acesso em 10 de Abril de 2020
- [7] Thermo Scientific. A Troubleshooting Guide - Successful HPLC Operation, 2016.
- [8] Agilent Technologies. Boas práticas para usar um sistema de LC Agilent. 2016. Disponível em [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/BestPractice\\_pt-BR.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/BestPractice_pt-BR.pdf), Acesso em 10 de Abril de 2020
- [9] Costa, G. M. Sugerencias para el uso de equipos de CLAE. Universidade Federal de Santa Catarina. Escola de Verão em Farmacognosia. Fevereiro 2010.
- [10] Waters Corporation. HPLC Troubleshooting Guide. 2002. Disponível em [http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1528445&locale=pt\\_BR](http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1528445&locale=pt_BR). Acesso 10 de Abril de 2020
- [11] Agilent Technologies. Column User Guide for Agilent reversed-phase columns. Agilent Technologies, 2014.
- [12] Anvisa. Farmacopéia Brasileira. 6ª Edição. Ed. Brasília. 2019.
- [13] Fiorucci, Soares e Cavalheiro. O Conceito de Solução Tampão. Revista química nova na escola. v. 13, p 18-21
- [14] Majors, RE. An Overview of Sample Preparation. LC-GC, 9, 16-20, 1991.
- [15] Agilent Technologies, in Sample Preparation Fundamentals for chromatography. Disponível em [https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf). Acesso em 10 de abril de 2020
- [16] Meio Filtrante. Preparação de amostras para análises cromatográficas. Revista e Portal Meio Filtrante, São Paulo, n. 7ª, Novembro / Dezembro, 2003
- [17] Analítica. Frascos vials para cromatografia 2mL, 2017. Disponível em: [https://www.analiticaweb.com.br/produtos\\_detalle.php?tit=vial-para-cromatografia-2-ml-snap-cap-crimp-rosca&Bid=p46f01655483af](https://www.analiticaweb.com.br/produtos_detalle.php?tit=vial-para-cromatografia-2-ml-snap-cap-crimp-rosca&Bid=p46f01655483af). Acesso em 10 de Abril de 2020
- [18] Krepich, S. Reversed-Phase HPLC Column Cleaning and Regeneration. Phenomenex. [S.l.], p. 1-2. (2009)
- [19] Supelco-Aldrich Inc. Bulletin 781E. How to Protect Your HPLC Column and Prolong Its Life, 2008. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4487.pdf>. Acesso em 10 de Abril de 2020
- [20] Neto, Á. J. D. S. Uma visão técnica para a compreensão e resolução de em sistema de cromatografia líquida. Scientia Chromatographica, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 83-96, 2009.
- [21] Sigma-Aldrich. Bulletin 826E - HPLC Troubleshooting Guide. (2008). Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4497.pdf>. Acesso em 10 de Abril de 2020.