



**UAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Universidade do Algarve**

**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**As normas GLP na indústria farmacêutica: aplicação a um estudo de  
impurezas desconhecidas da limeciclina**

Lurdes Cristina Sardinha Granadeiro

**Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biológica**

2017



**UAlg**

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Universidade do Algarve**

**Faculdade de Ciências e Tecnologia**

**As normas GLP na indústria farmacêutica: aplicação a um estudo de  
impurezas desconhecidas da limeciclina**

Lurdes Cristina Sardinha Granadeiro

**Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biológica**

2017

“Não sou nada.  
Nunca serei nada.  
Não posso querer ser nada.  
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

*Álvaro de Campos*

# **As normas GLP na indústria farmacêutica: aplicação a um estudo de impurezas desconhecidas da limeciclina**

## **Declaração autoria do trabalho**

Eu, Lurdes Cristina Sardinha Granadeiro declaro ser autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluídas.

A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Copyright*® 2016 Universidade do Algarve, Portugal

## **Agradecimentos**

Como em todas as grandes obras há pilares que são essências, os meus foram três.

A Universidade do Algarve que me acolheu, a todos os meus professores que ajudaram a desenhar o meu percurso académico e mais particularmente ao professor Dr. Rui Borges que prontamente me esclareceu todas as dúvidas e incertezas, o meu obrigado.

A AtralCIPAN deu-me a oportunidade de viver o dia-a-dia de uma indústria, enriquecendo a minha formação profissional e viver experiências em um ambiente empresarial nomeadamente no laboratório de investigação e desenvolvimento da Cipan, agradeço á minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Dália por me guiar neste trabalho, ao João Manso que me acompanhou pacientemente ao longo do meu estágio ao Eng<sup>o</sup> Queiroga que me ajudou a pensar mais além e me transmitiu alguma da sua vasta sabedoria e à Dr.<sup>a</sup> Sandra Ribeiro que me colocou no caminho da qualidade. Agradeço a todos os trabalhadores da CIPAN com que me cruzei e foram sempre disponíveis em me ajudar, o Eng<sup>o</sup> Carlos Santos, Tânia, Dr.<sup>a</sup>Anabela e Eng<sup>o</sup> Pedro Frazão.

A minha família, mãe, pai e irmão que me apoiaram sempre e nunca deixaram de acreditar em mim, o meu muito obrigado. Ao meu namorado, que me fez sorrir nas horas mais sombrias. Aos meus amigos, cujo ombro foi sempre disponível, paciente e motivador, ao Zé e ao João por darem parte deles o meu obrigado.

## Resumo

O aumento da qualidade antes, durante e após a produção de antibióticos ou produtos farmacêuticos é cada vez mais valorizada. Para produzir e reproduzir dados fiáveis um laboratório deverá obedecer às GLPs. Foi ao encontro dessa necessidade que surgiu a qualificação de equipamentos como medidores de pH e a organização do armazenamento e base de dados de reagentes, posteriormente aplicou-se essas normas no estudo de uma impureza de um API.

O estágio na empresa farmacêutica ATRALCIPAN originou este estudo, que teve por objetivo primário o desenvolvimento de métodos e técnicas de investigação em contexto laboratorial. Num primeiro momento procedeu-se à qualificação de equipamentos, especificamente medidores de pH do qual resultaram vários documentos, como relatório de operacionalidade, *checklist* de manutenção, instruções técnicas e protocolos de qualificação. Em seguida realizou-se a organização do armazém de reagentes e da base de dados correspondente, onde foi efetuada a triagem de reagentes de forma a minimizar o risco e melhorar o armazenamento de reagentes. Esta tarefa possibilitou uma maior utilidade da base de dados, até ao momento pouco usada. Por fim, foi desenvolvido um trabalho com o objetivo de isolar e identificar impurezas desconhecidas de um API do portfólio da CIPAN - a limeciclina - através do HPLC e posteriormente usando um sistema LC-MS. Este foi efetuado através da parceria que a CIPAN tem com o EDQM e poderá resultar na atualização da monografia da limeciclina na Farmacopeia Europeia.

Deste modo, melhoraram-se os pilares da qualidade e da qualificação, podendo assim haver uma certificação GLP para o laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN a partir de uma entidade externa credenciada para o efeito. Foram alargados conhecimentos e exploradas novas ferramentas de armazenamento, que permitiram uma melhoria da gestão de reagentes em laboratório, através do estudo do API foi possível observar o comportamento de impurezas em diferentes métodos cromatográficos.

**Palavras chave:** Qualidade; Qualificação de equipamentos; armazenamento de reagentes; Farmacopeia Europeia; limeciclina; impurezas.

## **Abstract**

Nowadays, the quality in the production of antibiotics or pharmaceutical products is highly valued and the laboratories developing reliable data are subject to a set of rules. That is why the need to qualify equipment like pH meters, or the organization, storage and creation of reagent inventories was developed.

My internship at ATRALCIPAN is the base of this study, with its main objective being the development of research methods and techniques in laboratories. The first step was to qualify equipment, such as pH meters, from which several documents were produced: operational reports, maintenance checklists, technical instructions, and qualification protocols. Next, I focused on the organization, storage, and creation of a reagent inventory, to minimize the risk and improve the stock storage. This task contributed to a better use of the database. Lastly, a HPLC study was conducted to isolate and identify the unknown lymecycline impurities by using MS to determine its structure. This study was carried out in cooperation between CIPAN and EDQM, and its aim was to update the lymecycline monograph in European Pharmacopoeia. Several tests were conducted so as to choose a lot, assemble and analyze samples, and finally, to analyze fractions.

The work developed contributed to the improvement of the basic structure of quality and qualification in order to develop a GLP certification for CIPAN's laboratory from an external entity accredited for this purpose. This experience represented the possibility of acquiring new knowledge and working with new storage tools that allow for an improvement of the management of reagents in the laboratory. Through the study of the API it was possible to observe the behavior of impurities in different chromatographic methods.

**Keywords:** Quality, Equipment qualification, Reagent storage, European Pharmacopoeia, Lymecycline.

# Índice

Estrutura da dissertação	XIV
CIPAN	XV
Capítulo 1 - Qualificação de Equipamento	16
1.1 Introdução	17
1.1.1 Fundamentos e perspectiva histórica das GLP	17
1.1.2 Pontos fundamentais das GLP	18
1.1.3 Segurança em laboratório	19
1.1.4 Reagentes, soluções e padrões	19
1.1.5 Documentação/ Instruções técnicas (SOP – Standard Operation Procedure)	19
1.1.6 Qualificação de instrumentos analíticos	21
1.1.6.1 Qualificação do Design (QD)	21
1.1.6.2 Qualificação da Instalação (QI)	22
1.1.6.3 Qualificação de Operação (QO)	22
1.1.6.4 Qualificação de Desempenho (QD)	23
1.1.7 Calibrações e manutenções	23
1.1.8 Medidor pH	24
1.1.8.1 Aparelho de medição de pH	24
1.1.8.2 Método	25
1.2 Materiais e métodos	26
1.2.1 Materiais, reagentes e equipamentos	26
1.3 Resultados e Discussão	27
1.4 Conclusões e perspectivas futuras	30
Capítulo 2 - Armazém de reagentes	31
2.1 Introdução	32
2.1.1 Aquisição de químicos	32
2.1.2 Armazenamento de químicos	33
2.1.3 Manuseamento químico	33
2.1.4 Inventário de químicos	33
2.1.5 Transporte, transferência e remessa de químicos	34
2.1.6 Destruição/ remoção de produtos químicos	34
2.1.7 Lean thinking	35
2.2 Materiais e Métodos	37
2.2.1 Inventário de Reagentes	37
2.2.2 Base de dados de Reagentes	38
2.2.3 Reagentes na Câmara Frigorífica	38
2.3 Resultados e Discussão	38
2.4 Conclusão e perspectivas futuras	45
Capítulo 3 - Estudo de impurezas desconhecidas da Limeciclina	46
3.1 Introdução	47
3.1.1 Farmacopeia Europeia e European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)	49
3.1.2 Tetraciclinas	49
3.1.3 Limeciclina	50
3.1.4 Método analítico de HPLC	52
3.2 Materiais e Métodos	55
3.2.1 Materiais, reagentes e equipamento	55
3.2.2 Condições dos métodos	55

3.3	Discussão de resultados	58
3.3.1	Amostra de limeciclina no método A e B	58
3.3.2	Recolha de frações no método A e identificação de impurezas no método A e B	64
3.3.3	Recolha de frações no método B e identificação de impurezas no método A e B	68
3.4	Conclusão e perspetivas futuras	70
	Bibliografia	71
	Anexos	73
	Anexo I – Guia de instrução de medidor de pH 301 Hanna Instruments.	74
	Anexo II – KIT limpeza e manutenção de medidores de pH e elétrodos.	75
	Anexo III - Checklist manutenção e limpeza de medidores de pH e elétrodos	76
	Anexo IV - Relatório de operacionalidade de medidores pH no laboratório I&D	80
	Anexo V - Calibração, Funcionamento e Manutenção do Medidor de pH 301, Hanna Instruments, 290PH001	92
	Anexo VI -Protocolo de qualificação de instalação do medidor de pH 301 Hanna Instruments	99
	Anexo VII - Protocolo de qualificação de operação do medidor de pH 301 da Hanna Instruments, 290PH001	109
	Anexo VIII - Protocolo de qualificação de desempenho do medidor de pH 301 Hanna Instruments, 290PH001	118
	Anexo X – Preparação das soluções de reagentes	127
	Anexo XI – Preparação de fase móvel A e B	128
	Anexo XII – Preparação das soluções de amostras e padrão	129

# Índice de ilustrações

Ilustração 1 - Os sete princípios da filosofia lean thinking <sup>16</sup> .....	35
Ilustração 2 - A prática 6S (5+1) e a eliminação de desperdício <sup>16</sup> .....	36
Ilustração 3 - Etiqueta Cipan. ....	39
Ilustração 4 - Painel de navegação de base de dados. ....	39
Ilustração 5 - Ficha de produto.....	40
Ilustração 6 - Esquema passo-a-passo de armazenamento de reagentes novos. ....	41
Ilustração 7 - Esquema do estudo de impurezas de limeciclina. ....	48
Ilustração 8 - Impurezas de limeciclina.....	51
Ilustração 9 - Representação esquemática com componentes de um HPLC. A – Reservatório de eluentes; B- conjunto de bombas; C – coluna; D – injetor e amostras; E – detector; F- Desperdício; G – Sistema de controlo e aquisição de dados.....	54
Ilustração 10 - Solução resolução e) (cf. Anexo XII, preparação de amostras e padrões) com os padrões de impurezas de tetraciclina analisados no método A .....	58
Ilustração 11 - Solução de anidrotetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B .....	59
Ilustração 12 - Solução de epianidrotetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B.....	60
Ilustração 13 - Solução de epitetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B. ....	60
Ilustração 14 - Solução resolução e) (cf. Anexo XII, preparação de amostras e padrões) com os padrões de impurezas de tetraciclina analisados no método B. ....	61
Ilustração 15 - Solução limeciclina lote 305.40068 1 3 analisada no método A. ....	62
Ilustração 16 - Solução de limeciclina no método B.....	63
Ilustração 17 - Fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, no método A.....	64
Ilustração 18 - Fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, método B. ....	65
Ilustração 19 - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.....	65
Ilustração 20 - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B. ....	66
Ilustração 21 - Fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método A.....	67
Ilustração 22 - Fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método B. ....	67
Ilustração 23 - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.....	68
Ilustração 24 - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B. ....	69

# Índice de tabelas

Tabela 1 - O que é necessário para realizar o inventário (Esq.) e o que deve conter(Dir.).	34
Tabela 2 - Dados da ficha de produto adicionados.	42
Tabela 3 - Separação de reagentes através do grupo funcional.	42
Tabela 4 - Separação dos reagentes tendo em conta o seu perigo.	43
Tabela 5 - Separação de acordo com a incompatibilidade química, baseada na classificação de cada reagente.	44
Tabela 6 – Parâmetros do método cromatográfico A (FE)	55
Tabela 7 – Parâmetros do método cromatográfico B (EDQM)	56
Tabela 8 - Dados relativos às impurezas de tetraciclina na solução resolução no método A	58
Tabela 9 - Tempos de retenção das impurezas da limeciclina definidas na monografia da farmacopeia europeia.	58
Tabela 10 - Dados relativos à solução de anidrotetraciclina no método B.	60
Tabela 11 - Dados relativos à solução de epianidrotetraciclina no método B.	60
Tabela 12 - Dados relativos à solução de epitetraciclina no método B.	60
Tabela 13- Dados relativos às impurezas de tetraciclina na solução resolução no método B	61
Tabela 14 - Dados relativos á solução de limeciclina no método A	62
Tabela 15- Dados relativos à solução de limeciclina no método B	63
Tabela 17 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, método B.	65
Tabela 18 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.	66
Tabela 19 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.	66
Tabela 20 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método A.	67
Tabela 21 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método B.	68
Tabela 22 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.	69
Tabela 23 - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.	69

# Abreviaturas, siglas e símbolos

API – Active Principal Ingredient

CAS – Chemical Abstract Service

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare

EPA – Environmental Protection Agency

EPI – Equipamento de proteção individual

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

FE – Farmacopeia Europeia

GLP – Good Laboratory Practices

GMP – Good Manufacturing Practices

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

I&D – Investigação e Desenvolvimento

ICH – International Conference on Harmonisation

LC – Liquid Chromatography

LC-MS – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Espectrometria de Massa

MSDS – Material Safety Data Sheet

NIST – National Institute of standards and Technology

OCDE – Organisation for Economic Co-operation and Development

QD – Qualificação de Design

QI – Qualificação de Instalação

QO – Qualificação de Operação

QD – Qualificação de Desempenho

R/S – Frases de risco e segurança

RNA – Ácido Ribonucleico

SOP – Standard Operating Procedures

USP – United States Pharmacopoeia

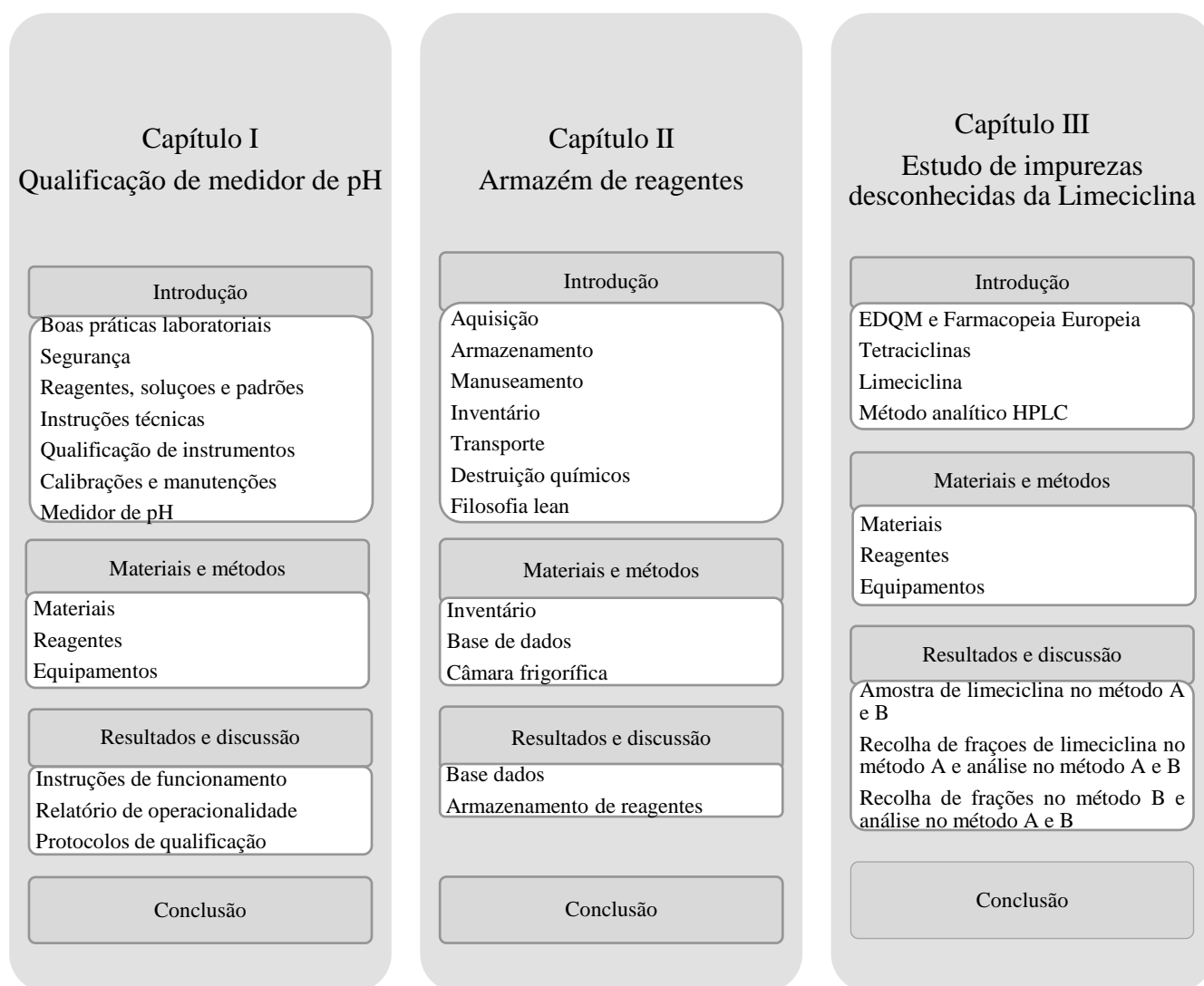
UV – Ultravioleta

VICH - International Cooperation on Harmonisation of technical Requirements for Registration of veterinary Medicinal Products

# Estrutura da dissertação

A dissertação está dividida em três capítulos. Todos os capítulos iniciam-se com a introdução ao assunto abordado, seguindo-se os métodos e discussão de resultados.

No primeiro capítulo abordou-se a qualificação de equipamentos, em particular dos medidores de pH. Este trabalho de preparação de qualificação gerou documentos importantes para a realização da qualificação propriamente dita. O segundo capítulo é composto pela reorganização do armazém de reagentes e base de dados, um trabalho realizado em paralelo com os restantes e a partir do qual se desenvolveram métodos e ferramentas de organização de armazenamento de reagentes em laboratório. O terceiro capítulo contém o estudo de impurezas desconhecidas do antibiótico limeciclina para, através da técnica de HPLC, determinar a localização em cromatograma das impurezas desconhecidas de forma a poder determiná-las estruturalmente.



## CIPAN

A CIPAN é uma companhia farmacêutica dedicada á pesquisa, desenvolvimento e produção de princípios ativos para a indústria farmacêutica, principalmente com ação anti-infecciosa. Fundada em 1963 pelo comendador Sebastião Alves, esta empresa familiar situa-se na Castanheira do Ribatejo, freguesia do concelho de Vila Franca de Xira.

A principal área de atuação ao nível de produção e desenvolvimento da CIPAN são os antibióticos da família das tetraciclínas, como a limeciclina e oxitetraciclina cálcica (tetraciclínas de 1ª geração), cloridrato de minociclina (tetraciclina de 2ª geração), entre outros com processo já estabelecido, e outros ainda, em fase de desenvolvimento.

A CIPAN exporta praticamente a totalidade da sua produção para mercados altamente regulados, e em particular para o mercado Norte-Americano, onde é obrigada a cumprir requisitos rigorosos e alvo de inspeções periódicas da FDA.

Como reconhecimento do vasto conhecimento técnico e científico da CIPAN na área dos agentes anti-infecciosos, a empresa é muitas vezes chamada a colaborar com entidades nacionais e internacionais. Destaca-se a este respeito a presença de um membro da CIPAN como perito representante da autoridade nacional do medicamento (INFARMED), no seio do organismo que regulamenta o mercado europeu, mais concretamente no *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM), no qual se discutem as monografias que fazem parte da Farmacopeia Europeia (FE).

# **Capítulo 1 - Qualificação de Equipamento**

---

## 1.1 Introdução

A qualificação de equipamentos, uma subárea da validação, baseia-se nas boas práticas laboratoriais (GLP) e de fabrico (GMP). Avalia-se de forma sistemática o equipamento, demonstrando que o mesmo está preparado para ser usado para o fim a que se destina, e que os resultados obtidos com o mesmo são fiáveis. Faz parte das obrigações da empresa no sentido de garantir as boas práticas. A qualificação de equipamentos, no laboratório de I&D ou num outro qualquer sector da empresa, surge numa ótica de minimização de riscos tendo em conta a qualidade dos resultados obtidos pela sua utilização e, em última análise, a qualidade dos produtos analisados/produzidos. A certificação de boas práticas, sejam elas de fabrico ou laboratoriais, apenas é possível quando o sector/organismo utiliza equipamentos previamente qualificados nos processos de produção/controlado de qualidade.

### 1.1.1 Fundamentos e perspetiva histórica das GLP

O conceito de boas práticas laboratoriais (GLP) foi introduzido na década de 70, destinando-se a proporcionar uma base regulamentar de modo a garantir que os relatórios e estudos existentes refletem de forma fiel o trabalho experimental realizado.

De acordo com a OCDE, as boas práticas laboratoriais definem-se como: “...um sistema de qualidade relacionada com o processo de organização e as condições a que os estudos de saúde não clínicos e ambientais são planeados, executados, acompanhados, registados, arquivados e apresentados.”<sup>1</sup>

Estes princípios podem ser considerados como a base para a qualidade, confiabilidade e integridade dos estudos, de conclusões comprovadas e rastreabilidade de dados.

No ano de 1970, nos E.U.A., começou a surgir uma preocupação relativamente à veracidade de determinados relatórios e estudos submetidos à *Food and Drug Administration* (FDA). Como resultado foi implementada uma regulamentação de GLP's por parte da FDA. Posteriormente a *Environmental Protection Agency* (EPA) encontrou problemas semelhantes e decidiu implementar as suas próprias regulamentações GLP. Na Europa a OCDE seguiu os mesmos passos com o intuito de evitar a repetição de estudos.

Estavam então lançados os pilares para validade de dados. Os princípios de GLP constituíram-se como um pré-requisito à aceitação de dados científicos provenientes de

estudos laboratoriais. Hoje em dia já são usados universalmente, uma vez que estão estabelecidos no ensino e, por consequência, cada vez mais os laboratórios produzem dados e estudos válidos. A nível industrial são essenciais sempre que as atividades desenvolvidas no laboratório possam ser utilizadas em processos que requeiram a certificação cGLP (processos envolvendo novos produtos a introduzir no mercado, ou alterações de dossiers relativos a produtos já produzidos na empresa)<sup>2-3</sup>.

Em Portugal, a autoridade que regula a conformidade com os Princípios OCDE das *Good Laboratory Practices* (GLP), no domínio dos produtos cosméticos e farmacêuticos, é o INFARMED, conforme disposto no artigo 6.º do Decreto-Lei nº 99/2000, de 30 de maio.

### **1.1.2 Pontos fundamentais das GLP**

As boas práticas laboratoriais remetem para os seguintes pontos fundamentais:

- 1) recursos – a organização, pessoal, instalações e equipamentos;
- 2) regras – protocolos, procedimentos operacionais padrão e conceito de diretor de estudo como ponto central de controlo do estudo;
- 3) caracterização – itens de teste e sistemas de teste;
- 4) documentação – dados obtidos, relatório final e arquivo de dados;
- 5) garantia da qualidade – independência da condução do estudo.

De acordo com a regulamentação das boas práticas de laboratório os organismos de pesquisa e os seus trabalhadores, que devem ser em número suficiente, deverão ter responsabilidades definidas, bem como educação e formação ajustada à tarefa que realizam. As instalações e os equipamentos que a compõem têm de ser adequados aos estudos a realizar. O espaço tem de ser amplo, sem contaminações e possuir serviços necessários (água, eletricidade, etc.). Os equipamentos devem estar validados, qualificados, calibrados e ter programa de manutenção.

Todos os estudos realizados em conformidade com as GLP devem ter um planeamento adequado e surgir descritos em protocolos de estudo. Procedimentos adequados devem ser preparados e todas as alterações aos mesmos devem ser registadas. Os detalhes técnicos do estudo estão descritos nos procedimentos operacionais padrão (do inglês *Standard Operational Procedures* ou SOP's), assim como todos os materiais usados e as suas características. Após a realização do estudo os dados obtidos são interpretados pelo investigador responsável pela sua execução e compilados sob a forma

de um relatório. É responsabilidade do diretor do estudo a verificação do relatório e o seu arquivamento em local seguro, para poder ser facilmente acedido em caso de necessidade.

Todos estes documentos devem ao longo dos anos ser revistos à luz do estado de arte, quando solicitado, ou na data previamente estabelecida para a sua revisão. Embora o diretor de estudo seja responsável por este estar em conformidade com as GLP, quem verifica a correta aplicação das GLP é uma equipa externa/independente<sup>2,4</sup>.

### **1.1.3 Segurança em laboratório**

O bem-estar do indivíduo assim como o de quem o rodeia irá depender de uma utilização consciente e responsável dos meios à sua disposição, e não apenas do cumprimento de regras institucionalizadas. É, no entanto, necessário que um responsável observe as vulnerabilidades do laboratório e de acordo com elas implementar regras de segurança e ao mesmo tempo promover as GLPs. O departamento de higiene e segurança no trabalho, quando existente, deve também incentivar e promover a formação de operadores e as boas práticas de higiene e segurança laboratoriais<sup>5</sup>.

### **1.1.4 Reagentes, soluções e padrões**

Todos os reagentes e soluções nas áreas laboratoriais devem ser rotulados de forma a facilitar a sua identificação, título ou concentração, requisitos de armazenamento e prazo de validade. Reagentes deteriorados ou com prazos de validade ultrapassados não devem ser usados<sup>6</sup>.

### **1.1.5 Documentação/ Instruções técnicas (SOP – Standard Operation Procedure)**

Deve ser estabelecido um protocolo escrito que especifique a forma como a qualificação e a validação serão realizadas. O protocolo deve ser revisto e aprovado, especificando as etapas críticas e os critérios de aceitação. Deve ser elaborado um relatório com referências cruzadas ao protocolo de qualificação e/ou validação, que resuma os resultados obtidos, comente eventuais desvios observados, e do qual se retirem

as devidas conclusões, incluindo a recomendação de alterações requeridas para corrigir anomalias. Quaisquer alterações ao plano definido no protocolo devem ser documentadas com justificação apropriada. Após conclusão de uma qualificação satisfatória deve ser efetuada uma aprovação formal para a etapa seguinte de qualificação e validação sob a forma de uma autorização por escrito.<sup>7,8</sup>

Para garantir a qualidade e integridade dos dados gerados pela instalação do ensaio devem ser escritos e aprovados procedimentos operacionais padrão pelo responsável de laboratório. Cada área deve ter disponíveis procedimentos habituais e relevantes para o funcionamento das atividades nela realizada, devendo os mesmos incluir como anexos: livros de texto publicados, métodos analíticos, artigos científicos e manuais. Os desvios aos procedimentos habituais de funcionamento relacionados com o estudo devem ser documentados e reconhecidos pelo diretor de estudo e investigador principal, conforme aplicável.

Devem estar disponíveis procedimentos operacionais padrão para as seguintes categorias:

1) – testes e itens de referência: receção, identificação, rotulagem, recolha de amostras e armazenamento;

2) – equipamentos, materiais e reagentes: aparelho de utilização, manutenção, limpeza e calibração, validação de sistemas computadorizados, operação, manutenção, segurança e controlo das alterações e cópias de segurança, preparação e rotulagem de materiais, reagentes e soluções;

3) – conservação de registos, relatório, armazenamento e recuperação: codificação dos estudos, recolha de dados, preparação de relatórios, sistemas de indexação e tratamento dos dados, incluído o uso de sistemas informatizados;

4) – sistema de ensaio: preparação das salas e condições ambientais, receção, transferência, acomodação adequada, caracterização, identificação e cuidados com o sistema de teste, preparação do sistema de teste, observação e exame antes, durante e na conclusão do estudo, gestão dos sistemas de ensaio moribundos ou mortos ao longo do estudo, recolha, identificação, manuseamento de espécimes, incluído autópsia e exame histopatológico e colocação do sistema de ensaio na unidade de ensaio;

5) – procedimento de garantia de qualidade: operação do pessoal de garantia de qualidade no planeamento, programação, execução e inspeção de documentos e relatórios<sup>6, 2</sup>.

## 1.1.6 Qualificação de instrumentos analíticos

Em laboratório são usados todos os dias uma grande variedade de instrumentos, da utilização dos quais esperamos obter dados confiáveis e válidos. Para garantir que os instrumentos mantêm a sua capacidade de gerar dados confiáveis são efetuadas diferentes ações como a calibração e a validação de procedimentos. De seguida descreve-se a abordagem a seguida<sup>9</sup>.

A qualificação é uma base de dados de qualidade, é um conjunto de atividades documentadas que verifica e evidencia, de forma documentada, o modo como o sistema ou equipamento foi concebido, está instalado, opera em conformidade com especificações pré-definidas, e transmite resultados corretos<sup>9</sup>. Aplica-se a todas as entidades sujeitas ao cumprimento dos regulamentos GLP e legislação aplicável.

No processo de qualificação os instrumentos são previamente separados em categorias, para que a sua qualificação seja a mais adequada ao fim a que se destinam. Distinguem-se três categorias:

- ✓ Grupo A – Não tem capacidade de medição, não necessita calibração.
- ✓ Grupo B – Equipamento que tem capacidade de medição/calibração.
- ✓ Grupo C – Instrumentação e sistema computadorizado.

### 1.1.6.1 Qualificação do *Design* (QD)

O primeiro elemento da validação de novas instalações, sistemas ou equipamentos deve ser a qualificação do *design*<sup>7</sup>. É necessária a verificação documentada de que a conceção, proposta das instalações, sistemas e equipamento é adequada para o objetivo pretendido<sup>7</sup>.

Poderá ser feita pelo fabricante ou pelo operador<sup>9</sup>. Também se deve ter em conta a capacidade de suporte na instalação, serviço e treino por parte do fabricante. A qualificação de *design* deverá compreender alguns dos seguintes passos<sup>10</sup>:

- 1) – descrição da análise do problema;
- 2) – descrição da intenção de uso do equipamento;
- 3) – descrição do ambiente pretendido;
- 4) – seleção preliminar das especificações funcionais e de performance; escolha preliminar do fornecedor;
- 5) – seleção final do fornecedor e equipamento;

6) – desenvolvimento e documentação das especificações funcionais e operacionais finais.

#### **1.1.6.2 Qualificação da Instalação (QI)**

A qualificação da instalação estabelece que o instrumento é entregue como foi concebido e com as especificidades de acordo com o ambiente em que vai ser inserido. Esta atividade aplica-se a instalações de instrumentos novos, alterados ou que nunca foram qualificados<sup>9,7</sup>. A qualificação de instalação deverá compreender os seguintes passos<sup>9,7</sup>:

- 1) – descrição do instrumento e dos seus componentes; - na entrega do instrumento verificar se o *software*, manuais, acessórios vêm com o instrumento e se nada se encontra danificado;
- 2) – verificar que a instalação satisfaz os requisitos específicos do fabricante;
- 3) – para a aceitação do instrumento é feita a montagem, instalação e um teste diagnóstico preliminar;
- 4) - Se necessário também o armazenamento e rede devem ser testados;
- 5) – realização de um diagnóstico inicial e teste após a instalação.

#### **1.1.6.3 Qualificação de Operação (QO)**

É a demonstração de que o instrumento irá funcionar de acordo com especificações operacionais. Implica um teste preliminar.

A qualificação de operação deverá compreender alguns dos seguintes passos<sup>9,7</sup>:

- 1) – testar os parâmetros fixos do instrumento (entradas de tensão, pressão aceitável, peso, etc.);
- 2) – quando aplicável testar armazenamento de dados, cópia de segurança e arquivo;
- 3) – usar alguns testes, normalmente concebidos pelo fabricante, para testar parâmetros específicos (desenvolvidos a partir do conhecimento de processos, sistemas e equipamento; incluam uma condição ou um conjunto de condições abrangendo limites operacionais máximos e mínimos, por vezes referidos como “as piores” condições).

A conclusão de uma qualificação operacional bem-sucedida deve permitir a finalização dos procedimentos de calibração, operacionais e de limpeza, a formação do

operador e requisitos de manutenção preventiva. Deverá permitir a “aprovação” formal de instalações, sistemas e equipamento.

#### **1.1.6.4 Qualificação de Desempenho (QD)**

Verificação de que as instalações, os sistemas e o equipamento, conforme ligados entre si, se comportam de forma eficaz e reprodutível, com base no método de processo aprovado e nas especificações do produto<sup>7</sup>.

A qualificação de desempenho deverá compreender alguns dos seguintes passos<sup>9,7</sup>:

1) – testes, utilizando materiais de produção, substitutos qualificados ou produtos simulados que tenham sido desenvolvidos a partir do conhecimento do processo e das instalações, sistema ou equipamento;

2) – testes que incluam uma condição ou conjunto de condições que abranjam limites operacionais máximos e mínimos;

3) – manutenção preventiva e reparação, para tal estabelecer práticas de operação (formação do operador), calibração e limpeza.

Os testes realizados deverão ser realizados de forma periódica no sentido de avaliar se as condições à data do teste reproduzem aquelas à data da QD<sup>9</sup>. Embora a QD seja descrita como uma atividade separada, em alguns casos, pode ser adequado realizá-la em conjunto com a QO<sup>7</sup>.

#### **1.1.7 Calibrações e manutenções**

Os equipamentos devem ser inspecionados, limpos e conservados. Quando usados com o propósito de gerar, medir e analisar dados devem ser adequadamente testados, calibrados e padronizados. Os procedimentos operacionais padrão devem detalhar o método, materiais e tempos necessários numa inspeção de rotina, limpeza, manutenção, testes, calibração e padronização do equipamento. Caso seja necessário deverão ser indicadas medidas corretivas a adotar em caso de falha ou mau funcionamento do equipamento. Os procedimentos escritos designam responsáveis por cada operação. Deve ser mantido um registo escrito de inspeções, manutenção, testes, calibração e operações de normalização. Estes devem conter a data de operação, se a manutenção é rotineira e se

já foram seguidos os procedimentos operacionais padrão. É necessária também a existência de registos de manutenção e reparação não rotineiros aos equipamentos resultantes de falhas ou mau funcionamento dos mesmos. A natureza do defeito deve ser identificada, bem como o momento da sua deteção, qual o defeito e as medidas de ação corretiva tomadas para corrigir o problema<sup>6</sup>.

### 1.1.8 Medidor pH

De uma forma generalizada a medição de pH é usada para especificar o nível de basicidade e acidez de uma determinada solução aquosa. Inicialmente o pH foi definido como o logaritmo negativo da concentração de iões de hidrogénio<sup>11</sup>.

$$[1] \quad \text{pH} = -\log[H^+]$$

As técnicas de medição de pH medem na realidade a atividade do ião hidrogénio  $a_{H^+}$ <sup>11</sup>.

$$[2] \quad \text{pH} = -\log a_{H^+} = -\log \gamma[H^+]$$

Na prática o pH é determinado através de uma solução referência (pH<sub>s</sub>), onde o valor de pH representa a concentração de iões de hidrogénio em solução aquosa<sup>12</sup>.

$$[3] \quad \text{pH} = \text{pH}_s - \frac{(E - E_s)}{k}$$

Onde  $E$  e  $E_s$  representam a medida do potencial da solução problema e solução referência respetivamente, pH<sub>s</sub> corresponde ao valor de pH de uma solução de pH conhecido e  $k$  representa a variação do potencial por variação de uma unidade de pH em volts, calculada pela equação de nernst<sup>12</sup>.

A determinação potenciométrica do pH é feita através da diferença de potencial entre duas células criteriosamente escolhidas e mergulhadas na solução, um eletrodo sensível a iões hidrogénio e outro de referência<sup>12</sup>.

#### 1.1.8.1 Aparelho de medição de pH

O potenciómetro usado para obter um valor de pH é um voltímetro graduado à unidade de pH. Possui uma resistência 100 vezes superior á dos eletrodos e sensibilidade mínima de 0,05 unidades de pH, ou seja 0,003 volts<sup>12</sup>.

O pH medido é definido como o valor fornecido por um potenciómetro adequado, devidamente normalizado, capaz de reproduzir valores de pH até 0,02 unidades de pH,

segundo a USP (Farmacopeia Americana) e de 0,05 de acordo com a FE (Farmacopeia Europeia), ao longo da leitura na temperatura e declive. As medições devem-se efetuar a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de acordo com a monografia da USP ou entre  $20-25^\circ\text{C}$  na FE.<sup>13</sup>.

O voltímetro traduz a atividade química do ião hidrogénio em sinal elétrico, partindo de uma diferença no potencial elétrico. A membrana de vidro do elétrodo indicador desenvolve um potencial dependente de pH, que resulta da troca iónica entre iões de hidrogénio em solução e catiões univalentes na membrana de vidro. Como a sensibilidade é pequena usa-se um elétrodo de referência para uma maior precisão no valor obtido.

#### **1.1.8.2 Método**

Devido à natureza e modo de operação dos medidores de pH disponíveis não é possível dar indicações precisas e universais de aplicabilidade do aparelho<sup>13</sup>. Antes de usar um medidor de pH deve observar-se o estado da ponte salina<sup>13</sup>.

Para a calibração do medidor de pH deve-se escolher duas soluções padronizadas com não mais de quatro unidades de pH de diferença<sup>13</sup>. A temperatura de medição deverá ser idealmente feita dentro de um intervalo de  $20-25^\circ\text{C}$ , pois o pH da solução tampão varia com a temperatura<sup>12</sup>.

A calibração deverá ser feita com um primeiro tampão, o padrão primário, mais ácido (pH~4), seguindo-se o 2º tampão<sup>13</sup>. Na leitura opcional de um 3º tampão deve obter-se uma variação não superior a 0,05 unidades pH<sup>12</sup>. É necessário inserir a temperatura da solução e ajustar o pH para que seja idêntico ao do padrão tabelado, lavar e imergir no segundo padrão. Este deve estar a  $\pm 0,07$  unidades de pH do valor padrão tabelado<sup>13</sup>. Se ocorrer algum problema deve repetir-se a operação e no segundo padrão ajustar o valor do declive e da temperatura. Depois basta repetir até os valores obtidos estarem a 0,02 unidades de pH do valor padrão tabelado<sup>13</sup>.

## 1.2 Materiais e métodos

### 1.2.1 Materiais, reagentes e equipamentos

Os equipamentos utilizados foram o medidor de pH Ref 290PH001 (301 *Hanna Instruments*) com eletrodo de pH de combinação com corpo de vidro (*Hanna Instruments*) e sonda de temperatura (HI 7669/2W, *Hanna Instruments*), o medidor de pH Ref 290PH002 (744, *Metrohm*) com eletrodo de vidro combinado, corpo de plástico LL primatrode NTC com Pt 1000 (*Metrohm*), o medidor de pH Ref 290PH003 (620, *Metrohm*) com eletrodo de vidro combinado LL Ecotrode (*Metrohm*) e o medidor de pH Ref 290PH004 (826pH, *Metrohm*) com eletrodo de vidro combinado, corpo de plástico LL primatrode NTC com Pt 1000 (*Metrohm*). Foram utilizados os seguintes reagentes: i) água desmineralizada, ii) etanol a 96%, iii) solução de eletrólito 3,5 KCl (HI7071), iv) solução de armazenamento (HI 70300), v) solução de limpeza geral (HI7061), vi) solução de limpeza de substâncias gordurosas (HI7077), vii) solução de limpeza de compostos inorgânicos (HI7074), viii) solução interna de eletrólito (c(KCl)=3M, *Metrohm*), ix) solução externa de armazenamento (*Metrohm*), x) solução limpeza de sulfetos – 7% tiureia em HCl 0,01M, xi) solução de limpeza para gordurosos – éter e etanol 70%, xii) soluções tampão pH=10 (Fisher Scientific), pH=9,21 (Mettler toledo), pH=8 (Fisher Scientific), pH=7 (Mettler Toledo), pH=5 (Fisher Scientific), pH=4,01(Mettler Toledo) rastreáveis pelo NIST, solução tampão padrão pH=6,865±0,010 (*Metrohm*) e xiii) solução amostra de cloridrato de minociclina.

## 1.3 Resultados e Discussão

Antes de se iniciar a qualificação de equipamentos é necessário proceder à planificação das atividades envolvidas. Previamente deve também ser criado um protocolo escrito, é igualmente necessário verificar a atualidade de toda a documentação existente, procedendo à sua atualização/revisão se necessário.

O primeiro grupo de equipamentos a ser alvo de qualificação no laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN foram os medidores de pH.

Entre estes encontram-se os medidores de pH *Hanna Instruments* 301, *Metrohm* 744, *Metrohm* 620 e *Metrohm* 826.

A fase inicial do trabalho incluiu a análise dos manuais de instrução e brochuras fornecidos pela marca no intuito de redigir a instrução de funcionamento e calibração do aparelho (ver anexo V), tendo por base as linhas de orientação das Farmacopeias Europeia e Americana. No intuito de permitir uma utilização mais fácil e intuitiva da parte do operador dos equipamentos, foram colocados guias rápidos de instruções (ver anexo I) junto à estação de serviço de medidores de pH bem como um kit de limpeza e manutenção do medidor de pH e respetivo eléctrodo (ver anexo II). Na estação de serviço criada o operador passou a poder encontrar o aparelho medidor de pH assim como todos os elementos necessário à sua calibração e uso diário (tampão, panos, água destilada, soluções de armazenamento etc.).

A par do trabalho anterior, criou-se uma *checklist* de manutenção e limpeza de medidores de pH e eléctrodos (ver anexo III). Os medidores de pH e eléctrodo têm de estar corretamente identificados para se proceder à análise de manutenção que averigua os dados da ultima calibração, armazenamento do eléctrodo e eletrólito assim como a limpeza averigua o material existente e o escurecimento do eléctrodo, que determina o tempo de vida do eléctrodo. Todas as ações efetuadas de manutenção e limpeza são registadas e o impresso arquivados pelo responsável de I&D.

Antes de se iniciar a qualificação, foram feitos testes de operacionalidade, resultando no relatório de operacionalidade de medidores de pH no laboratório de I&D. A intenção era determinar se os medidores operam de acordo com as Farmacopeias Europeia e Americana e se produzem dados que estejam dentro dos critérios de aceitação, definidos pelos programas de calibração. Observou-se que todos os medidores de pH se enquadram nos critérios de qualificação, notou-se, no entanto, provavelmente devido a ser mais antigo, que o equipamento 290PH003 (620, *Metrohm*) necessita recorrentemente

de acertos. Por fim decidiu-se que apenas o equipamento 290PH001 (301, *Hanna Instruments*) será utilizado para trabalhos analíticos e os restantes para trabalhos de síntese química. O relatório de operacionalidade gerado pode ser observado no Anexo IV.

A documentação interna da CIPAN sobre os medidores de pH do laboratório de investigação e desenvolvimento está desatualizada e em alguns casos é inexistente. Entre as documentações originais dos medidores de pH encontram-se os manuais de instruções, folhetos dos elétrodos e documentos sobre a técnica potenciométrica de medição de pH, que serviram de base à redação de uma instrução técnica de calibração, funcionamento e manutenção do medidor (Anexo V), assim como dos respetivos protocolos de qualificação de instalação (VI), protocolo de qualificação de operação (VII) e protocolo de qualificação de desempenho (VIII).

Para a realização da qualificação dos medidores de pH foi necessária a criação de instruções técnicas, baseadas nos manuais dos equipamentos e nas normas das Farmacopeias Europeia (FE) e Americana (USP).

Surgiu assim a instrução técnica: “Calibração, funcionamento e manutenção do medidor de pH” (Anexo V - exemplo de instrução técnica do medidor pH 290PH001, 301 *Hanna Instruments*) que tem como objetivo definir regras da correta execução do medidor de pH, descrevendo passo-a-passo o método de calibração e os respetivos critérios de aceitação. A instrução técnica indica no seu procedimento, reagentes, materiais e equipamento, cuidado na manutenção do medidor de pH e o seu eletrodo e um guia rápido e detalhado para calibrar o medidor onde estão definidos os critérios de aceitação para a satisfação da calibração. Os critérios de aceitação consistem: a) num intervalo definido de valores de pH (ex:  $6,40 < \text{pH} < 8,00$ ), b) sensibilidade (ex:  $57,8 \text{mV/pH (97\%)} < \text{sens.} < 60,8 \text{mVpH (105\%)}$ ) e c) na diferença entre o valor de pH tabelado e pH obtido inferior a 0,05 ( $\text{pH}_{\text{tabelado}} - \text{pH}_{\text{obtido}} < 0,05$ ).

Após a preparação e aprovação dos documentos com as instruções de manuseamento dos medidores de pH, seguiu-se a preparação dos protocolos de qualificação. Todos os medidores de pH foram classificados como equipamentos de categoria B – com capacidade de medição e calibração.

O primeiro protocolo desenvolvido foi o de instalação (ver anexo VI) que documenta a evidência de que o medidor de pH foi instalado de acordo com as recomendações do fabricante.

Não se procedeu à qualificação de *design* uma vez que o equipamento não é novo, e este passo de qualificação faz-se com o fornecedor à chegada do equipamento fazendo-se acompanhar da declaração de qualificação de *design*.

O protocolo contém a descrição do equipamento, documentos que suportam a fase de qualificação, requisitos para a realização da qualificação, testes que avaliam a instalação, programa de manutenção de equipamentos e nos anexos do protocolo encontram-se as folhas de registos do equipamento. Estas folhas terão de ser preenchidas pelo operador durante a qualificação, servindo posteriormente de base à execução do relatório da qualificação de instalação.

Segue-se o protocolo de qualificação de operação (ver anexo VII) que representa evidência de que o medidor permite em rotina obter resultados analíticos consistentes. O protocolo contém a descrição de operações, onde se verificam todas as funções básicas do equipamento, o procedimento onde é descrito o equipamento, material e reagentes, o plano de calibração usado e os testes efetuados. Na qualificação de operação começa-se por calibrar o aparelho usando soluções tampão rastreáveis ao NIST e, numa segunda calibração, usa-se como amostra padrão uma solução tampão certificada pela IUPAC.

Por último, o protocolo de desempenho (ver anexo VIII) representa a evidência de que o medidor instalado e operacional permite a obtenção em rotina de resultados analíticos consistentes. O protocolo contém o procedimento que pretende a verificação geral do equipamento, escolha da amostra, descrição dos testes de desempenho a efetuar e os testes de desempenho relativamente à repetibilidade e exatidão. Os testes de desempenho a realizar são:

- 1) uma calibração com padrões rastreáveis ao NIST;
- 2) medição de pH em amostra de cloridrato de minociclina.

Posteriormente fazem-se repetições da medição em dez amostras de modo a obter a repetibilidade e exatidão da medição do aparelho.

Se existir algum desvio terá de se proceder à ação corretiva e voltar a repetir o ponto de desvio em causa e emitir nova folha de registo.

## **1.4 Conclusões e perspectivas futuras**

Da concretização do trabalho aqui documentado, conseguiu-se desenvolver a documentação técnica necessária para a concretização das atividades de qualificação de qualquer equipamento do laboratório de I&D da CIPAN. Abre-se assim o caminho para a melhoria de qualidade do laboratório e para uma futura certificação de GLP.

No futuro, os procedimentos aqui descritos para medidores de pH atividades poderão ser aplicados aos demais equipamentos, como p. ex. balanças, micropipetas, HPLC, espectrofotômetros. Este trabalho teve enquadramento nas necessidades de melhoria contínua no que à qualidade e fiabilidade dos resultados e consequentes conclusões a retirar dos mesmos, dizem respeito.

## **Capítulo 2 - Armazém de reagentes**

---

## **2.1 Introdução**

Um bom sistema de gestão de uso de reagentes num laboratório apresenta como principais vantagens a redução dos riscos de segurança e ambientais e redução de custos<sup>5</sup>. Ao longo dos últimos anos tem sido possível observar um aumento na preocupação com as características e perigos que se colocam pela utilização de determinados reagentes existindo presentemente uma tentativa de promover a redução ou eliminação, tanto a nível industrial como laboratorial, da utilização de reagentes perigosos, à boleia da filosofia da designada química verde<sup>5</sup>.

A realização de um inventário de todos os reagentes permite a sua ordenação, armazenamento, manuseamento e remoção. Noutra perspetiva, a realização do inventário de reagentes é também importante para o desenvolvimento de planos de emergência.<sup>5</sup>

Uma das fontes consultadas para a concretização do trabalho presente, foi o regulamento REACH<sup>14</sup>, que estabelece a política de enquadramento das substâncias químicas na União Europeia e tem como objetivo assegurar a proteção da saúde humana e do ambiente de forma a atingir um desenvolvimento sustentável.

### **2.1.1 Aquisição de químicos**

Todos os potenciais utilizadores de uma dada substância química devem ter informação prévia relativamente à forma de manuseamento, armazenamento e eliminação do mesmo<sup>15</sup>. Na compra de uma substância química é necessário saber de forma antecipada: a) a quantidade necessária, b) se existem todos os equipamentos de proteção individual (EPIs) necessário no manuseamento da substância, c) quais as precauções a ter em conta, d) onde armazenar o mesmo, e) se as condições de ventilação da hotte onde será manuseado são adequadas, f) as indicações em caso de derrame, fogo ou inundação e g) considerações a ter em caso de eliminação impacto ao nível de custos adicionais.

## 2.1.2 Armazenamento de químicos

Para minimizar o risco aquando do armazenamento, o pessoal qualificado deverá separá-los de acordo com a categoria de perigo e tabela de incompatibilidades, para que, em caso de derrame, seja evitado algum acidente<sup>15</sup>. As substâncias químicas devem possuir como informação, além do nome da substância, aviso de perigosidade, fabricante, utilizador e a data de transferência para o recipiente (se for o caso).

## 2.1.3 Manuseamento químico

Este tipo de informação pode ser encontrado nas fichas de segurança (MSDS) que acompanham o produto. Sempre que se usa um novo produto químico esta folha deve ser analisada, por forma a que o operador possa seleccionar os equipamentos de protecção laboratoriais e individuais adequados<sup>15</sup>.

## 2.1.4 Inventário de químicos

As substâncias químicas armazenadas devem ser analisadas periodicamente, no sentido de se avaliar se cumprem com as especificações originais, isto é, se mantêm aptas a serem usadas sem efeitos adversos nos processos produtivos a que se destinam. De forma periódica devem ser realizados inventários que permitam remover itens não necessários, fora de prazo ou fora de especificação, para poder repô-los se necessário<sup>15</sup>.

Periodicamente é necessário verificar:

- ✓ Se os químicos estão armazenados de acordo com a tabela de compatibilidades;
- ✓ Eliminar os químicos desnecessários e fora de validade;
- ✓ Verificar se determinadas substâncias estão em locais convenientes em caso de emergência;
- ✓ Atualizar os sinais de perigo no laboratório;
- ✓ Promover um uso mais eficiente do espaço do laboratório, guardando reagentes que não se encontram em utilização esporádica nos locais apropriados no armazém;

- ✓ Verificação da data de expiração de substâncias ativas potenciais geradores de peróxidos (e.g., éteres);
- ✓ Verificar a integridade física dos armários e prateleiras de armazenamento;
- ✓ Encorajar o supervisor do laboratório a tomar decisões executivas (ex: deitar fora recipientes de químicos já empoeirados);
- ✓ Substituir etiquetas;
- ✓ Assegurar que estão a ser cumpridas todas as normas, regulamentos e registos;

Este trabalho permite a prazo uma redução de custos na medida em que se promove uma redução de riscos simplesmente fruto de um novo paradigma de organização. A tabela 1 resume o material necessário e o que o inventário deve ter.

**Tabela 1** - O que é necessário para realizar o inventário (Esq.) e o que deve conter(Dir.).

Usar proteção individual e ter um par de luvas extra	Nome químico e sinónimos
Usar um carrinho com proteções laterais	Número CAS
Usar uma escada ou banco para chegar às prateleiras superiores	Fabricante
Estar familiarizado com equipamento de segurança interno	Sala
Respeitar períodos de descanso e de exposição a substâncias químicas	Localização da sala

## 2.1.5 Transporte, transferência e remessa de químicos

Para o transporte, transferência e envio de químicos é necessário utilizar embalagens de contenção em material adequado face às substâncias a transportar (ex: esferovite, cartão, metal...). Devem evitar-se zonas de elevado tráfego, não permitir a deslocação conjunta de pessoas e carga em elevadores. Estas atividades devem em todas as situações ser realizadas por pessoal autorizado e devidamente qualificado para o efeito<sup>15</sup>.

## 2.1.6 Destruição/ remoção de produtos químicos

Todos os resíduos a eliminar devem ser devidamente etiquetados e todas as operações desde o acondicionamento até à saída das instalações deem cumprir as

normas e regulamentos nacionais/internacionais. No acondicionamento dos materiais a destruir deve ter-se em conta a possibilidade de libertação de gases, razão pela qual não se deve encher o recipiente até ao seu limite de carga<sup>15</sup>.

## 2.1.7 *Lean thinking*

O *lean thinking* ou “pensamento magro” é um conceito de liderança e gestão empresarial. A filosofia *lean thinking* ficou reconhecida através do sistema de produção da Toyota, criado por Taiichi Ono a partir da década de 40. É uma filosofia que tem como objetivo eliminar o desperdício e criar valor. Baseia-se num conjunto de ferramentas e métodos operacionais, resumidos em sete princípios, como podemos observar na ilustração 1: 1) conhecer quem servimos, não só o consumidor final, como todas as partes envolvidas na criação de valor; 2) definir valores, não considerar só o valor final, como acrescentar atividades que outrora foram consideradas desperdício e podem acrescentar valor; 3) definir as cadeias de valor de forma a satisfazer todas as partes interessadas; 4) otimizar o fluxo de todos os envolvidos na criação de valor; 5) implementar o sistema *pull*, isto é, as partes interessadas é que induzem aos pedidos; 6) a procura pela perfeição contínua, incentivando uma melhoria em todos os níveis da organização e 7) inovar constantemente para criar novos valores (serviços ou produtos)<sup>16</sup>.



**Ilustração 1** - Os sete princípios da filosofia lean thinking<sup>16</sup>.

A filosofia *lean thinking* possui a prática dos seis S (5+ 1), no qual os vários passos da intervenção da reorganização dos reagentes se irão basear, a ilustração 2 apresenta de forma consecutiva as diferentes fases.

- 1) *Seiri* ou organização – separação do útil e do inútil assim como a identificação de coisas desnecessárias no posto de trabalho;
- 2) *Seiton* ou arrumação – definir um local para cada coisa, verificar que está no seu local, colocar à mão as coisas de uso mais frequente e colocar etiquetas de identificação;
- 3) *Seiso* ou limpeza – dividir o posto de trabalho e atribuir uma zona a cada elemento do grupo, proceder à sua limpeza e definir uma norma de limpeza;
- 4) *Seiketsu* ou normalização – Definir uma norma geral de organização e limpeza, identificar as ajudas visuais, procedimentos, normas de organização de forma a que resultem e funcionem, normalizar em toda a fábrica os equipamentos/ postos de trabalho do mesmo tipo;
- 5) *Shitsuke* ou autodisciplina – praticar os princípios de organização, sistematização e limpeza, fazer bem à primeira, verificar se está tudo no lugar, o estado de limpeza e se as ações e inspeções estão a ser realizadas corretamente e desenvolver um sistema *checklist* e de ajudas visuais.
- 6) Segurança – inserida em cada um dos passos anteriores e adequado à atividade a realizar.



**Ilustração 2** - A prática 6S (5+1) e a eliminação de desperdício<sup>16</sup>.

## 2.2 Materiais e Métodos

No laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN, os reagentes encontram-se armazenados de acordo com as condições de armazenamento/ estabilidade química requeridas: a) no armazém de reagentes sem controlo de temperatura ambiente (prat. 1-48), na câmara frigorífica (prat. 49-56) a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , e nos armários A (área analítica), B (sólidos no g-lab), C (líquidos g-lab) e D (pequenos reagentes, todos estes armários à temperatura de trabalho das salas nos quais se localizam o laboratório). Os reagentes presentes nos armários distribuídos pelas diferentes salas que compõem o laboratório de investigação e desenvolvimento são sobretudo reagentes de utilização regular.

A par da organização do armazém de reagentes, em função da normas e regulamentos internacionais, o trabalho realizado no âmbito da presente tese passou também pela atualização da base de dados de matérias-primas no sentido de melhorar a gestão dos reagentes existentes.

### 2.2.1 Inventário de Reagentes

O trabalho realizou-se em várias fases. Primeiro procedeu-se ao levantamento de todos os reagentes existentes no laboratório, depois inseriram-se os dados na base de dados procedendo às alterações necessárias na ficha de produto assim como listas e tabelas que servem de base ao funcionamento da ficha de produto, e por fim fez-se o inventário dos reagentes da câmara frigorífica e colocaram-se todos reagentes nos devidos lugares.

Na primeira fase, procedeu-se à análise dos prazos de validade dos reagentes e da utilidade presente os mesmos, trabalho do qual resultou a separação de reagentes para destruir.

Posteriormente, o inventário realizado permitiu uma primeira separação dos reagentes por: a) estado químico (sólido ou químico), b) por tipo de composto (orgânico ou inorgânico) e c) subdividindo as classes anteriores por famílias, agrupando de acordo com os grupos funcionais principais os compostos orgânicos (ex: ácidos, ésteres, éteres...) e os compostos inorgânicos de acordo com os catiões (ex: sais de potássio, sais de sódio...).

## 2.2.2 Base de dados de Reagentes

Numa segunda fase, procedeu-se à atualização dos campos da base de dados, com inserção de informação que facilita a identificação dos reagentes (fórmula química, peso molecular, estrutura química), o seu armazenamento (classificação, incompatibilidade química com outros reagentes, localização específica), e a gestão dos mesmos (prazo de validade, data de reanálise).

## 2.2.3 Reagentes na Câmara Frigorífica

A terceira e última fase compreendeu o inventário dos reagentes na câmara frigorífica e a confirmação da necessidade de refrigeração no seu armazenamento, com realocação de reagentes mal classificados. Finalmente, procedeu-se á limpeza geral assim como à colocação dos reagentes nos devidos locais.

## 2.3 Resultados e Discussão

A reorganização do armazém de reagentes e da base de dados que a suporta no laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN deveu-se a ter atingido um grau de desatualização que desmotivava a sua utilização no dia-a-dia e vice-versa. Um armazém de reagentes sempre atualizado é uma mais valia para a segurança de quem o utiliza, assim como torna o trabalho do dia-a-dia mais rápido e eficiente. Em todos os momentos deve estar presente a segurança (sexto passo da prática 6S), e cada passo da reorganização do armazém e outros locais onde se encontravam armazenados os reagentes devem ser manuseados usando os equipamentos de proteção seguintes:

### Equipamento de proteção coletivo

- ✓ Hotte Química
- ✓ Chuveiro de emergência
- ✓ Lava-olhos

### Equipamento de proteção individual

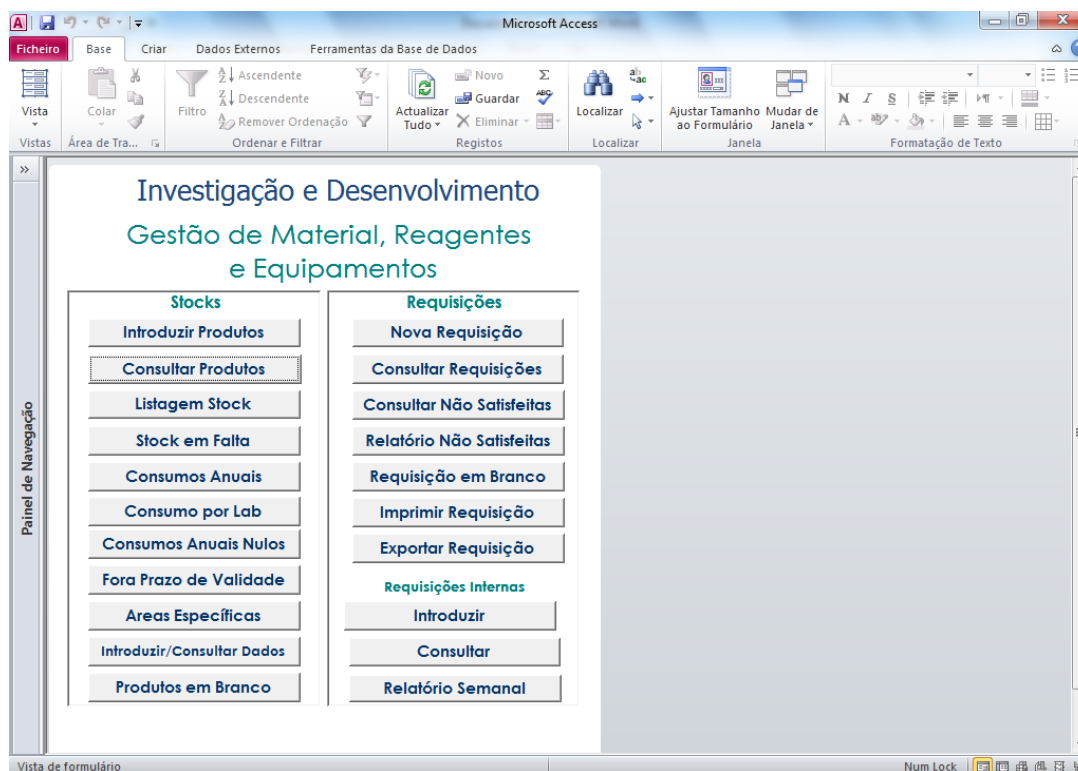
- ✓ Óculos de segurança
- ✓ Aparelho de proteção respiratória com filtro adequado
- ✓ Luvas de vinilo
- ✓ Bata de laboratório
- ✓ Calçado com biqueira

Após a chegada de qualquer reagente é adicionada a etiqueta CIPAN como podemos observar na ilustração 3, que inclui campos de nome da substância, data de receção e data de abertura, que tem como finalidade informar cada utilizador do reagente e auxiliar o responsável de laboratório aquando do inventário de reagentes.

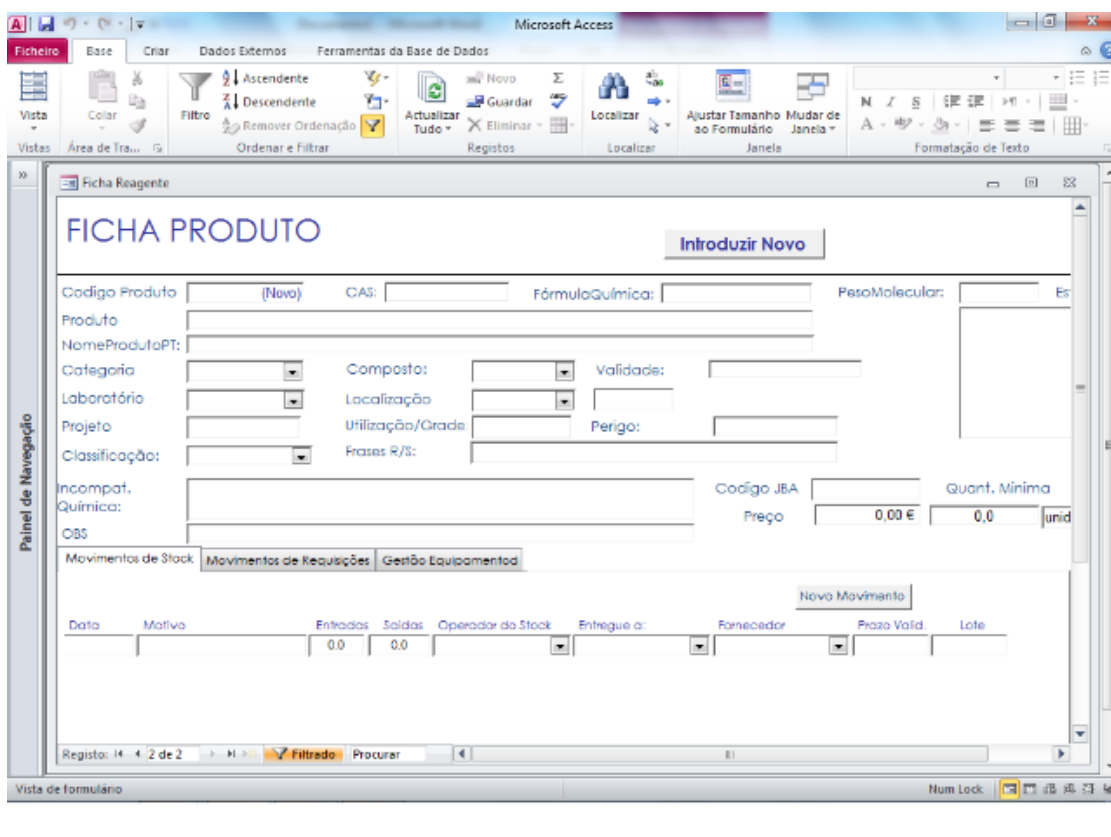


**Ilustração 3** - Etiqueta Cipan.

Adiciona-se o reagente á base de dados preenchendo corretamente todos os campos da ficha de produto. Para aceder abre-se o ficheiro *I&D Material e Reagentes*, coloca-se a palavra-chave *MATERIAL*, selecciona-se a opção “Introduzir produtos” e preenche-se corretamente todos os campos, certificando que existe a ficha de segurança do reagente. Este passo é de grande importância para a manutenção de um inventário atualizado e todos os utilizadores desta base de dados devem contribuir para a sua constante atualização, como tal é necessária uma ação de formação informativa acerca do seu funcionamento.



**Ilustração 4** - Painel de navegação de base de dados.

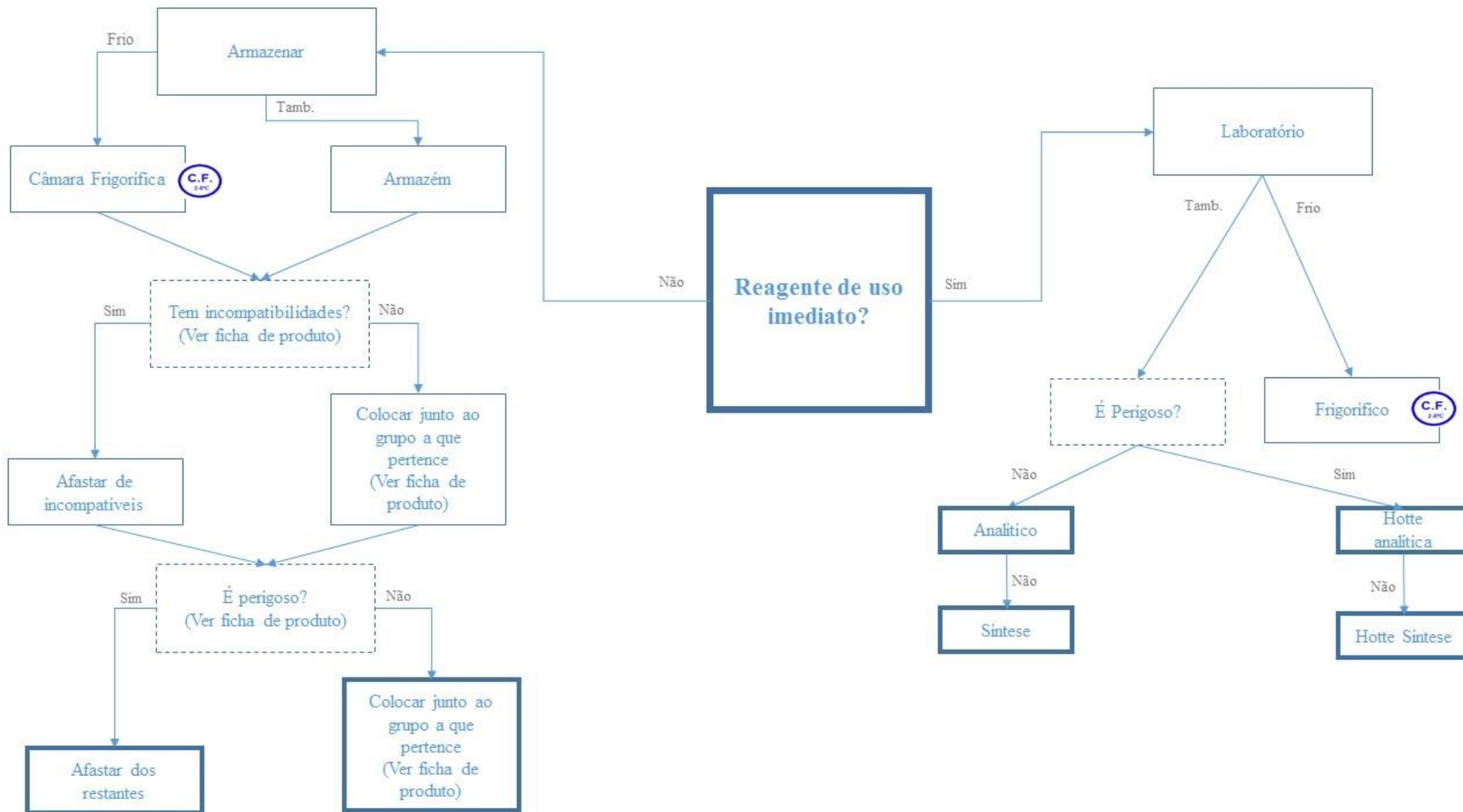


**Ilustração 5 - Ficha de produto**

De seguida armazena-se em local próprio seguindo instruções da árvore de decisão apresentada na ilustração 5. Esta árvore de decisão foi construída tendo em conta a utilidade prática do armazém de reagentes no laboratório de investigação e desenvolvimento CIPAN seguindo algumas linhas base de organização e separação de reagentes.

De modo a organizar todos os reagentes no laboratório de I&D criou-se um documento com todos os dados de interesse aos operadores de laboratório (ver anexo XIX). Este inventário surgiu com a necessidade de englobar diversas informações que são necessárias no momento de armazenar os reagentes.

Na base de dados já existente do laboratório de investigação e desenvolvimento procedeu-se á reorganização da ficha de produto. A base de dados é de material, reagentes e equipamento. Os dados acrescentados á ficha de produto encontram-se na Tabela 2. A decisão de acrescentar dados ao sistema foi avaliada tendo em conta a utilidade para os operadores assim como a informação essencial ao correto manuseamento do reagente.



**Ilustração 6** - Esquema passo-a-passo de armazenamento de reagentes novos.

**Tabela 2** - Dados da ficha de produto adicionados.

<i>Já existiam</i>	<i>Adicionados</i>
<i>Código de produto</i>	CAS
<i>Produto EN</i>	Fórmula química
<i>Produto PT</i>	Peso molecular
<i>Categoria</i>	Estrutura química
<i>Laboratório</i>	Composto
<i>Localização</i>	Validade
<i>Projeto</i>	Utilização
<i>Código JBA</i>	Perigo
<i>Quantidade mínima</i>	Classificação
<i>Preço</i>	Frases R/S
<i>Observações</i>	Incompatibilidades químicas
<i>Movimentos de Stock</i>	
<i>Movimento de requisições</i>	
<i>Gestão de equipamento</i>	






Os reagentes foram separados em grupos tendo em conta a sua categoria (sólido e líquido), a composição química (*Tabela 3*), a utilização (analítica ou de síntese), o perigo (*Tabela 4*) e incompatibilidades químicas (*Tabela 5*).

**Tabela 3** - Separação de reagentes através do grupo funcional.

<i>Composto orgânico</i>	<i>Composto inorgânico</i>
<i>Hidrocarbonetos</i>	Metais alcalinos
<i>Carboidratos e ácidos nucleicos</i>	Metais alcalino-terrosos
<i>Aromáticos – benzeno</i>	Metais de transição
<i>Aminoácidos, péptidos e proteínas</i>	Metais representativos
<i>Lípidos</i>	Não metais/outros
<i>Polímeros sintéticos</i>	
<i>Álcoois e fenóis</i>	

*Cetonas e aldeídos*  
*Aminas e piridinas*  
*Ácidos carboxílicos*  
*Halogeneto de ácido*  
*Anidridos*  
*Éster/ epóxidos/ oxanos e dioxanos*  
*tioéster*  
*Amida*  
*Nitrilo*

**Tabela 4** - Separação dos reagentes tendo em conta o seu perigo.

<i>Perigo</i>	<i>Descrição</i>
	Substâncias química explosivas, auto-reactivas, peróxidos orgânicos que podem provocar explosões sob ação do calor.
	Substâncias químicas gasosas, aerossóis, líquidas e sólidas inflamáveis, substâncias e misturas suscetíveis de auto-aquecimento, incendiam-se em contacto com o ar, em contacto com a água emitem gases inflamáveis e provocam incêndios sob ação do calor.
	Gases, sólidos e líquidos comburentes que provocam incêndios e explosões.
	Gás sob pressão, risco de explosão sob ação do calor, gás refrigerado, pode provocar queimaduras ou lesões criogénicas, gases dissolvidos.
	Substância química corrosiva, provoca queimaduras graves na pele e danos nos olhos.
	Altamente tóxico.
	Substância química cancerígena, afeta a fertilidade e o nascituro, provoca mutações, provoca alergias, asma ou dificuldade respiratória quando inalada. É tóxica para órgãos específicos, pode ser fatal ou nociva por ingestão e penetração nas vias respiratórias.



Substância química extremamente tóxica (nociva), provoca sensibilização cutânea e ocular, irritante para as vias respiratórias, narcóticos, provoca sonolência ou tonturas é perigoso para a camada de ozônio.



Substância química perigosa para o meio ambiente, provoca toxicidade aquática.

**Tabela 5** - Separação de acordo com a incompatibilidade química, baseada na classificação de cada reagente.

#### Classificação de reagentes

Inflamável	Red
Oxidante	Yellow
Tóxico	Black
Ácido	Blue
Alcalino	Green
Não perigoso	White
Reativo à água	Purple
Pirofórico	Orange

Ao longo da reorganização dos reagentes observou-se que o espaço, ventilação, temperatura e limpeza onde os reagentes eram armazenados se adequava. Após a recolocação de todos os reagentes no local devido os utilizadores foram informados do seu funcionamento, de uma forma simples e prática.

## 2.4 Conclusão e perspectivas futuras

Este trabalho introduziu regras específicas sobre o armazenamento de todos os reagentes no laboratório de investigação e desenvolvimento da CIPAN. Com a implementação das mesmas pretende-se reduzir o risco para os trabalhadores, meio ambiente e melhor controlo e gestão de *stocks*.

É atualmente mais fácil de obter através da ferramenta de base de dados a informação relativa a existência de uma qualquer substância, podendo desta forma os operadores tomar decisões rápidas quanto as necessidades de renovação de *stocks* decorrentes da utilização dos mesmos.

Futuramente é necessário implementar medidas que permitam dar continuidade ao trabalho agora desenvolvido, mantendo a organização e funcionamento de entrada e saída de reagentes, em articulação com o funcionamento do programa de gestão de reagentes. Para uma melhoria contínua o controlo visual é um processo que apoia o aumento de eficiência e eficácia tornando-as lógica, intuitivas e práticas no local onde se trabalha por exemplo ao aplicar um sistema de cartões (cartões *kanban*) que identificam o *stock* mínimo de cada produto ou equipamento com o objetivo de reduzir *stock* e minimizar custos. Em paralelo também se podem fazer ações de curta duração envolvendo várias pessoas de forma a demonstra o poder de intervenções rápidas, entre estas ações encontra-se a formação de utilizadores da base de dados e armazém de reagentes assim como a verificação do inventário que pode ser realizado em trabalho conjunto pelo laboratório de investigação e desenvolvimento.

Por fim, com o método de armazenamento operacional, poder-se-á estender este método e técnicas associadas a todos os armazéns da fábrica.

## **Capítulo 3 - Estudo de impurezas desconhecidas da Limeciclina**

---

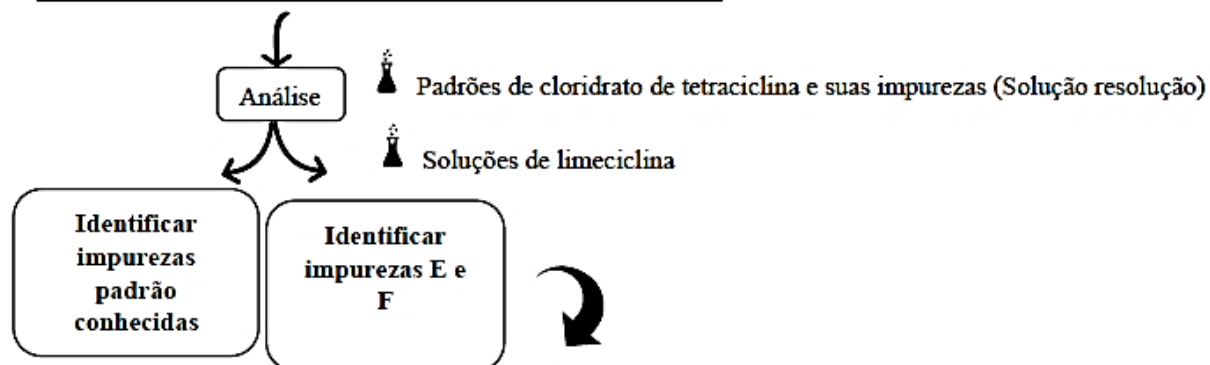
### 3.1 Introdução

O método de HPLC da monografia da Farmacopeia Europeia (FE) para a limeciclina revela a existência de duas impurezas, designadas por E e F, cuja estruturas não são conhecidas.. Infelizmente este método não é compatível com o acoplamento a sistemas de Espectrometria de Massa (MS) que, ao permitirem resolver a estrutura dos vários componentes dum cromatograma, facilmente permitiriam identificar as impurezas. Os sistemas MS requerem que os componentes da fase móvel sejam voláteis (requisito que a fase móvel da monografia da limeciclina não cumpre) de modo a permitir determinar as estruturas das impurezas desconhecidas.

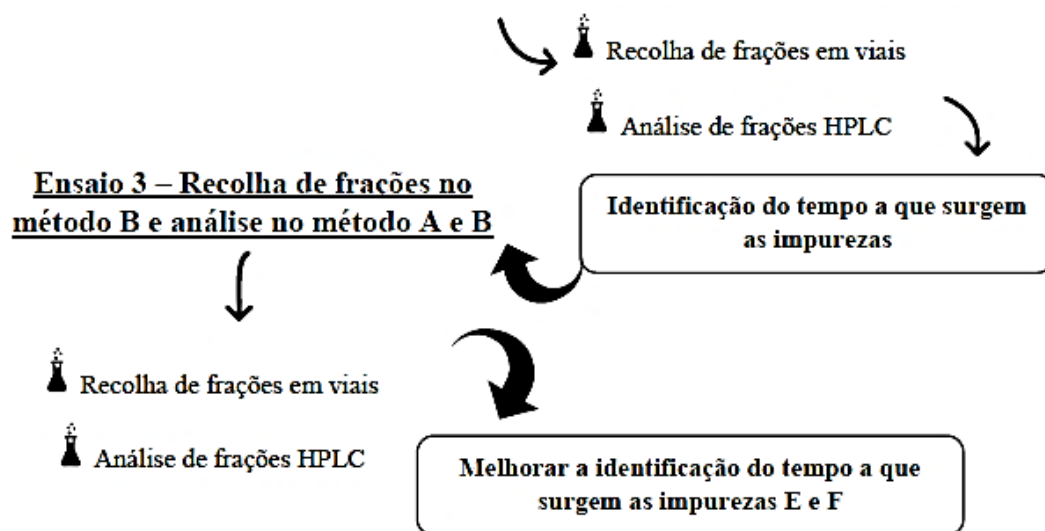
Em estudo pelo European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) está um método de análise por HPLC para oxitetraciclina dihidratada e cloridrato de oxitetraciclina, onde a fase móvel é volátil e permite a aplicação em sistemas LC-MS.

O estudo desenvolvido nesta tese tem a intenção de avaliar a utilização do método em estudo pelo EDQM na identificação das impurezas desconhecidas E e F de limeciclina, assim como prova de conceito noutros casos. Após identificação prévia por HPLC das impurezas no método do EDQM, estas poderão seguir para um MS, permitindo esclarecer-se a sua estrutura. A metodologia seguida neste estudo está representada na ilustração 7. O estudo dividiu-se em três ensaios, e em cada ensaio foram usados dois métodos distintos, método A (FE) e método B (EDQM). No primeiro ensaio preparou-se uma solução resolução contendo uma amostra de impurezas padrão de limeciclina e uma amostra de limeciclina da CIPAN, com o objetivo de identificar na solução resolução as impurezas de limeciclina e na amostra de limeciclina CIPAN identificar todas as impurezas incluindo as impurezas desconhecidas E e F. Neste ensaio define-se os tempos de retenção que serão úteis nos ensaios posteriores. Seguiu-se o segundo ensaio onde se recolheram as frações, em vias, da amostra de limeciclina CIPAN analisada pelo método A (FE) no ensaio anterior, e analisaram-se as frações em ambos os métodos (A e B) de forma a identificar todas as impurezas nos dois métodos (A e B) para se obter os tempos de retenção. Por fim no terceiro ensaio, em semelhança ao segundo ensaio, recolheram-se frações da amostra da limeciclina CIPAN, analisada no ensaio 1, através do método B (EDQM). Analisaram-se as frações recolhidas no método A (FE) e método B (EDQM) de modo a comparar as frações minuto-a-minuto para serem identificadas principalmente as impurezas desconhecidas E e F através dos tempos de retenção definidos no ensaio 1 e das impurezas já identificadas no ensaio 2.

**Ensaio 1 – Amostra de limeciclina no método A e B**



**Ensaio 2 – Recolha de frações de limeciclina no método A e análise no método A e B**



**Ilustração 7** - Esquema do estudo de impurezas de limeciclina.

### 3.1.1 Farmacopeia Europeia e *European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)*

O Conselho da Europa é uma organização intergovernamental que tem entre vários objetivos o de proteção de saúde, tendo nesse âmbito surgido a FE em 1964<sup>17</sup>. As reuniões da FE realizam-se em Estrasburgo, no EDQM, organização governamental do conselho da Europa que monitoriza a qualidade dos medicamentos participando de uma forma interventiva na elaboração da FE.

A estrutura legal da FE é constituída por dois órgãos executivos: a comissão, que inclui 37 delegações (estados membro e União Europeia) em que cada uma tem 3 elementos, e o secretariado permanente, constituído por 17 grupos de peritos e 31 grupos de trabalhos<sup>18</sup>. Cada grupo tem também um perito que pertence ao European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) and Healthcare, onde são realizadas as reuniões dos grupos.

A FE tem como missão a elaboração das especificações reconhecidas que estão destinadas a ser utilizadas por profissionais a quem diz respeito a qualidade do medicamento. Estas especificações devem ser de qualidade apropriada pois constituem uma das garantias fundamentais, para o doente e o consumidor, no que diz respeito à segurança do emprego dos medicamentos. A sua existência constitui uma garantia de qualidade para os medicamentos. As monografias e outros textos da FE são elaborados de modo a responderem às necessidades das autoridades que regulamentam os medicamentos, dos serviços encarregados dos controlos de qualidade e dos fabricantes de matérias-primas e de medicamentos<sup>19</sup>.

A FE edita por monografias cujo objetivo é o de assegurar a qualidade do produto acabado e dos reagentes utilizados no processo, que será administrado ao doente. As monografias contêm as especificações - procedimentos analíticos que definem características qualitativas e quantitativas - de cada substância ou preparação em questão<sup>19</sup>.

### 3.1.2 Tetraciclinas

As tetraciclinas são produzidas por bactérias gram-positivas *Streptomyces* e *Nocardia*, e foram descobertas no final dos anos 40 do séc. XX pelo Dr. Benjamin Dugger. As tetraciclinas são uma família de antibióticos que actuam como bacteriostáticos, penetrando na célula bacteriana por difusão passiva, atuando na inibição da síntese proteica, enfraquecendo a ligação entre o aminoacil-tRNA e o local aceitador do ribossoma/subunidade ribossomal 30S. Também

podem actuar como bactericidas através de interação com a membrana plasmática, causando lise celular<sup>20,21,22,23</sup>. Têm três grupos funcionais que influenciam a habilidade de permear a membrana e por isso distribuir o fármaco nas células bacterianas<sup>24,25,26,27,28</sup>. As tetraciclina são ainda fortes agentes quelantes, relevante pois a quelação de um íon metal bivalente é importante para a atividade do antibiótico. O local primário de quelação é o sistema 11,12- $\beta$ -dicetona<sup>29</sup>.

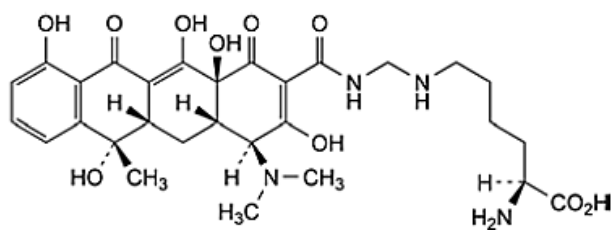
Como agentes terapêuticos têm um espectro de ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas tais como a *chlamydiae*, *mycoplasmas*, *rickettsiae* e parasitas *protozoan*, a sua baixa toxicidade torna-as muito seguras de aplicar e têm um baixo custo de produção<sup>29</sup>.

### 3.1.3 Limeciclina

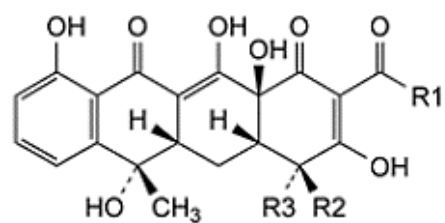
Apesar do sucesso das tetraciclina, houve a necessidade de procurar análogos com o objetivo de melhorar as suas propriedades (vd. infra). A abordagem de *Carreri e Manfredi* em 1962 permitiu formular a limeciclina, um pró-fármaco obtido pela combinação de tetraciclina base com L-lisina na presença de formaldeído que a pH neutro a ácido hidrolisa. Caracteriza-se pela aparência amarela, por ser um pó higroscópico, solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e insolúvel em cloreto de metileno<sup>30</sup>. A limeciclina possui algumas vantagens relativamente à tetraciclina, como melhor farmacocinética, menores efeitos colaterais, maior solubilidade particularmente em água, assim como uma absorção mais completa pelo trato gastro intestinal<sup>31</sup>.

A limeciclina (Fig.7) (2S)-6-[[[(4S,4aS,5As,6S,12as)-4(dimetilamino)-3,6,10,10,12 a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a, octahidrotetracen-2-il]-formamido]-metil)amino]-2-ácido hexanóico é um antibiótico<sup>32</sup>, um aminoácido-tetraciclina de 2ª geração, semissintético, que impede a proliferação de bactérias *propionibacterium acnes*, que causam acne e tem efeito anti-inflamatório<sup>32</sup>. A limeciclina atua tanto em bactérias gram-positivas como gram-negativas. Entra nas bactérias gram-negativas por duas formas, difusão passiva através de canais hidrofílicos, formados por proteínas porinas da membrana celular, e por transporte ativo por meio de um sistema dependente de energia que bombeia tetraciclina ao longo da membrana citoplasmática<sup>33</sup>.

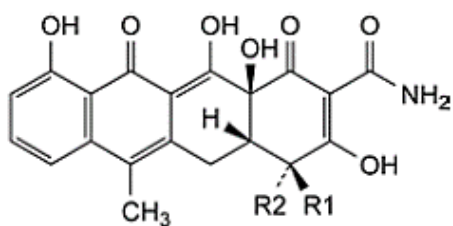
A farmacopeia europeia considera oito substâncias relacionadas detetáveis no seu método, seis de estrutura conhecida (Ilustração 8) e duas de estrutura não determinada<sup>30</sup>.



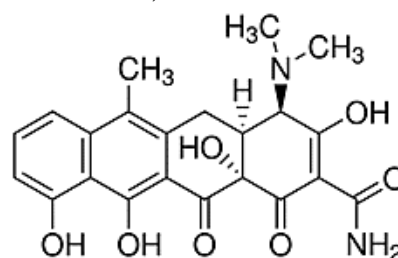
Estrutura química da limeciclina



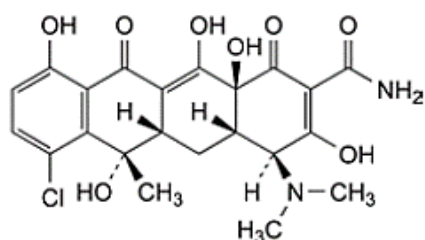
Estrutura química de 4-epitetraciclina, R1 - NH<sub>2</sub>, R2 - H<sub>3</sub>CNCH<sub>3</sub>, R3 - H



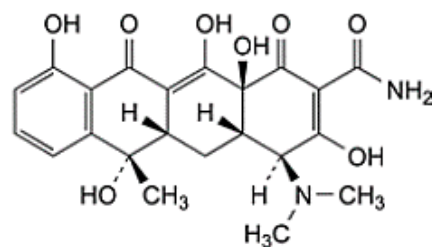
Estrutura química da anidrotetraciclina, R1 - H<sub>3</sub>CNCH<sub>3</sub>, R2 - H



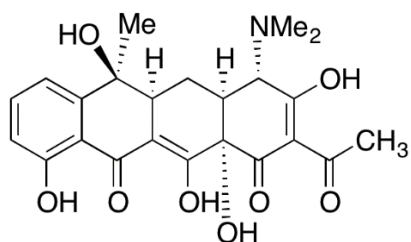
Estrutura química de 4-epianidrotetraciclina



Estrutura química de clorotetraciclina.



Estrutura química de tetraciclina.



Estrutura química 2-acetil-2-decarbamoiltetraciclina

### Ilustração 8 - Impurezas de limeciclina.

### 3.1.4 Método analítico de HPLC

A cromatografia é um processo que permite separar misturas nos seus componentes baseando-se na migração diferencial de compostos entre duas fases distintas<sup>34,35</sup>. Em cromatografia líquida, uma amostra é separada nos seus constituintes (analitos) que eluem a diferentes velocidades ao longo da coluna cromatográfica, devido à forma específica como interagem com uma mistura líquida, a fase móvel, e uma fase estacionária, que consiste em material empacotado que pode ter diferentes características físico-químicas dentro de uma coluna com elevada área superficial<sup>36</sup>.

No presente trabalho a técnica cromatográfica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), uma técnica analítica versátil, eficiente e amplamente utilizada na análise de produtos farmacêuticos, alimentares, petroquímico, biomoléculas, polímeros, compostos orgânicos e iônicos<sup>36</sup>. Em cromatografia líquida de alta eficiência são utilizadas colunas contendo partículas de menores dimensões como material de enchimento, que podem ser modificadas quimicamente à superfície, de forma a interagir com os analitos, o que aumenta a eficiência da técnica.

O modo de separação aplicado é o de fase reversa, baseada em forças hidrofóbicas, onde a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar<sup>36</sup>. Regra geral os constituintes das amostras mais polares são menos retidos e eluem primeiro e os mais apolares mais retidos e saem depois.

Em HPLC há dois modos diferentes de eluição. O método de eluição mais simples designa-se eluição isocrática, onde a composição da fase móvel é constante ao longo de toda a corrida. Já no modo de eluição por gradiente, a composição da fase móvel varia ao longo do tempo. Regra geral, no modo de eluição por gradiente é introduzida uma maior percentagem do modificador orgânico, tornando a fase móvel menos polar, diminuindo por isso o tempo de retenção dos analitos, o que diminui o tempo de análise.

Apos a separação cromatográfica, os aparelhos de HPLC estão munidos de um detetor com capacidade de detetar uma propriedade físico-química dos componentes e assim traçar o registo cromatográfico da separação (cromatograma), um gráfico onde a propriedade físico-química detetada é representada em função do tempo de corrida.

Os picos formados no cromatograma permitem a identificação dos componentes da amostra através do tempo de retenção característico do analito, determinado com o auxílio de padrões do composto. Também permitem a quantificação do composto uma vez que a área do

pico é proporcional á sua concentração. A comparação desta área com uma calibração obtida com padrões permite determinar a concentração da amostra.

Outros parâmetros precisam de ser controlados de forma a obter resultados fiáveis, como por exemplo a temperatura da coluna, velocidade de fluxo do eluente e do volume de injeção da amostra.

Para caracterizar a separação cromatográfica, aplicam-se os seguintes conceitos: fator de retenção ( $k$ ), seletividade ( $\alpha$ ), eficiência ( $N$ ) e resolução ( $R_s$ ).

Em relação ao fator de retenção,  $k$  é a medida de retenção de determinado composto no sistema cromatográfico em condições definidas. Baseia-se nos tempos de retenção dos compostos ( $t_R$ ) e de um composto não retido pela fase estacionária ou pela frente de solvente ( $t_0$ ):

$$[4] \quad k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

e a razão entre os tempos de retenção  $k_2/k_1$  de dois solutos designa-se por seletividade<sup>34</sup>:

$$[5] \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

À medida que cada soluto migra ao longo da coluna verifica-se alguma dispersão, representado no cromatograma por um alargamento do pico, que se deseja minimizar. Essa dispersão é caracterizada pela eficiência na separação ( $N$ ), relacionada com a razão entre a largura da base do pico ( $w$ ) e o tempo de retenção ( $t_R$ )<sup>34</sup>:

$$[6] \quad N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

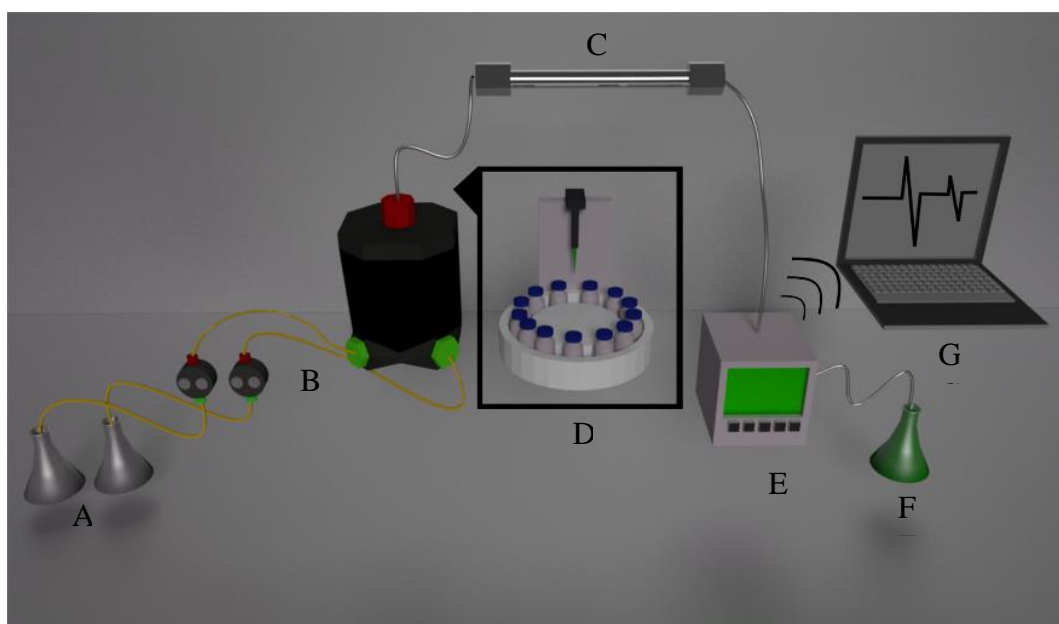
A eficiência aumenta à medida que o comprimento da coluna aumenta ou o tamanho da partícula diminui. De uma forma prática a eficiência diminui ao aumentar o fluxo da fase móvel<sup>34</sup>.

A resolução é uma medida que representa a separação de dois componentes que inclui a dispersão do pico e a seletividade, onde  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  são os tempos de retenção e  $w_1$  e  $w_2$  as larguras da base dos picos do cromatograma dos componentes 1 e 2, respectivamente<sup>34,35</sup>.

$$[7] \quad R_s = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

O sistema típico de HPLC é constituído pelos seguintes componentes (Fig 14): A) reservatório de eluentes – onde é armazenada uma quantidade suficiente de eluentes de HPLC

que compõe a fase móvel; B) conjunto de bombas – que proporcionam o fluxo contínuo e constante da fase móvel através do sistema; C) coluna – onde está localizada a fase estacionária e são separados os componentes da mistura; D) injetor – permite a introdução (injeção) da mistura de componentes no sistema de separação; E) detetor – é o dispositivo que regista de forma contínua as propriedades físicas específicas do efluente da coluna, sendo o mais comum o de ultravioleta (UV), que permite um registo contínuo da absorvância a um ou mais comprimentos de onda seleccionados; G) sistema de controlo e aquisição de dados (CDS) – é o sistema que controla todos os parâmetros de instrumento HPLC (composição do eluente, temperatura, sequência de injeção etc.) e adquire dados a partir do detetor e monitoriza a performance do sistema (composição da fase móvel, temperatura, pressão etc.)<sup>37</sup>.



**Ilustração 9** - Representação esquemática com componentes de um HPLC. A – Reservatório de eluentes; B- conjunto de bombas; C – coluna; D – injetor e amostras; E – detetor; F- Desperdício; G – Sistema de controlo e aquisição de dados.

## 3.2 Materiais e Métodos

### 3.2.1 Materiais, reagentes e equipamento

Usou-se material volumétrico corrente (balões, provetas e micropipetas) e viais. O sistema cromatográfico HPLC usado foi o WATERS® Alliance System 2695, constituído por detetor de díodos 2996, forno da coluna SMH, amostrador automático SHC e software Empower® B1154.

Os reagentes usados para a preparação da fase móvel foram o hidrogenofosfato dipotássico (Panreac, reagente pró-análise), EDTA disódico (Panreac, reagente pró-análise), bissulfato de tetrabutílamónio (Panreac, 98%), butanol terciário (Cientific Fisher, reagente pró-análise), hidróxido de sódio 1N (Panreac, reagente pró-análise), ácido fosfórico (VWR BDH Prolabo, reagente pró-análise), acetonitrilo (VWR BDH Prolabo, reagente Super Gradient), metanol (Chem-Lab, reagente para HPLC), tetrahydrofurano (Panreac, 99,8% para HPLC), ácido trifluoracético (ACROS, 99%), metabissulfato de sódio (Panreac, reagente pró-análise), ácido clorídrico 1N (VWR Prolabo, 1N) e água ultrapura (Milli-Q). Todas as amostras, padrões e fase móvel foram dissolvidas e desgaseificadas no banho de ultra-sons (Bandolin Sonorex) antes de usadas. Para fazer o acerto do pH das soluções que compõe a fase móvel usou-se o medidor de pH (301 *Hanna Instruments*), que foi preparado para qualificar como descrito no capítulo 1 desta tese. Para a pesagem de padrões e amostras usou-se a balança analítica (AG285, Mettler Toledo). Antes da utilização de todos os reagentes consultou-se a ficha de produto CIPAN e a folha MSDS, de acordo com o procedimento a adoptar após a reorganização do armazém de reagentes descrita no capítulo 2.

### 3.2.2 Condições dos métodos

Na tabela 6 estão descritos os parâmetros usados de acordo com o método da limeciclina na Farmacopeia Europeia 8.0, designado por método A.

**Tabela 6** – Parâmetros do método cromatográfico A (FE)

Técnica	Cromatografia líquida (HPLC-UV)
Equipamento	Waters Alliance
Coluna	Thermo Scientific™ HyperREZ™ C8 (8µm)

	Comprimento: 250mm Diâmetro: 4,6mm Enchimento: copolímero estireno-divinilbenzeno
Modo de eluição	Isocrático
Fluxo	1mL/min
Detector UV ( $\lambda$ )	254 nm
Temperatura da coluna	60°C
Volume de injeção	Ensaio 1 e 2: 20 $\mu$ L Ensaio 3: 100 $\mu$ L
Fase móvel	Tert-butanol - Bissulfato de tetrabutílamônio (10g/L) - Hidrogenofosfato de dipotássio (35g/L) - EDTA dissódico (40g/L) 20:20:10:1, v/v/v
Solvente para dissolução de amostras	Metanol
Tempo de corrida	60min

Na tabela 7 estão descritos os parâmetros usados de acordo com o método em estudo para a oxitetraciclina para atualização da monografia da oxitetraciclina em novas edições da *Farmacopeia Europeia* 8.0, designado por método B.

**Tabela 7** – Parâmetros do método cromatográfico B (EDQM)

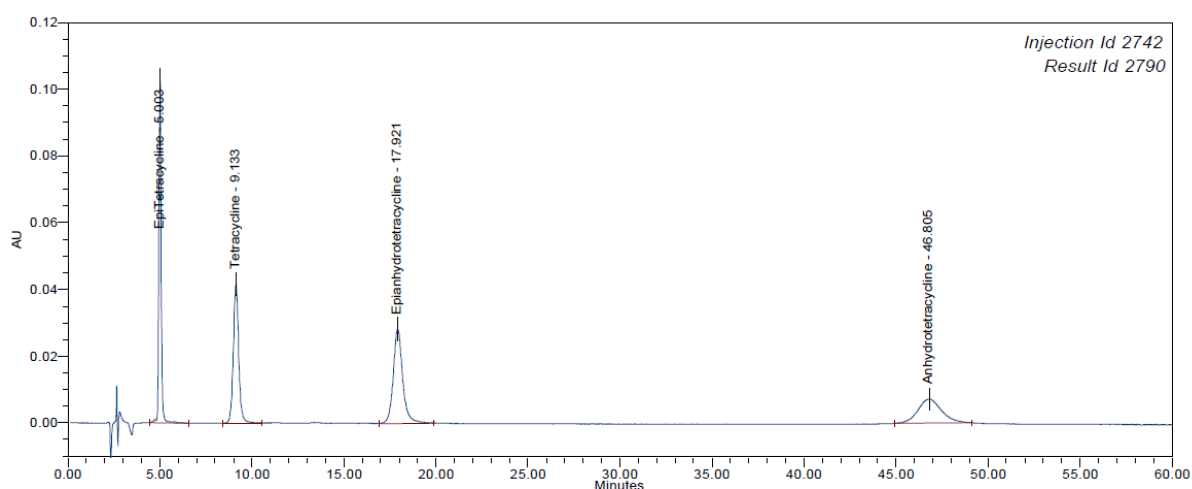
Técnica	Cromatografia líquida (HPLC-UV)
Equipamento	Waters Alliance
Coluna	G.L.Sciences Inertsil® C8 (5 $\mu$ m) Comprimento: 150mm Diâmetro: 4,6mm Enchimento: gel de sílica com octilsilano
Modo de eluição	Gradiente (min/%B) 0/10

	5/10 20/35 25/10
Fluxo	1,3 mL/min
Detector UV ( $\lambda$ )	254 nm
Temperatura da coluna	50°C
Volume de injeção	Ensaio 1 e 2: 10 $\mu$ L Ensaio 3: 100 $\mu$ L
Fase móvel Solução A Solução B	0,05% TFA em água ACN – MeOH – THF 80:15:5, v/v/v
Solvente para dissolução de amostras	Metanol
Tempo de separação	20min

### 3.3 Discussão de resultados

#### 3.3.1 Amostra de limeciclina no método A e B

A intenção da abordagem inicial ao estudo passou por identificar as impurezas E e F. Como indicado no ponto 3.2.2, no método A usaram-se os parâmetros do método de análise HPLC de limeciclina pela FE, e no método B os do método de análise HPLC de oxitetraciclina em estudo pelo EDQM. Começou-se por identificar as impurezas padrão conhecidos, como a epitetraciclina, tetraciclina, 4-epianidrotetraciclina e anidrotetraciclina através da análise destes padrões que estão representados na solução resolução no método A (Ilustração 10).



**Ilustração 10** - Solução resolução e) (cf. Anexo XII, preparação de amostras e padrões) com os padrões de impurezas de tetraciclina analisados no método A

**Tabela 8** - Dados relativos às impurezas de tetraciclina na solução resolução no método A

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	5.003	890753
Tetraciclina	9.133	849506
4-Epianidrotetraciclina	17.921	1010264
Anidrotetraciclina	46.805	652192

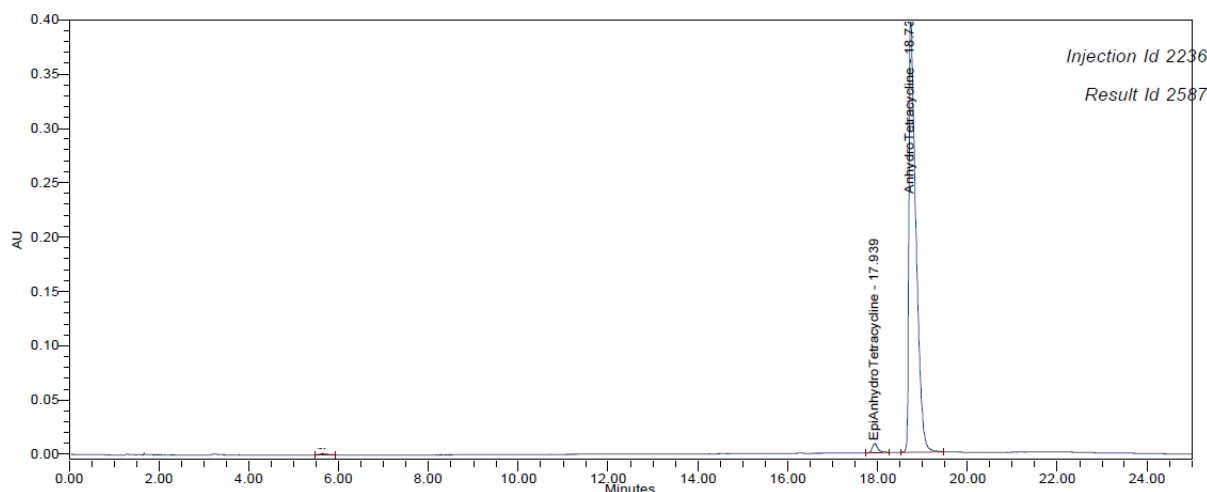
**Tabela 9** - Tempos de retenção das impurezas da limeciclina definidas na monografia da farmacopeia europeia.

Impureza	t <sub>RR</sub> (Tempo relativo de retenção)	t <sub>R</sub> (min) (tempo de retenção)
Tetraciclina	-	8
Impureza E (desconhecida)	0,5	4

Impureza A (4-epitetraciclina)	0,6	4,8
Impureza F (desconhecida)	0,68	5,44
Impureza B (2-aceti-2-decarbamoiltetraciclina)	1,2	9,6
Impureza D (4-epianidrotetraciclina)	1,45	11,6
Impureza G (clorotetraciclina)	1,45	11,6
Impureza C (anidrotetraciclina)	2,95	23,6

Os tempos de retenção relativos das impurezas são obtidos através da divisão do tempo de retenção do pico principal, neste caso a tetraciclina, pelo tempo de retenção da impureza. É a partir destes tempos de retenção (Tabela 9) que iremos identificar as impurezas obtidas no método A.

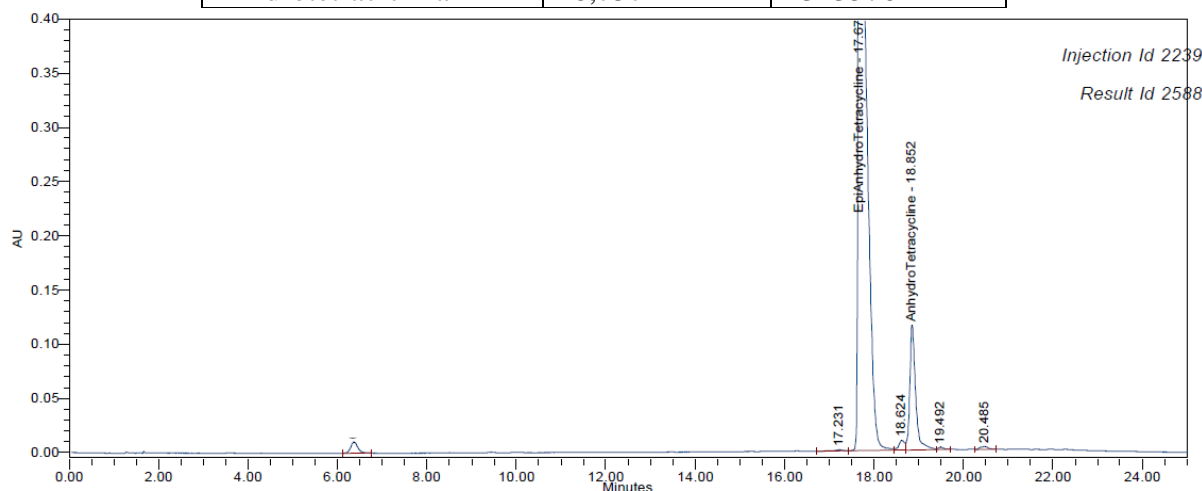
Obteve-se também a análise de soluções padrão de anidrotetraciclina (Ilustração 11), 4-epianidrotetraciclina (Ilustração 12) e anidrotetraciclina (Ilustração 13) no método B de forma a obter o tempo de retenção de cada impureza. Este passo é importante pois define os tempos de retenção das impurezas padrão e podemos posteriormente identificá-las na solução resolução no método B e também nas frações de limeciclina no método B, no segundo ensaio. Nos cromatogramas apresentados a impureza com maior área é a que corresponde a impureza analisada.



**Ilustração 11** - Solução de anidrotetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B

**Tabela 10** - Dados relativos à solução de anidrotetraciclina no método B.

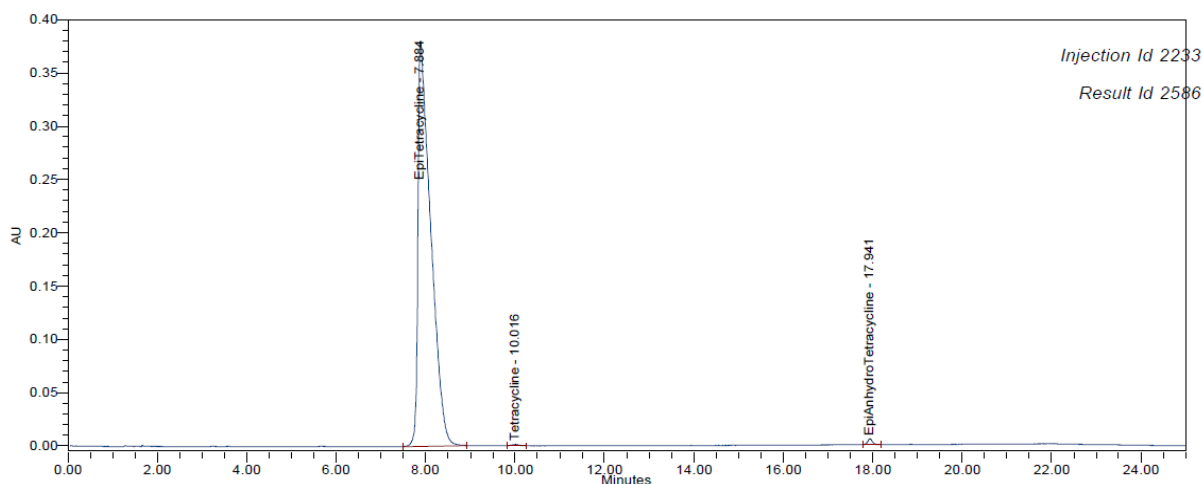
Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epianidrotetraciclina	17,939	71636
Anidrotetraciclina	18,737	4323576



**Ilustração 12** - Solução de 4-epianidrotetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B

**Tabela 11** - Dados relativos à solução de epianidrotetraciclina no método B.

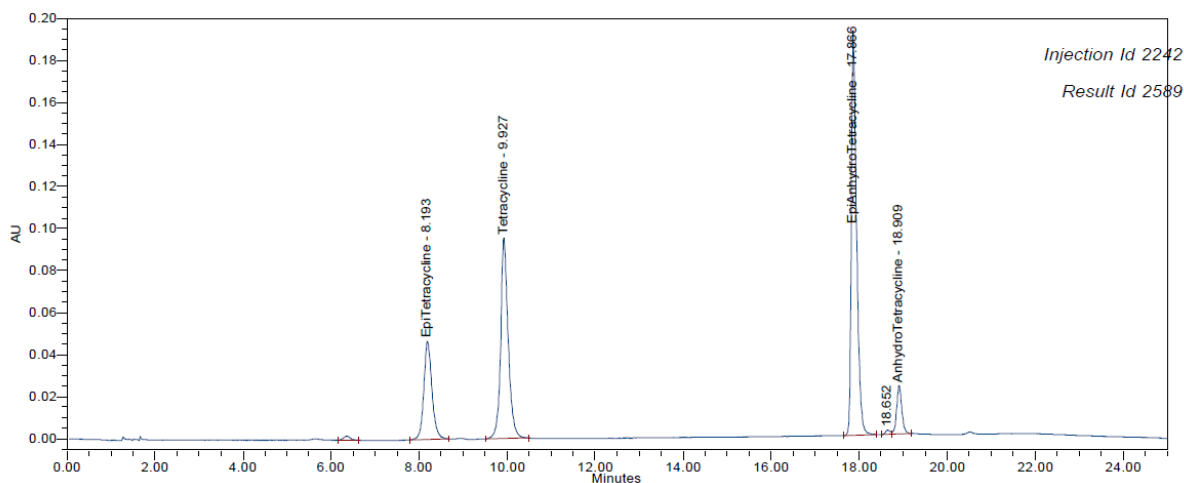
Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epianidrotetraciclina	17,678	8292015
Anidrotetraciclina	18,852	1049017



**Ilustração 13** - Solução de 4-epitetraciclina (cf. Anexo XI, preparação de amostras e padrões) padrão analisada no método B.

**Tabela 12** - Dados relativos à solução de 4-epitetraciclina no método B.

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	7,884	7528387
Tetraciclina	<b>10,016</b>	14004
4-Epianidrotetraciclina	17,941	40656



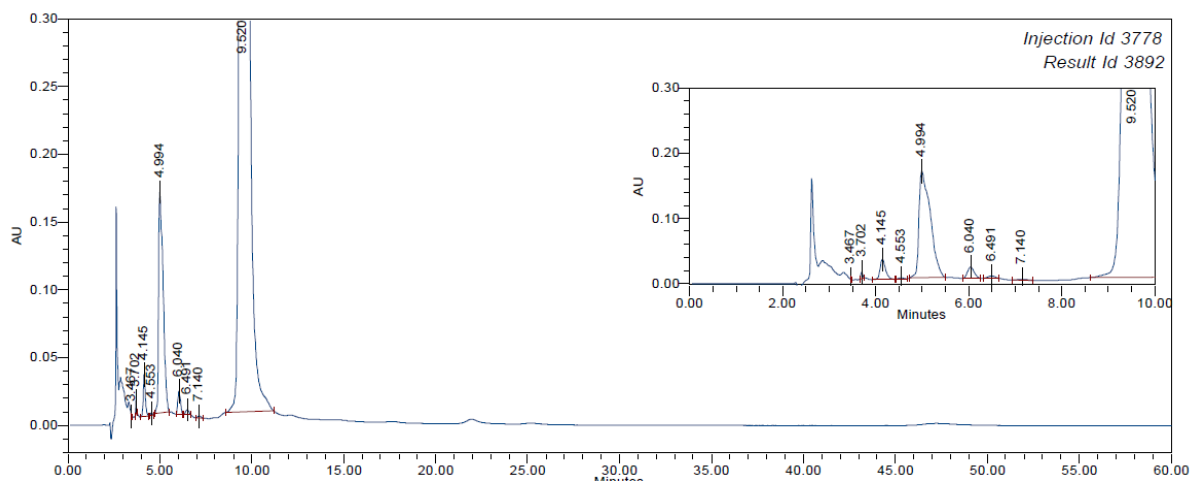
**Ilustração 14** - Solução resolução e) (cf. Anexo XII, preparação de amostras e padrões) com os padrões de impurezas de tetraciclina analisados no método B.

A solução resolução (ilustração 14) permite-nos também observar a resolução das impurezas apresentadas, enquanto o método A é um método ajustado à limeciclina o método B é uma experiência, no entanto pode-se observar que há uma boa separação das impurezas entre si.

**Tabela 13-** Dados relativos às impurezas de tetraciclina na solução resolução no método B

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	8.193	593715
Tetraciclina	9.927	1132965
4-Epianidrotetraciclina	17.866	1591438
Anidrotetraciclina	18.909	14775

Após a obtenção dos cromatogramas da mesma solução resolução padrão pelos métodos A e B, selecionou-se a amostra padrão de limeciclina a analisar. Escolheu-se uma amostra recente e que apresentasse uma boa resolução e área de picos. O lote de limeciclina escolhido foi o 305.40068 13. Através da comparação do cromatograma da amostra com o da solução resolução padrão e o das soluções de impurezas padrão será possível reconhecer as impurezas conhecidas na amostra de limeciclina, tanto no método A como no método B e, por exclusão, obter os picos suspeitos de corresponder às impurezas E e F

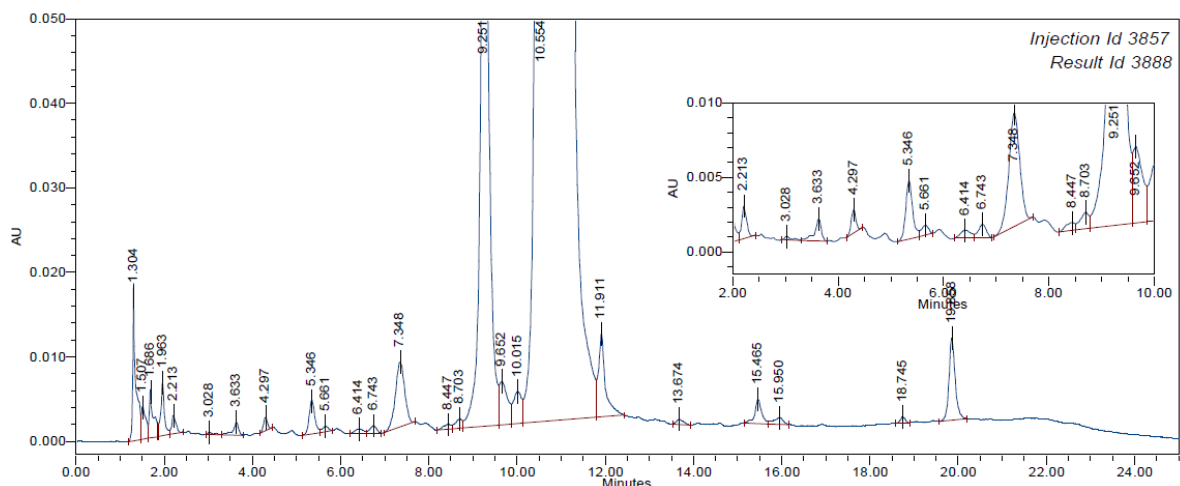


**Ilustração 15** - Solução limeciclina lote 305.40068 1 3 analisada no método A.

Observando a ilustração 15 e a tabela 14 e de acordo com a tabela 9, que contem os tempos de retenção das impurezas podemos identificar a tetraciclina aos 9,520 minutos, através da ampliação identificamos a 4-epitetraciclina aos 4,994 minutos, a impureza E aos 4,145 minutos e a impureza F aos 6,040. Observa-se que a impureza E sai em primeiro lugar seguida da 4-epitetraciclina, a impureza F segue-se logo na cauda da 4-epitetraciclina e finalmente a tetraciclina.

**Tabela 14** - Dados relativos á solução de limeciclina no método A

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
Impureza E	4.145	250395
4-Epitetraciclina	4.994	2751962
Impureza F	6.040	167938
Tetraciclina	9.520	55370159



**Ilustração 16** - Solução de limeciclina no método B.

Nesta análise a quantidade de picos é ainda maior, mas aparecem mais dispersos ao longo do tempo de análise. Através da análise da ilustração 16 observamos que as impurezas saem de acordo com o expectável, isto é, de acordo com a tabela 9 que nos é dada pela monografia da FE, reconhecemos as impurezas essenciais ao estudo. Analisando o cromatograma da solução de limeciclina no método B podemos atribuir a impureza E ao pico correspondente aos 7,348 minutos, a 4-epitetraciclina aos 9,652 minutos, a impureza F aos 9,652, a tetraciclina aos 10,554 minutos e a 4-epianidrotetraciclina aos 18,858 minutos. As impurezas foram identificadas de acordo com os tempos de retenção obtidos na análise das impurezas padrão e solução resolução.

**Tabela 15-** Dados relativos à solução de limeciclina no método B

Impureza	$t_{RR}$	$t_R$ (min)	Área
Impureza E	0,696	7.348	111930
4-Epitetraciclina	0,873	9.215	1085612
Impureza F	0,914	9.652	67074
Tetraciclina	-	10.554	21700283
4-Epianidrotetraciclina	1,786	18.858	95060

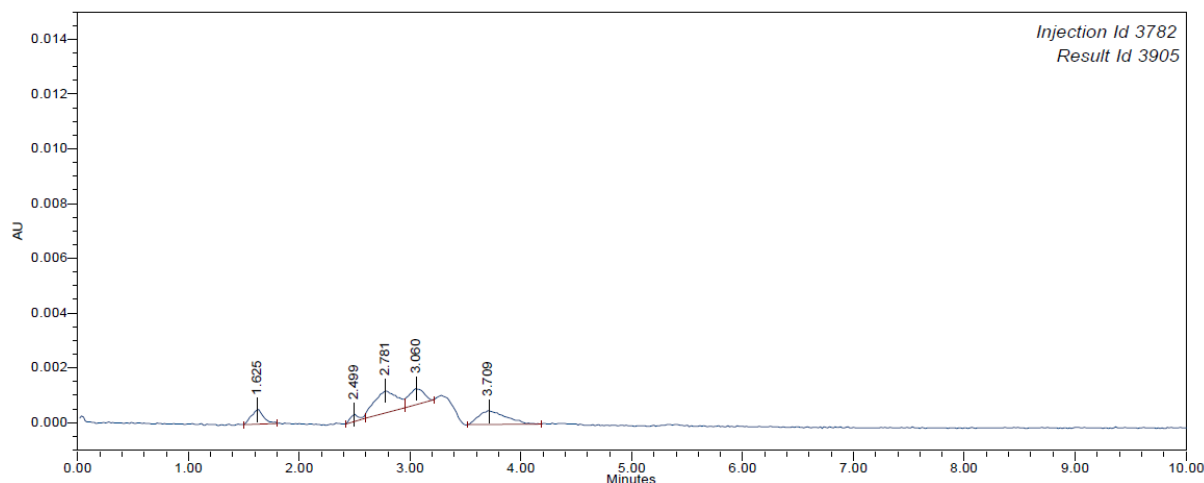
Após reconhecer as principais impurezas calculei os tempos de retenção relativos que permitem identificar os picos de acordo com o pico principal, tetraciclina. A impureza E e F foi reconhecida por sabermos que no método A a impureza E sai antes da 4-epitetraciclina e a impureza F sai após a 4-epitetraciclina, e por vezes a impureza F sai eluída com a 4-epitetraciclina, causando tailing no pico.

### 3.3.2 Recolha de frações no método A e identificação de impurezas no método A e B

Como as análises por MS requerem que a impureza esteja isolada, de forma a ser caracterizada, recolheram-se frações da amostra de limeciclina no método A, na ilustração 15.

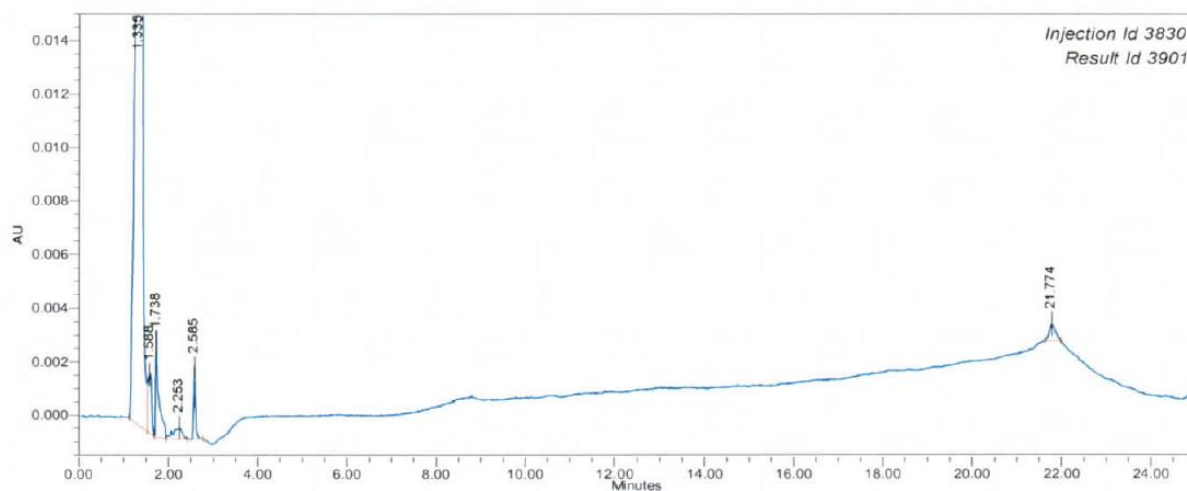
A recolha de frações da solução de limeciclina no método A e a posterior identificação das impurezas nas frações no método A e B é um passo de transição para observarmos as diferenças que ocorrem ao mudar apenas um método de análise, uma vez que o objetivo final é o de identificar as impurezas apenas no método B.

Este passo permite confirmar que as impurezas estão a ser retidas no tempo já observado no ensaio anterior, isto no método A e quando se analisam as frações no método B pretende-se observar se os tempos também se mantêm ou se são afetados de alguma forma.



**Ilustração 17** - Fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, no método A.

As frações foram analisadas no método A durante menos tempo que o normal uma vez que os picos E e F que procuramos irão encontrar-se neste espaço de tempo. Foi necessário aumentar o volume de injeção de 20 microlitros para 100 microlitros de modo a que os picos se tornassem mais visíveis pelo detetor. A fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos mostra alguns picos que se devem à deteção da fase móvel, não existindo picos relevantes ao estudo.

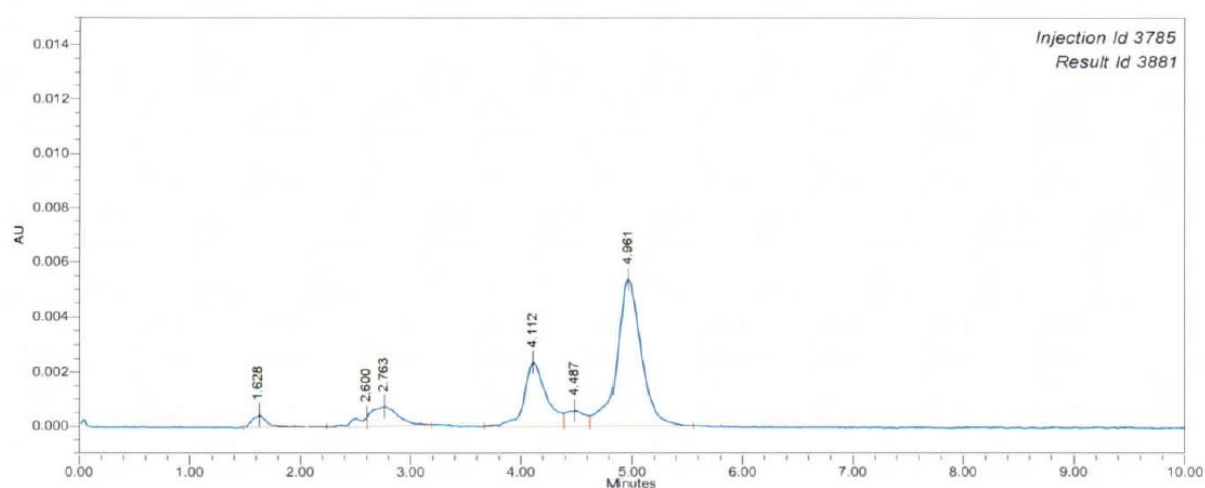


**Ilustração 18** - Fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, método B.

A mesma fração no método B não é muito informativa, inicialmente há muita informação devido a fase móvel e apenas podemos identificar a anidrotetraciclina aos 21.774 minutos, resultado da degradação da tetraciclina e que poderá estar a sobrepor-se a todos os possíveis picos.

**Tabela 16** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 3 aos 4 minutos, método B.

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
Anidrotetraciclina	21.774	5849

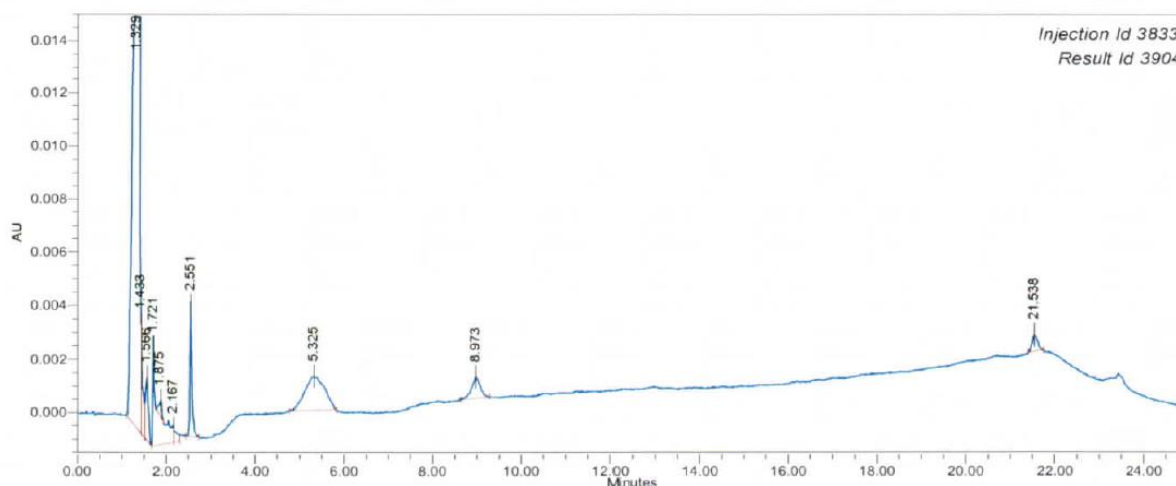


**Ilustração 19** - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.

No cromatograma acima podemos observar duas impurezas com especial relevância, aos 4,112 minutos e aos 4,961 minutos. A primeira mantém-se como uma suspeita da impureza E e a segundo corresponde à 4-epitetraciclina.

**Tabela 17** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.

Impureza	t <sub>R</sub> (min)	Área
Impureza E	4.112	32550
4-Epitetraciclina	4.961	82083

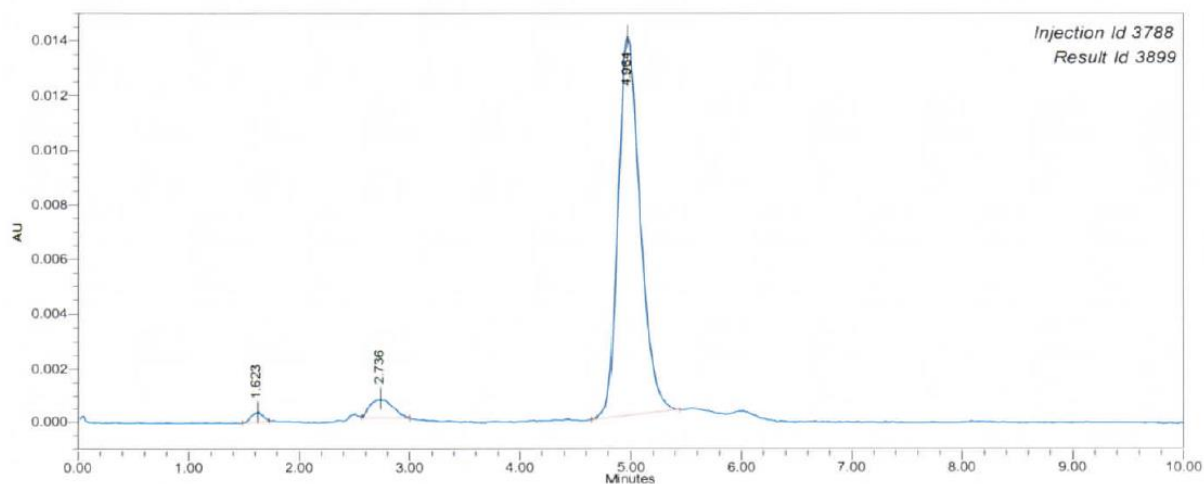


**Ilustração 20** - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.

O cromatograma correspondente ao anterior, mas cujo método de análise foi diferente apresenta também ele dois picos. A primeira impureza é uma suspeita da impureza E aos 5,325 minutos e a segunda a 4-epitetraciclina aos 8,973 minutos.

**Tabela 18** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.

Impurezas	t <sub>R</sub> (min)	Área
Impureza E	5.325	41390
4-Epitetraciclina	8.973	11219

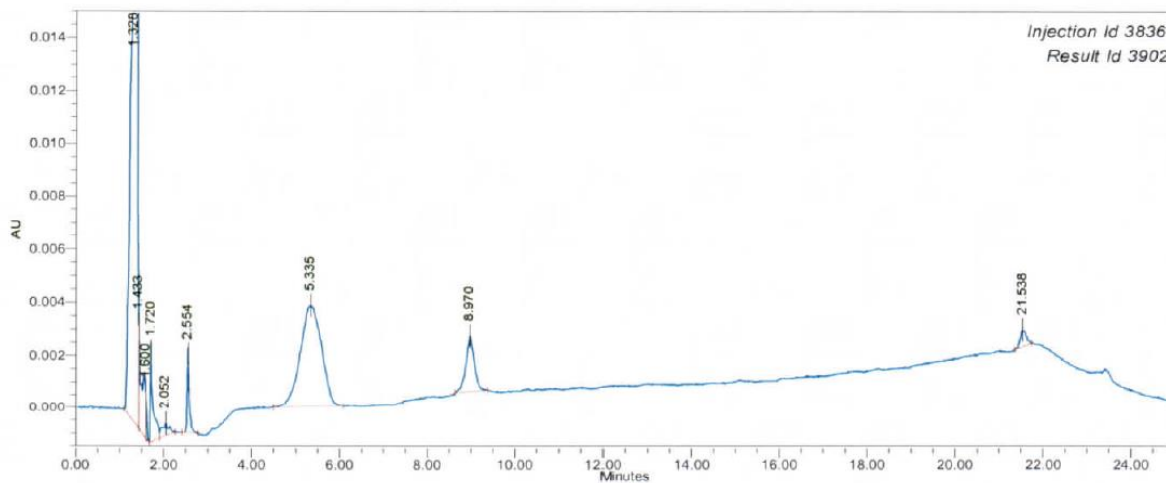


**Ilustração 21** - Fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método A.

A fração dos 5 aos 6 minutos permite confirmar de forma muito clara a existência da 4-epitetraciclina aos 4,964 minutos.

**Tabela 19** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método A.

Impurezas	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	4.964	194401



**Ilustração 22** - Fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método B.

É possível observar duas impurezas relevantes, a impureza E aos 5.335 minutos e outra será a 4-epitetraciclina aos 8.970 minutos.

A partir desta fração só já serão visíveis picos de elevada área como por exemplo a tetraciclina ou impurezas cujo tempo de retenção é superior. As impurezas relevantes ao estudo já foram apresentadas, não se tendo observando a impureza F, talvez porque ter sido eluída

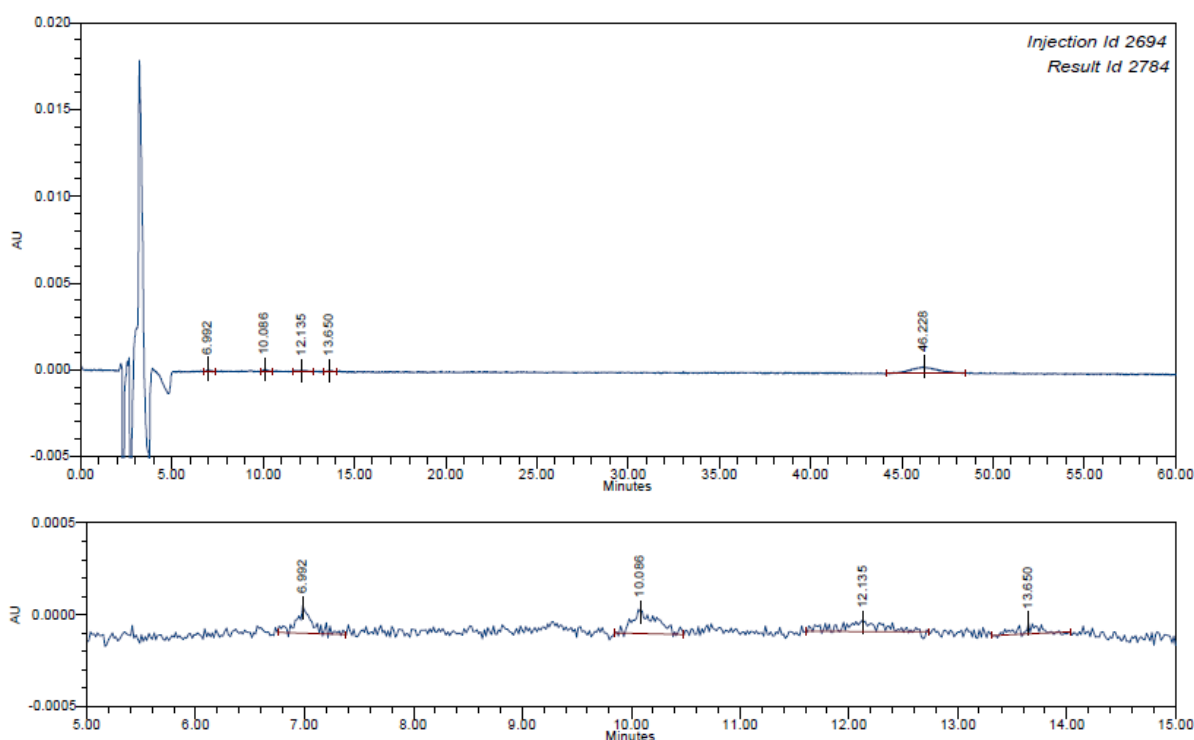
juntamente com a 4-epitetraciclina. As restantes frações obtidas apresentam valores elevados de anidrotetraciclina, indicado alguma degradação da tetraciclina ao longo do estudo.

**Tabela 20** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 5 aos 6 minutos, método B.

Impurezas	t <sub>R</sub> (min)	Área
Impureza E	5.335	131748
4-Epitetraciclina	8.970	28712

### 3.3.3 Recolha de frações no método B e identificação de impurezas no método A e B

No terceiro ensaio procurámos isolar as impurezas no método B para depois ser possível usar-se em MS. Analisou-se uma amostra de limeciclina no método B como podemos observar na ilustração 18, através dessa amostra recolheram-se frações que analisamos posteriormente de forma a observar as impurezas já identificadas anteriormente e identificar a impureza E e F no método B através dos tempos de retenção já definidos anteriormente.



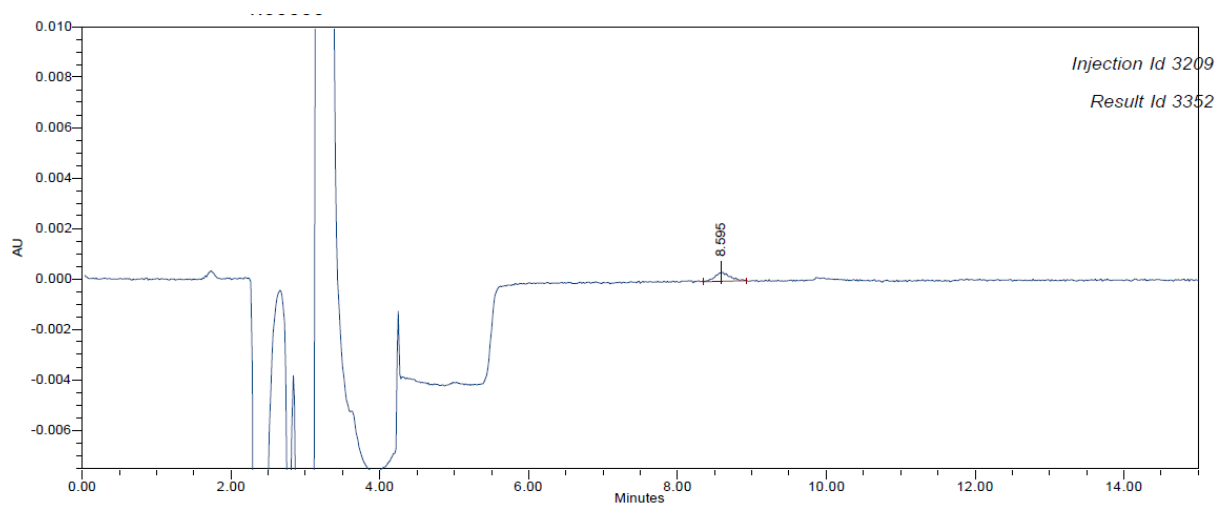
**Ilustração 23** - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.

A fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos foi a que anteriormente permitiu visualizar mais componentes, entre eles era uma possibilidade encontrarem-se as impurezas, no entanto ao fazermos primeiro a análise no método B recolhendo depois as frações e analisando no

método A, não é possível observar muitos componentes e os que é possível observar são em pequena quantidade. Aos 6,992 minutos será provavelmente a 4-epitetraciclina, aos 10,086 minutos a tetraciclina e aos 46,228 minutos a anidrotetraciclina.

**Tabela 21** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método A.

Impurezas	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	6.992	1629
Tetraciclina	10.086	2101
Anidrotetraciclina	46.228	33907



**Ilustração 24** - Fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.

A mesma fração de limeciclina, recolhida no método B e analisada no método B, tornou-se inconclusiva, assim como as restantes frações, pois não permite visualizar nenhum componente em concreto como podemos observar na ilustração 26, deixando-nos com poucas opções para prosseguir o estudo.

**Tabela 22** - Dados relativos à fração de limeciclina dos 4 aos 5 minutos, método B.

Impurezas	t <sub>R</sub> (min)	Área
4-Epitetraciclina	8.595	4985

Através da ilustração 25 e 26 podemos observar uma clara falta de componentes na amostra, os componentes não apresentam áreas relevantes, não tendo assim sido possível avançar com o método B proposto para identificar por HPLC as impurezas E e F.

### 3.4 Conclusão e perspectivas futuras

O estudo desenvolvido não permitiu concretizar o objetivo final de determinar estruturalmente as duas impurezas E e F da limeciclina que ainda permanecem desconhecidas, no entanto o estudo carece de mais investimento de tempo e novas abordagens (vd. Infra). Foi possível observar algumas suspeitas dos picos no ensaio um, na ilustração 16 observou-se a suspeita de impureza E aos 7,348 minutos e a impureza F aos 9,652 minutos, no ensaio dois na ilustração 19 só é possível tomar como suspeita a impureza E aos 4,112 minutos, contudo sem certezas. O terceiro ensaio deixou no ar ainda mais incertezas pois não permitiu identificar impurezas suspeitas.

Futuramente, algumas das abordagens a tomar poderiam envolver formas de aumentar a resolução de picos, como o uso de outras colunas ou outras fases móveis compatíveis com LC-MS, utilizar o HPLC preparativo de forma a recolher uma maior quantidade de amostra, onde cada fração pode ser isolada e obtida uma nova amostra que pode ser caracterizada por técnicas como MS, para excluir a degradação do princípio ativo testes de estabilidade comparativa na preparação do método A e na preparação do método B.

O estudo desenvolvido foi enriquecido através dos dois capítulos que o antecederam, uma vez que permitiu desenvolver um trabalho mais rigoroso, preciso e eficiente. Os medidores de pH estão prontos a ficarem qualificados, o que contribuiu para a normalização na preparação das soluções. A reorganização do armazém de reagentes permitiu que todos os métodos e soluções fossem conformes assim como todos os produtos obtidos no laboratório de investigação e desenvolvimento.

# Bibliografia

- (1) Council of Europe. *Directiva 2004/10/CE do Parlamento Europeu e do Conselho*; Strasburg, 2004.
- (2) World Health Organization (WHO). *Handbook Good Laboratory Practices (GLP)*, 2nd ed.; WHO Press: Geneva, CH, 2009; Vol. 51.
- (3) Engaged Knowledge Application. GLP vs. GMP Regulations: A Review of Their Intended Purposes and Requirements [www.enkap.com](http://www.enkap.com) (accessed Mar 15, 2015).
- (4) Carson, P.; Dent, N. *Good Clinical, Laboratory and Manufacturing Practices*, 1st ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2007.
- (5) Moran, L.; Masciangioli, T. *Chemical Laboratory Safety and Security: A Guide to Prudent Chemical Management*, 1st ed.; The National Academies Press: Washington, DC, 2010.
- (6) Department of Health and Human Services. *21 CFR 58 - Good Laboratory Practice Regulations*; Silver Spring, MD, 2014.
- (7) European Commission. *Qualificação e validação*; Bruxelas, 2001.
- (8) European Commission. *The rules governing medicinal products in the european union*; Brussels, 2010.
- (9) United States Pharmacopeial Convention. <1058> *Analytical Instrument Qualification*, USP38-NF34.; Rockville, MD, 2015.
- (10) Jena, S.; Sravya, K.; Goje, A.; Prasad, D. N.; Sameer, S. *Int. J. Nov. Drug Deliv. Technol.* **2011**, 1 (3), 190–200.
- (11) Webster, J. *The Measurement, Instrumentation, and Sensors Handbook*, 1st ed.; Boca Raton, FL, 1999.
- (12) Council of Europe. *Potenciometric determination of pH*, 8.0.; Council of Europe, Ed.; Strasburg, 2014.
- (13) United States Pharmacopeial Convention. <791> *pH*, USP38-NF34.; Rockville, MD, 2015.
- (14) European Chemicals Agency ECHA. *Regulamento (CE) N.º 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 18 de Dezembro de 2006*; Helsínquia, 2016.
- (15) National Academy of Sciences. *Prudent Practices in the Laboratory: Handling and management of chemical hazards*; National Academies Press: Washington, D.C., 2011.
- (16) Pinto, J. P. *Pensamento Lean*, 6ª edição.; LIDEL, Ed.; Lisboa, 2014.
- (17) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Background & Mission <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-background-50.html> (accessed Oct 14, 2015).
- (18) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Membership & Observership <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-membership-observership-608.html> (accessed Oct 14, 2015).
- (19) European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Vision, Mission and Values <https://www.edqm.eu/en/EDQM-mission-values-604.html> (accessed Oct 14, 2015).








- (20) Cammarata, A. *J. Pharm. Sci.* **1973**, 62 (9), 1577–1578.
- (21) Chopra, I. *Tetracyclines Handb. Exp. Pharmacol.* **1985**, 78, 317–392.
- (22) Chopra, I.; Roberts, M. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65 (2), 232–260.
- (23) Schnappinger, D.; Hillen, W. *Arch. Microbiol.* **1996**, 165 (6), 359–369.
- (24) Brodersen, D. E.; Clemons, W. M.; Carter, a P.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. *Cell* **2000**, 103 (7), 1143–1154.
- (25) Nelson, M. L.; Ismail, M. Y. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*; Elsevier: Oxford, 2007; pp 597–628.
- (26) Fuoco, D. *Antibiotics* **2012**, 1 (1), 1–13.
- (27) Nelson, M. L. In *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*; Nelson, M., Hillen, W., Greenwald, R. A., Eds.; Birkh{ä}user Basel: Basel, 2001; pp 3–63.
- (28) Speer, B. S.; Shoemaker, N. B.; Salyers, A. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**, 5 (4), 387–399.
- (29) Berens, C. *Tetracyclines and RNA*, 2nd ed.; CRC Press: Georgetown, TX, 2001.
- (30) Council of Europe. In *European Farmacopoeia 8.0*; Council of Europe: Strasburg, 2014; pp 2646–2648.
- (31) Whitby, J. L.; Black, H. J. *Br. Med. J.* **1964**, 2 (5423), 1491–1495.
- (32) Rao, T.; Patrudu, T. B.; Rao, T. S.; Parvathamma, T. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, 3 (7), 2301–2305.
- (33) Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. *Public Assessment Report - Lymecycline 408mg capsules*; London, 2012.
- (34) Ahuja, S.; Scypinski, S. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, 1st ed.; Academic Press: Walthman, MA, 2001.
- (35) Doran, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd ed.; Academic Press: Walthman, MA, 2013.
- (36) Dong, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2006.
- (37) Kazakevich, Yuri; Lobrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2007.

## **Anexos**







---

## Anexo I – Guia de instrução de medidor de pH 301 *Hanna Instruments*.

### Leitura de pH


1. Ligar á corrente 
2. Pressionar botão  ON para ligar e OFF para desligar.
3. Seleccionar modo de leitura pH 
4. Lavar e limpar eléctrodo 
5. Mergulhar eléctrodo na solução 
6. Obtém-se a leitura 
7. A leitura está fora dos limites quando for exibido no ecrã : 
8. Guardar eléctrodo na solução KCl.

### Calibração

1. Verificar estado do eléctrodo (bolhas e arranhões) e validade da solução tampão.
2. Remover eléctrodo de solução de KCl, lavar e limpar.
3. Usam-se 3 tampões :   
pH 7 10 4
4. Para maior exactidão 
5. Seleccionar o modo de leitura de pH: 
6. Lavar e limpar o eléctrodo.
7. Mergulhar eléctrodo na solução tampão pH 7.
8. Pressionar   é obtida então a leitura da 1ª solução tampão.
9. Confirmar pressionando 

## Guia de instrução medidor de pH 301 *Hanna Instruments*, pág.1 e 2.

### Calibração

10. Repetir passo 4,5 e 7 para a solução tampão de pH 10 e 4 respectivamente.
11. Quando a leitura não está num limite entre 70-108% relativamente á solução tampão é exibida a mensagem no ecrã: 

### 3º tampão - solução pH 6,865

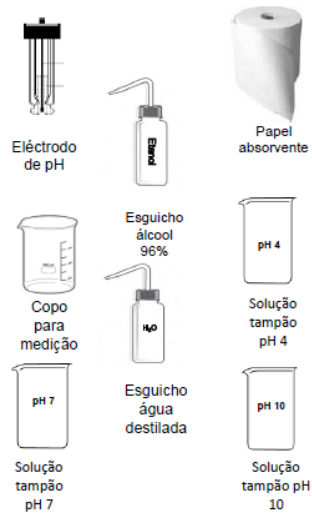
1. Para uma maior robustez da calibração sempre que efectuar a calibração deverá no fim medir o pH da solução tampão pH 6,865 da Radiometer.
2. Proceder de acordo com a leitura de pH (ver Leitura pH).
3. Este tampão irá permitir observar a diferença entre o pH registado e o pH tabelado, que deverá ser inferior a 0,05 unidades pH.

## Guia de instrução medidor de pH 301 *Hanna Instruments*, pág. 3 e 4.

## Anexo II – KIT limpeza e manutenção de medidores de pH e eléctrodos.



### KIT Aparelhos pH



#### Verificar:

1. o nível do electrólito, tem de estar 2-4 cm abaixo do orifício.
2. Solução KCl tem de estar fluida, não devem conter cristais.
3. Não devem existir bolhas, caso contrario agitar o eléctrodo.

#### Cuidados:

1. Entre medições manter eléctrodo em água destilado, e secar bolbo antes de medir.
2. Quando não está a usar o eléctrodo deve mantê-lo numa solução de KCl saturada, por períodos longo (+5dias) selar com parafilme.

### Kit limpeza e manutenção do medidor de pH e eléctrodo.

## Anexo III - Checklist manutenção e limpeza de medidores de pH e eletrodos

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	03.14	Original	LG
<b>Validade</b>	<b>03.17</b>		

Elaborado

Verificado

Aprovado

Data	__/__/__	Medidor de pH - Marca:	_____	Eléctrodo – Marca:	_____
Operador	_____	Modelo:	_____	Modelo:	_____
		Nº série:	_____	Nº série:	_____
		Código:	_____		

Manutenção									
Atividade			Observação						
Calibração	Medidor pH calibrado?			Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>		
	Dados da última calibração			Data	T (°C)	pH (0)	Sens (%)	Tampão 1	Tampão 2
			__/__/__	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Armazenamento	O eléctrodo está em solução armazenamento?			Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>		
	Solução armazenamento			Marca	Lote	Validade			
				_____	_____	__/__/__			
	A solução armazenamento apresenta-se límpida			Sim	<input type="checkbox"/>	Não <sup>*1</sup>	<input type="checkbox"/>		
A solução armazenamento apresenta-se com partículas?			Sim <sup>*1</sup>	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>			
*1 – efetuar uma limpeza ao eléctrodo.									
Electrólito	O nível do electrólito está entre 0-3cm do orifício do eléctrodo?			Sim	<input type="checkbox"/>	Não <sup>*2</sup>	<input type="checkbox"/>		
	*2 – preencher o eléctrodo com solução electrólito								
	O orifício do eléctrodo está fechado?			Sim	<input type="checkbox"/>	Não <sup>*3</sup>	<input type="checkbox"/>		
*3 – fechar orifício									
A solução de electrólito apresenta-se límpida?			Sim	<input type="checkbox"/>	Não <sup>*4</sup>	<input type="checkbox"/>			

	A solução de electrólito apresenta-se com partículas? Sim <sup>*4</sup> <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	<sup>*4</sup> – substituir a solução de eletrólito

Ações efetuadas	Rubrica
Substituição solução armazenamento Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Substituição de solução eletrólito Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Limpeza ao elétrodo Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Tipo de limpeza _____	

Limpeza	
Atividade	Observação
Material	Existe papel absorvente? Sim <input type="checkbox"/> Não <sup>*5</sup> <input type="checkbox"/>
	Existe esguicho de água purificada? Sim <input type="checkbox"/> Não <sup>*5</sup> <input type="checkbox"/> <sup>*5</sup> – Fornecer material necessário
Escurecimento Elétrodo	O elétrodo apresenta escurecimento no interior? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
	Nível de escurecimento Nenhum <input type="checkbox"/> ¼ elétrodo <sup>*6</sup> <input type="checkbox"/> ½ elétrodo <sup>*6</sup> <input type="checkbox"/> > ½ elétrodo <sup>*7</sup> <input type="checkbox"/> _____
	<sup>*6</sup> – Proceder a limpeza de elétrodo <sup>*7</sup> – O elétrodo já não apresenta robustez
O elétrodo está limpo e pronto a usar? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	

Ações efetuadas	Rubrica
Fornecimento de material Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Qual _____	
Limpeza ao eletrodo Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>	
Tipo de limpeza _____	
Troca de eletrodo? Marca Modelo Nº série	
_____	
_____	
_____	

## Anexo IV - Relatório de operacionalidade de medidores pH no laboratório I&D

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	03.14	Original	LG

### PALAVRAS-CHAVE

Relatório de operacionalidade de medidores de pH; medidor pH; I&D;

### ASSINATURAS

Nome	Função	Assinatura	Data

### 1. Enquadramento

Determinar a operacionalidade dos medidores de pH é algo a ter em conta na qualificação de equipamentos, assim como para argumentar a validade dos resultados obtidos pelos medidores de pH.

Para tal deve-se estabelecer uma rotina de calibração dos medidores, e registar devidamente no *logbook*. Serão os resultados obtidos nas calibrações que irão ser usados para a construção desta base de dados da operacionalidade do equipamento no laboratório de investigação e desenvolvimento.

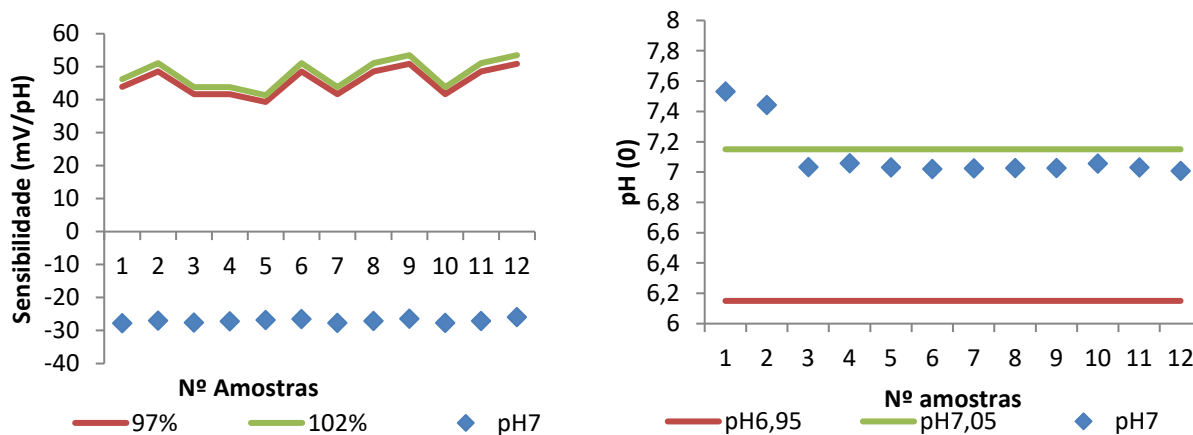
As análises ao equipamento deve ter em conta os outputs gerados por cada equipamento e tratá-los de acordo com o uso requerido, devem portanto ser estabelecidos critérios de aceitação para cada um deles.

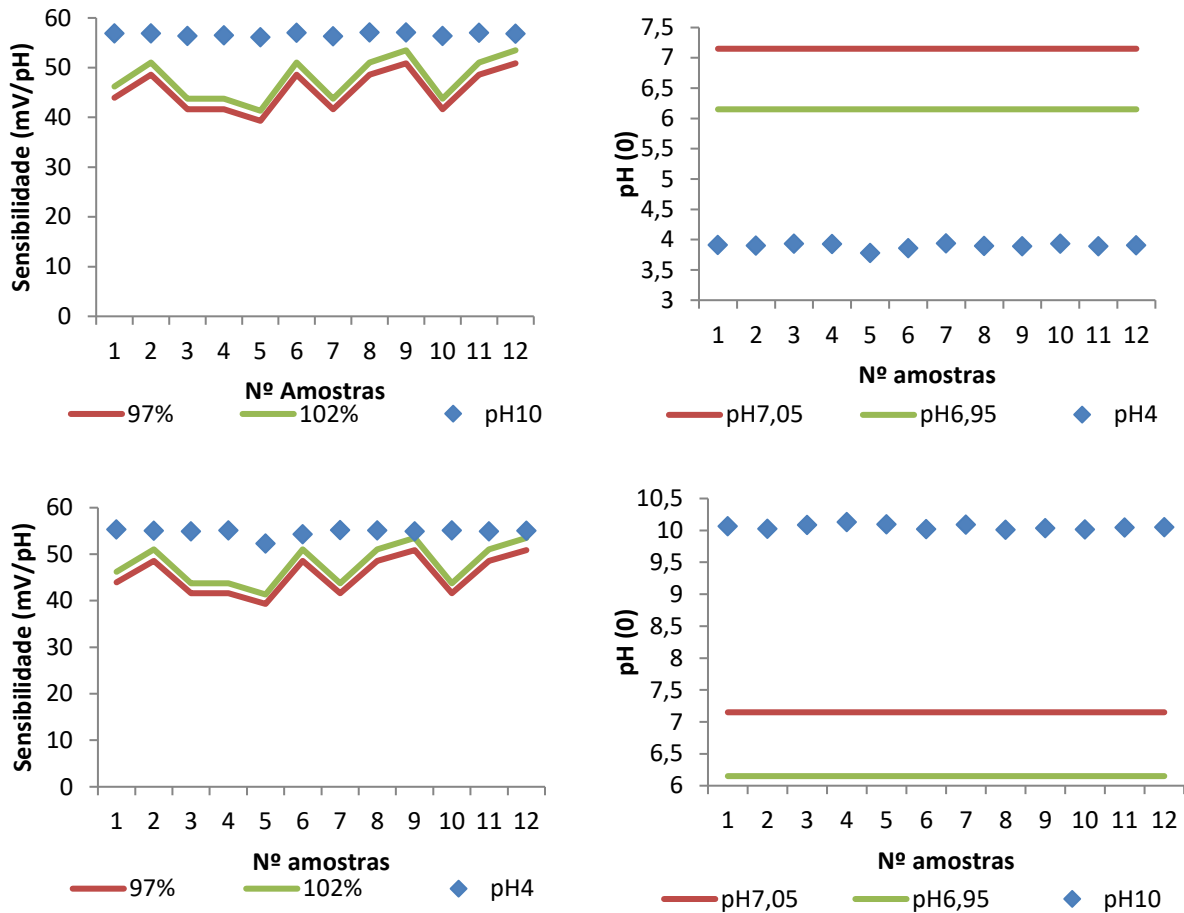
### 2. Objetivo

O tratamento de dados teve por objetivo determinar a operacionalidade dos medidores de pH do laboratório de investigação e desenvolvimento para posteriores trabalhos de qualificação.

### 3. Resultados

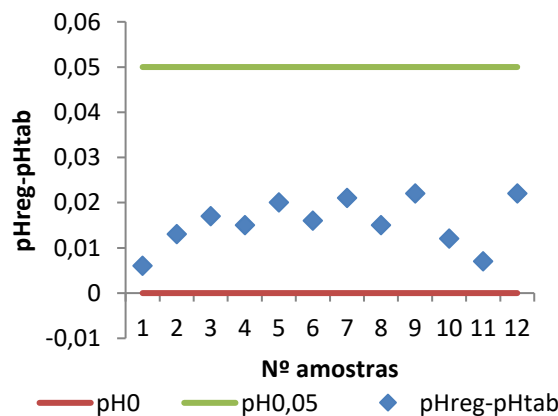
#### Medidor de pH *Hanna Instruments 301*



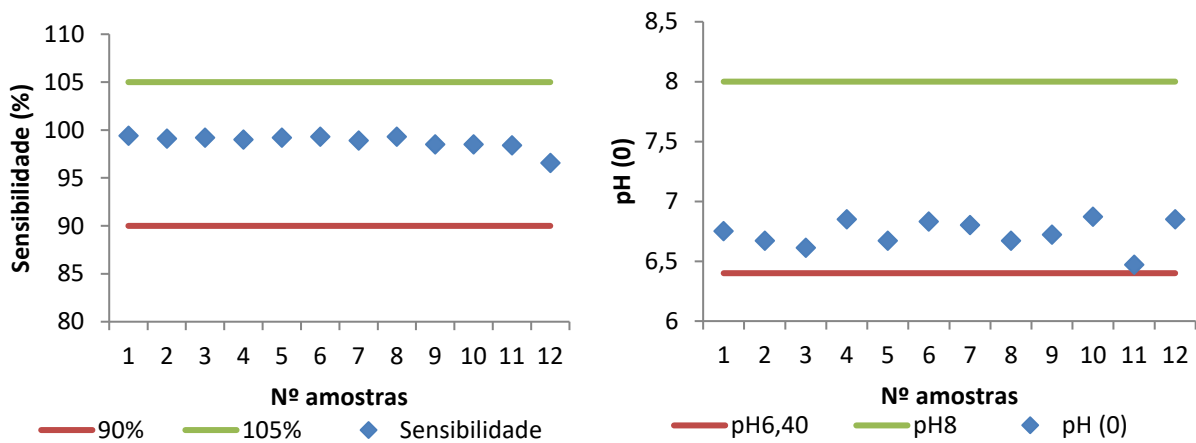


**Figura 1** – As figuras da esquerda representam a sensibilidade, isto é o declive obtido da recta de calibração a pH7, pH10, pH4. O critério de aceitação definido foi de 97-102% que, corresponde a 57,812-60,792mV/pH.

As figuras da direita representam o pH(0), isto é a ordenada na origem da recta de calibração a pH7, pH10, pH4. O critério de aceitação definido é de 6,15-7,15UpH.

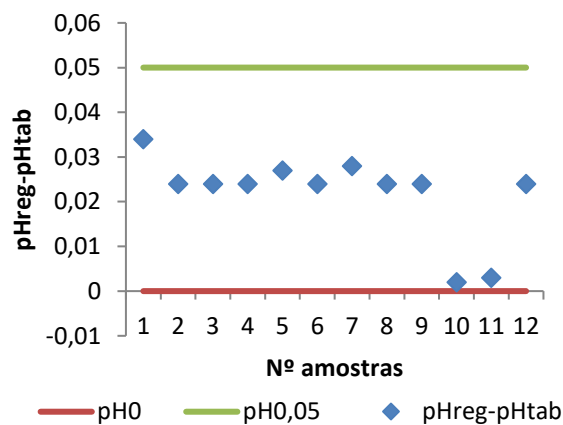


**Figura 2** – Diferença entre o valor do 4º tampão de pH6,865 registado e o valor tabelado, de acordo com a variação da temperatura. O critério de aceitação definido é o 0-0,05UpH

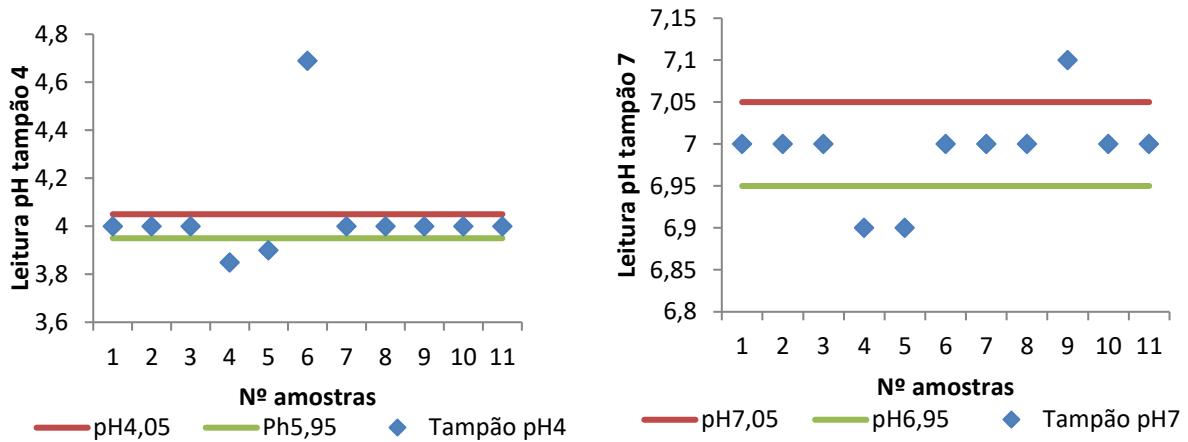
**Medidor de pH Metrohm 744**


**Figura 3** – A figura da esquerda apresenta a sensibilidade obtida através da curva de calibração entre os tampões de pH4 e pH7. O critério de aceitação definido foi de 90-105%.

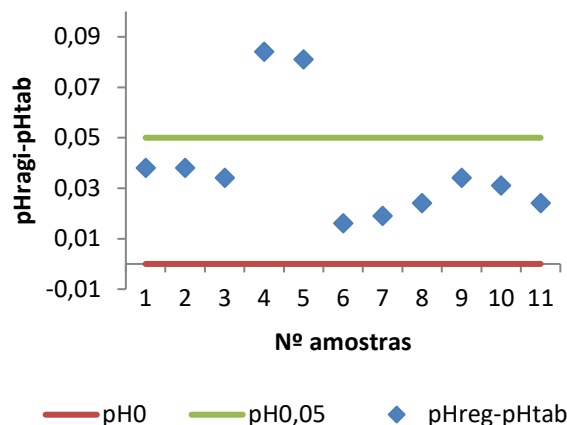
A figura da direita apresenta o pH(0) obtido através da recta de calibração com o tampão de pH4 e pH7. O critério de aceitação definido foi de 6,40-8UpH.



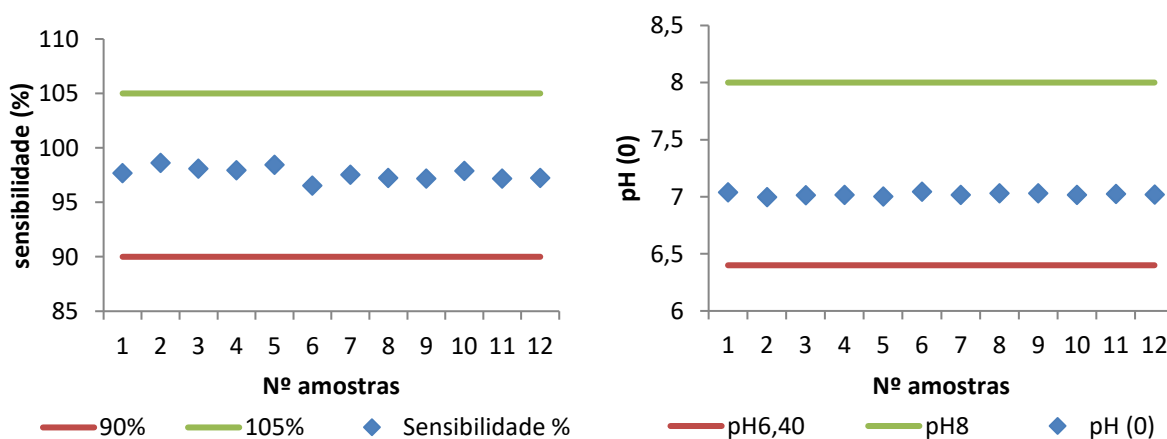
**Figura 4** - Diferença entre o pH registado e o tabelado para o 3º tampão usado, de pH 6,865 da Radiometer.

**Medidor de pH Metrohm 620**


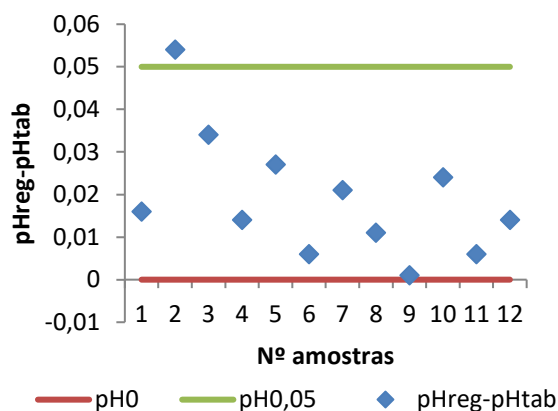
**Figura 5** – Leituras obtidas a pH 4 (esquerda) e pH 7 (direita). Os critérios de aceitação estabelecidos foram de 0-0,05UpH.



**Figura 6** - Diferença entre o valor do 3º tampão de pH6,865 registado e o valor tabelado, de acordo com a variação da temperatura. O critério de aceitação definido é o 0-0,05UpH.

**Medidor de pH Metrohm 826 mobile**


**Figura 7** – Valores de sensibilidade obtidos na recta de calibração com os tampões de pH 4 e 7. Os critérios de aceitação estabelecidos foram 90-105%.



**Figura 9** - Valores da ordenada na origem pH(0) obtidos na recta de calibração com os tampões de pH 4 e 7. Os critérios de aceitação são 6,40-8UpH.

#### 4. Conclusões

De acordo com os dados obtidos é possível observar que o equipamento medidor de pH 744 e 826 Mobile da *Metrohm* geram sempre outputs que vão de encontro aos critérios internos do aparelho (caso contrário não aceita calibração), e que vão ao encontro dos critérios exigidos no grama-lab da investigação e desenvolvimento.

No caso 826 Mobile os valores da diferença do pH registado com os do pH tabelado do tampão pH6,865 são mais oscilantes, tal deve-se ao facto de que o eléctrodo estava seco, sem solução de eletrólito, pois os valores finais já estão menos oscilantes.

Os critérios de aceitação definidos têm em conta a utilidade dada a cada equipamento. O 744 e o 826 da *Metrohm* são muito usados em síntese química, produção á escala do grama, logo os critérios podem ser um pouco mais alargados 90-105% para declive e 6,40-8UpH para o pH(0). O valor de 3º tampão de pH 6,865 não deve variar mais de 0,05UpH de acordo com a *European Pharmacopeia* (EP) do valor de pH tabelado determinada temperatura.

O equipamento 620 da *Metrohm* é analógico e portanto não gera outputs de resultados como declive e pH(0), é ajustado manualmente. Através das leituras de pH durante a calibração os valores são aceitáveis, há um ligeiro desvio por vezes que requer um ajuste mas nada relevante para o desempenho. De acordo com os dados obtidos para o tampão de pH 6,865 em relação ao tabelado é possível observar que estão dentro do critério de aceitação ( $\leq 0,05$ ).

Os critérios de aceitação para a leitura de pH 4 e pH 7 são de variação dos valores de pH para leituras normais, assim como o tampão pH 6,865,  $\leq 0,05$ UpH.

**5. Anexos**

N.º Anexo	Título	N.º folhas
I	Resultados medidor de pH 301 <i>Hanna Instruments</i> , 290PH001	1
II	Resultados medidor de pH 744 <i>Metrohm</i> , 290PH002	2
III	Resultados medidor de pH 620 <i>Metrohm</i> , 290PH003	1
IV	Resultados medidor de pH 826 <i>MOBILE Metrohm</i> , 290PH004	1

Nº Amostra	Código Cipan	Tampão 4	Tampão 7	Tampão 10	Tampão 6,865	pHtab 6,865	pHreg-pHtab	pH0	pH0,05	T(°C)	T(°C) aprox.	Declive tampão 7	Declive tampão 4	Declive tampão 4	Temp. 25°C	(97-102%) o declive de aceitação	pH (0) tampão 4	pH (0) tampão 7	pH (0) tampão 10	Limite superior	Limite inferior
1	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,89	6,884	0,006	0	0,05	19,4	19	-27,8	56,9	55,3	43,93712	46,20192	3,912	7,53	10,066	7,05	6,95
2	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,89	6,877	0,013	0	0,05	20,5	21	-27	56,9	55	48,56208	51,06528	3,9	7,442	10,023	7,05	6,95
3	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,905	6,888	0,017	0	0,05	17,4	18	-27,6	56,4	54,9	41,62464	43,77024	3,93	7,032	10,083	7,05	6,95
4	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,903	6,888	0,015	0	0,05	17,8	18	-27,2	56,5	55,1	41,62464	43,77024	3,925	7,057	10,127	7,05	6,95
5	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,901	6,881	0,02	0	0,05	17	17	-26,9	56,1	52,3	39,31216	41,33856	3,78	7,03	10,095	7,05	6,95
6	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,893	6,877	0,016	0	0,05	21	21	-26,6	57	54,3	48,56208	51,06528	3,859	7,02	10,02	7,05	6,95
7	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,909	6,888	0,021	0	0,05	17,9	18	-27,7	56,3	55,2	41,62464	43,77024	3,938	7,024	10,087	7,05	6,95
8	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,892	6,877	0,015	0	0,05	21	21	-27,1	57,1	55,1	48,56208	51,06528	3,893	7,026	10,008	7,05	6,95
9	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,896	6,874	0,022	0	0,05	21,8	22	-26,5	57,1	54,9	50,87456	53,49696	3,888	7,026	10,032	7,05	6,95
10	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,876	6,888	0,012	0	0,05	18	18	-27,7	56,4	55,1	41,62464	43,77024	3,931	7,056	10,013	7,05	6,95
11	290PH001	4,01	7,01	10,01	6,884	6,877	0,007	0	0,05	20,6	21	-27,1	57	54,9	48,56208	51,06528	3,888	7,03	10,045	7,05	6,95

12	290PH00 1	4,01	7,01	10,0 1	6,89 6	6,87 4	0,02 2	0	0,05	22	22	-26	56,8	55	50,8745 6	53,49696	3,90 6	7,00 7	10,04 7	7,05	6,95
----	--------------	------	------	-----------	-----------	-----------	-----------	---	------	----	----	-----	------	----	--------------	----------	-----------	-----------	------------	------	------

Nº amostra	Aparelho de pH	Tampão 4	tampão 7	tampão 10	tampão 6,865	critério de aceitação	declive	pH (0)	T (°C)	T (°C)aprox.	pHtab	pH-reg-pHtab	Limite superior declive	limite inferior declive	limite superior pH(0)	Limite inferior pH(0)	Limite leitura pH
1	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,4	6,75	19	19	6,884	0,034	105	90	8	6,4	0,05
2	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,1	6,67	20,8	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05
3	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,2	6,61	21,6	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05
4	290PH002	4	7	-	6,86	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99	6,85	19,3	19	6,884	0,024	105	90	8	6,4	0,05
5	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,2	6,67	20,6	21	6,877	0,027	105	90	8	6,4	0,05
6	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,3	6,83	21,8	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05
7	290PH002	4	7	-	6,86	90-105% 53,64-62,58mV/pH	98,9	6,8	18,3	18	6,888	0,028	105	90	8	6,4	0,05
8	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	99,3	6,67	21,5	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05
9	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	98,5	6,72	22	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05
10	290PH002	4	7	-	6,89	90-105% 53,64-62,58mV/pH	98,5	6,87	18	18	6,888	0,002	105	90	8	6,4	0,05
11	290PH002	4	7	-	6,88	90-105% 53,64-62,58mV/pH	98,4	6,47	20,8	21	6,877	0,003	105	90	8	6,4	0,05
12	290PH002	4	7	-	6,85	90-105% 53,64-62,58mV/pH	96,56	6,85	22,3	22	6,874	0,024	105	90	8	6,4	0,05

Nº amostras	Aparelho de pH	Tampão 4	tampão 7	tampão 10	tampão 6,865	critério de aceitação	Declive	pH (0)	t (°C)	pHtab	pHreg-pHtab	Limite leitura pH	Limite leitura pH <sup>4</sup>	Limite de leitura pH7		Limite leitura pH 6,865	
1	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	17	6,888	0,038	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
2	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	17	6,888	0,038	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
3	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	19	6,884	0,034	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
4	290PH003	3,85	6,9	6,8	-	-	-	19	6,884	0,084	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
5	290PH003	3,9	6,9	6,8	-	-	-	20	6,881	0,081	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
6	290PH003	4,69	7	6,9	-	-	-	19	6,884	0,016	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
7	290PH003	4	7	6,9	-	-	-	20	6,881	0,019	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
8	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	22	6,874	0,024	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
9	290PH003	4	7,1	6,85	-	-	-	19	6,884	0,034	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
10	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	20	6,881	0,031	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865
11	290PH003	4	7	6,85	-	-	-	22	6,874	0,024	0,05	5	3	8	6	5,865	7,865

Nº	Aparelho de pH	Tampão 4	Tampão 7	Tampão 10	Tampão a 25°C	Critério de aceitação	Declive	pH (0)	T (°C)	T (°C)	pHtab	pHreg-pHtab superior	Limite inferior declive	Limite inferior leitura de	Limite superior	Limite inferior	
1	826 MOBILE	4	7	-	6,9	90-105%	97,7	7,038	18,9	19	6,884	0,016	90	105	0,01	8	6,4
2	826 MOBILE	4	7	-	6,82	90-105%	98,64	6,997	21,9	22	6,874	0,054	90	105	0,01	8	6,4
3	826MOBILE	4	7	-	6,84	90-105%	98,09	7,014	22,3	22	6,874	0,034	90	105	0,01	8	6,4
4	826MOBILE	4	7	-	6,87	90-105%	97,95	7,017	19,1	19	6,884	0,014	90	105	0,01	8	6,4
5	826MOBILE	4	7	-	6,85	90-105%	98,45	7,004	21,2	21	6,877	0,027	90	105	0,01	8	6,4
6	826MOBILE	4	7	-	6,88	90-105%	96,55	7,044	21,9	22	6,874	0,006	90	105	0,01	8	6,4
7	826MOBILE	4	7	-	6,86	90-105%	97,55	7,017	19,6	20	6,881	0,021	90	105	0,01	8	6,4
8	826MOBILE	4	7	-	6,86	90-105%	97,25	7,003	22,8	23	6,871	0,011	90	105	0,01	8	6,4
9	826MOBILE	4	7	-	6,87	90-105%	97,02	7,003	23	23	6,871	0,001	90	105	0,01	8	6,4
10	826MOBILE	4	7	-	6,86	90-105%	97,89	7,017	18,9	19	6,884	0,024	90	105	0,01	8	6,4
11	826MOBILE	4	7	-	6,88	90-105%	97,02	7,025	21,8	22	6,874	0,006	90	105	0,01	8	6,4
12	826MOBILE	4	7	-	6,86	90-105%	97,25	7,019	22	22	6,874	0,014	90	105	0,01	8	6,4

## Anexo V - Calibração, Funcionamento e Manutenção do Medidor de pH 301, *Hanna Instruments*, 290PH001

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	04.14	<p>Substitui o documento C290IT18012 de 9 de novembro de 2010, por motivo de mudança do tema (de 18-I&amp;D para 02-Qualidade).</p> <p>Melhorias nos conteúdos calibração, funcionamento e manutenção de acordo com informação <i>Hanna Instruments</i>.</p> <p>Melhoria no layout da IT de modo a facilitar a sua consulta.</p>	LG
<b>Validade</b>	<b>04.17</b>		

Elaborado

Verificado

Aprovado

## 6. Objetivo

Esta instrução descreve o funcionamento do medidor de pH 301 da *Hanna Instruments*, equipamento 290PH001. Esta instrução não pretende reproduzir integralmente o conteúdo do manual de instruções, apenas as instruções de funcionamento e de calibração, e cuidados de manutenção.

Assim em caso de dúvida ou avaria é indispensável a consulta do manual.

## 7. Definições e Siglas

**I&D** – Investigação & Desenvolvimento

**290PH001** – código CIPAN atribuído ao medidor de pH modelo 301, marca *Hanna Instruments* nº série 507302

## 8. Responsabilidades

<i>Função</i>	<i>Responsabilidades</i>
Operador/Analista I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Executar a calibração/procedimento de utilização, de acordo com as instruções deste documento.</li><li>▪ Cuidar e manter o equipamento em causa.</li><li>▪ Para a calibração, caso os valores obtidos não se encontrem dentro dos limites, deve alertar o técnico responsável pelo projeto.</li></ul>
Técnico responsável pelo projeto	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Para a calibração, caso os valores obtidos não se encontrem dentro dos limites, definir as devidas ações corretivas.</li></ul>
Responsável I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Emissão e atualização deste documento.</li></ul>

## 9. Procedimento

### 4.1 ACESSÓRIOS

#### MATERIAL E EQUIPAMENTO

- Medidor de pH 290PH001
- Eléctrodo de pH de combinação com corpo de vidro refª HI 1131B, *Hanna Instruments*
- Sonda de temperatura refª HI 7669/2W, *Hanna Instruments*
- Recipiente de despejos para lavagem do eléctrodo
- Copos de plástico de 30ml
- Papel absorvente

#### REAGENTES

- Água purificada para a lavagem do eléctrodo
- Solução de electrólito 3,5 KCl refª HI 7071
- Solução de armazenamento refª HI 70300
- Gama alcalina: Soluções tampão pH 9, pH 8 e pH 7 (rastreadáveis pelo NIST)
- Gama ácida: Soluções tampão pH 7, pH 5 e pH 4 (rastreadáveis pelo NIST)
- Etanol 96%

### 4.2 MANUTENÇÃO

#### MEDIDOR DE pH


- Sempre que necessário limpar medidor de pH com etanol 96% e papel absorvente.

#### ELÉCTRODO


- **Durante a noite**, o eléctrodo de vidro deve ser mergulhado na solução de armazenamento refª HI 70300
- **Entre medições**, o eléctrodo e sonda de temperatura deve ser mergulhado em água purificada.
- **Após medições**, fechar o orifício do eléctrodo.
- A **solução interna de electrólito**, c(KCl)=3M, HI 7071, *Metrohm*, deve estar a um nível máximo de 3 cm abaixo do orifício.
- **Antes de ligar o medidor de pH**, verificar visualmente que o eléctrodo não está danificado (arranhões no bolbo ou haste) ou com bolhas (se necessário, agitar vigorosamente 1 vez para remover as bolhas).
- **Quando bolbo e/ou junção estiver seco** mergulhe a extremidade do eléctrodo em solução de armazenamento refª HI 70300 no mínimo 1h antes de o utilizar.
- **Para respostas mais rápidas** lavar eléctrodo e sonda de temperatura com umas gotas da solução que irá medir.
- **Efetuar uma limpeza**, sempre que necessário, com a solução adequada durante 10 - 15min.

Solução amostra	Solução limpeza
▪ Geral	▪ HI 7061
▪ Gordurosas	▪ HI 7077
▪ Inorgânicas	▪ HI 7074

**4.3 GUIA DE CALIBRAÇÃO**
**INSTRUÇÕES RÁPIDAS**
**DETALHES**

1. Ligar á corrente .

2. Pressionar botão  para ligar.

3. Selecionar o modo de leitura pH pressionando a tecla .

4. Verificar estado do eléctrodo (bolhas e arranhões) assim como a validade das soluções tampão.

4.1 Quando abrir um recipiente de solução tampão etiquetar com a validade, indicada no frasco pelo fabricante.

5. Iniciar registo no *logbook*.



5.1 Data| Código CIPAN| Nº série eléctrodo| pH| lote| marca| validade dos tampões a usar.|  $pH_{REG}$ |  $\Delta pH \leq 0,05$ | Sensibilidade| pH(0)| Satisfaz/Não Satisfaz| Efetuado por| Verificado por|

6. Remover eléctrodo de solução de armazenamento ref<sup>o</sup> HI 70300, *Hanna Instruments*, lavar e secar.


6.1 Lavar com água purificada.  
6.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.

7. Destapar o orifício do eléctrodo.


7.1 Durante a calibração o orifício deve estar aberto.

8. Mergulhar o eléctrodo e sonda de temperatura em solução tampão  e pressionar .


8.1 Agitar manualmente e muito lentamente.  
8.2 Pode usar dois copos de tampão para aumentar a rapidez de resposta, o primeiro lava o eléctrodo e sonda de temperatura e o segundo é para a calibrar.

9. Esperar que seja feita a leitura do 1<sup>o</sup> tampão .

8.1 É exibido o pH da primeira solução tampão.

10. Quando piscar no ecrã **CFM**, pressionar . Retirar o eléctrodo e sonda de temperatura da solução, lavar e secar.





10.1 Lavar com água purificada.  
10.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.

11. Mergulhar o eléctrodo e sonda de temperatura em solução tampão .

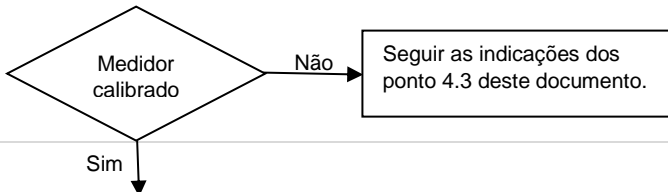


11.1 Agitar manualmente e muito lentamente o copo.

12. Esperar que seja feita a leitura do 2<sup>o</sup> tampão.

13. Quando piscar **CFM**, pressionar . Retirar o eléctrodo da solução, lavar e secar.

<p>14. Mergulhar o eletrodo e sonda de temperatura em solução tampão  .</p>	<p>14.1 Agitar manualmente e muito lentamente o copo.</p>
<p>15. Esperar que seja feita a leitura do 3º tampão.</p>	
<p>16. Quando piscar <b>CFM</b>, pressionar  . Retirar o eletrodo e sonda de temperatura da solução, lavar e secar.</p>	
<p>17. Consultar os dados da calibração pressionando  .</p>	<p>17.1 Registrar: - Sensibilidade Ph 10, 00.0 mV/pH - Sensibilidade Ph 4, 00.0 mV/pH - pH(0), 0.00 pH - Temperatura (°C)</p>
<p>18. Retirar o eletrodo e sonda de temperatura da solução, lavar e secar.</p>	<p>18.1 Lavar com água purificada. 18.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.</p>
<p>19. Verificar a calibração usando o tampão pH 5 e pH 8 como amostra. Para iniciar modo de leitura de pH da solução, pressionar  .</p>	<p>19.1 Gama ácida (4-7): tampão pH 5 Gama alcalina (7-9): tampão pH 8 19.2 Registrar: - Leitura do tampão pH 5, Valor tabelado (consultar rótulo) e diferença (pH tabelado - pH obtido)</p>
<p>20. Finalizar o registo no logbook.</p>	<p>20.1 Calibração <b>satisfaz</b> se: - pH (0) entre 6,40 e 8,00 - sensibilidade entre 57,8mV/pH (97%) e 60,8mV/pH (105%) - (pH tabelado - pH obtido) tampão pH5 ≤ 0,05</p>
<p>21. Retirar o eletrodo e sonda de temperatura da solução, lavar e secar.</p>	<p>21.1 Lavar com água purificada. 21.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.</p>
<p>22. Mergulhar o eletrodo na solução de armazenamento, refª HI 70300, <i>Hanna Instruments</i>.</p>	<p>22.1 Descartar as soluções tampão.</p>

**4 GUIA DE MEDIÇÃO DE pH**

INSTRUÇÕES RÁPIDAS	DETALHES
<p>1. </p>	<p>1.1 Consultar o logbook.</p>
<p>2. Remover elétrodo de solução de armazenamento, refª HI80300, <i>Hanna Instruments</i>, lavar e secar.</p>	<p>2.1 Lavar com água purificada. 2.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.</p>
<p>3. Verificar que o orifício se encontra destapado.</p>	<p>3.1 Durante a medição o orifício deve estar aberto.</p>
<p>4. Mergulhar o elétrodo e sonda de temperatura na solução amostra </p>	<p>4.1 Reduzir a agitação sempre que o processo o permitir.</p>
<p>5. Para iniciar modo de leitura de pH da solução, pressionar .</p>	
<p>6. Esperar que seja feita a leitura.</p>	<p>6.1 Quando os triângulos deixarem de ser exibidos a leitura estabilizou.</p>
<p>7. Registrar leitura, em logbook de registo experimental do projeto em causa (g-Lab) ou na técnica (k-Lab).</p>	<p>7.1 Registrar: - código CIPAN do medidor de pH - valor de pH e temperatura .</p>
<p>8. Retirar o elétrodo e sonda de temperatura da solução, lavar e secar.</p>	<p>8.1 Lavar com água purificada. 8.2 Secar cuidadosamente, tocando ligeiramente no bolbo.</p>
<p>9. Mergulhar o elétrodo na solução de armazenamento, refª HI 70300, <i>Hanna Instruments</i>.</p>	
<p>10. Tapar o orifício do elétrodo.</p>	

## 10. Registo

Identificação	Compilação	Indexação	Pasta de arquivo	Local de arquivo	Tempo de retenção	Acesso
<b>Logbook</b> Aparelhos de pH (ambiente laboratorial), matrícula 13	NA	Cronológica	por Tipo de Registo	Lab. I&D	Indeterminado	Analistas/ Operadores I&D Técnicos I&D Chefe sector I&D
<b>Logbook</b> Registo Experimental do projeto <XXXSSAA(0)>, matrícula <XXXSSAA(0)>	NA	Cronológica	por Tipo de Registo	Lab. I&D	Indeterminado	Analistas/ Operadores I&D Técnicos I&D Chefe sector I&D

## 11. Documentos Relacionados

[1] Manual de instruções do aparelho pH 301 da *Hanna Instruments*.

[2] Guia para a utilização e manutenção do eletrodo, *Hanna Instruments*

## 12. Anexos

Não aplicável.

## Anexo VI -Protocolo de qualificação de instalação do medidor de pH 301 *Hanna Instruments*

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	03.14	Original	LG

### PALAVRAS-CHAVE

Qualificação de equipamentos; Qualificação de Instalação; QI; 301; medidor pH; 290PH001

### ASSINATURAS

Nome	Função	Assinatura	Data
------	--------	------------	------

## Índice

1.	Âmbito	101	
2.	Responsabilidades	101	
3.	Descrição de equipamentos	101	
4.	Procedimento	102	
5.	Programa de manutenção	103	
6.	CrITÉrios de aceitaçŁo	104	
7.	Documentos impressos associados	104	
8.	Anexos	104	

### 1. Âmbito

Este protocolo estabelece os procedimentos a seguir, através do registo documentado, da qualificação de instalação do medidor de pH modelo 301, da *Hanna Instruments*, com código CIPAN 290PH001.

Este protocolo representa a evidência de que o medidor de pH foi instalado de acordo com as recomendações do fabricante.

### 2. Responsabilidades

<i>Função</i>	<i>Responsabilidades</i>
Operador/Analista I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Pelo acompanhamento de todas as verificações executadas pelo membro DES.</li><li>▪ Pela verificação dos pontos que constituem a qualificação de instalação, nomeadamente.</li><li>▪ Pelo preenchimento das folhas de registo de qualificação de instalação, que se encontram no anexo 1.</li><li>▪ Pela elaboração do protocolo e respetivo relatório de qualificação de instalação.</li></ul>
Técnico DES	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Verificação das utilidades necessárias na área elétrica</li></ul>
Responsável I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Pela aprovação do registo de qualificação de instalação (QI) após preenchimento de todos os pontos.</li><li>▪ Pela aprovação de eventuais ações corretivas e pela nomeação do membro a implementá-las.</li><li>▪ Verificação da eficácia das ações corretivas.</li><li>▪ Emissão e atualização deste documento.</li></ul>

### 3. Descrição de equipamentos

<i>Equipamento</i> (categoria B)	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Medidor de pH modelo 301, nº série 507302, marca <i>Hanna Instruments</i> e código CIPAN 290PH001.</li><li>▪ Eléctrodo de pH de combinação com corpo de vidro ref<sup>a</sup> HI 1131B, <i>Hanna Instruments</i>.</li><li>▪ Sonda de temperatura ref<sup>a</sup> HI 7669/2W, <i>Hanna Instruments</i>.</li><li>▪ Transformador 12V Ref<sup>a</sup> HI710006, <i>Hanna Instruments</i>.</li></ul>
<i>Utilidade</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Medição de pH em soluções de fase móvel de HPLC</li></ul>

#### 4. Procedimento

- 4.1. **Documentação associada:** a documentação que suporta esta fase da qualificação deverá ser a seguinte
- Manual de instruções do aparelho pH 301 da *Hanna Instruments*;
  - Guia para a utilização e manutenção do elétrodo, *Hanna Instruments*;
  - Instrução técnica C290IT02027;
  - Registo de formação individual aos operadores;
  - Certificados emitidos pelo fabricante.
- 4.2. **Requisitos:** Para instalação e o funcionamento deste equipamento são necessárias as seguintes condições:
- Espaço de bancada de 1m;
  - Temperatura ambiente estável  $T_{ref}=25^{\circ}C$ , de acordo com operacionalidade do equipamento, entre 5-40°C;
  - Humidade estável, de acordo com intervalo do equipamento, entre 20-80%;
  - Interferências magnéticas e elétricas ausentes ou quase inexistentes.
- 4.3. **Testes:** O objetivo dos testes nesta fase de qualificação é o de avaliar a instalação de acordo com:
- Serviço prestado
  - Cumprimento dos requisitos do fabricante
  - O ambiente onde é instalado o equipamento
  - Sucesso da instalação
  - Diagnóstico e teste preliminar

As folhas de registo apresentam a discriminação de todos os parâmetros avaliados para qualificar a instalação. Com o objetivo de verificar se o equipamento foi entregue e instalado corretamente, de acordo com o manual do fabricante. Os testes apresentam-se descritos em anexo, e no relatório de qualificação do protocolo.

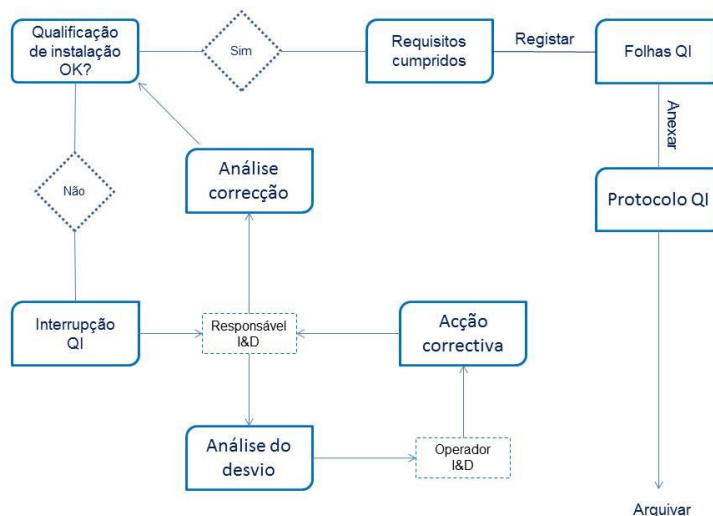


Figura 1 – Procedimento após a realização do teste de qualificação de instalação.

Sempre que for detetado algum desvio, o técnico responsável pela secção deverá registar nas referidas folhas de registo QI qual o desvio detetado e quais as ações corretivas a implementar.

Seguidamente, as ações corretivas sugeridas serão avaliadas e aprovadas pela responsável da secção de investigação e desenvolvimento, a qual nomeará o responsável para implementação das mesmas. Após implementação das ações corretivas, é necessário verificar novamente o cumprimento do ponto que originou o desvio, sendo emitida uma nova folha de registo.

A deteção de um desvio implica a interrupção da qualificação, devendo ser retomada apenas após implementação da Ação corretiva aprovada e verificação da sua eficácia.

## 5. Programa de manutenção

Antes de usar	Periodicamente
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Verificar se o medidor de pH se apresenta limpo e em boas condições de uso isto é, ausência de danos no equipamento</li> <li>▪ Verificar se equipamento está calibrado para o trabalho que irá efetuar.</li> <li>▪ Verificar se elétrodo se apresenta em bom estado de conservação e pronto a usar:             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nível de eletrólito entre 0-3cm do orifício</li> <li>○ Ausência de bolhas e arranhões no bolbo</li> <li>○ Apresenta-se com algum escurecimento</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proceder a uma verificação global do equipamento através de checklist.</li> <li>▪ Trocar eletrólito (solução interna do elétrodo).</li> <li>▪ Colocar em solução limpeza apropriada ao uso dado ao elétrodo.</li> <li>▪ Trocar solução armazenamento elétrodo KCl, 3M.</li> </ul>

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>○ Armazenado em solução de armazenamento KCl, 3M.</li></ul> |  |
|---|--|

## 6. Critérios de aceitação

A qualificação de instalação está aceite quando todos os pontos existirem e forem afirmativos.

## 7. Documentos impressos associados

Folha de registo de qualificação de instalação do medidor de pH 290PH001

## 8. Anexos

N.º Anexo	Título	N.º folhas
Anexo I	Folhas de registo de QI <i>Hanna Instruments</i> , 290PH001	4

1 DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO	
1.1	O código CIPAN indicado na etiqueta de identificação _____
1.2	Marca do equipamento _____
1.3	Modelo do equipamento _____
1.4	Nº série indicado na placa de identificação _____
1.5	Nº série do eletrodo associado _____
1.6	Adquirido: _____ á _____ em _____/_____/_____
Data ____/____/____ Verificado por _____	

Desvios	Acção Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ____/____/_____	

2	DOCUMENTAÇÃO ASSOCIADA	Sim	Não
2.1	Manual de instruções disponível? Código do documento _____ Localização _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<b>2.2</b>	Existe instrução CIPAN de funcionamento do equipamento? Código do documento _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.3</b>	Existe um programa de calibração interna? Código do documento _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.4</b>	Existe um programa de calibração externa? Código do documento _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.5</b>	Existem certificados emitidos pelo fabricante no momento da aquisição do equipamento? Localização dos certificados _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.6</b>	Existem certificados de calibração anteriores á qualificação? No caso de existirem qual a data e código do último _____/_____/_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.7</b>	Está previsto um programa de formação dos operadores? Código do documento _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>2.8</b>	Os documentos acima mencionados estão atualizados, á data da qualificação?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Data ____/____/_____ Verificado por _____			

Desvios	Ação Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ____/____/_____	

3. REQUISITOS	Sim	Não
<b>3.1</b> Espaço disponível de bancada com cerca de 1m?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>3.2</b> A temperatura de trabalho situa-se entre 5 a 40°C?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

	Valor medido _____	Rubrica _____	
<b>3.3</b>	A temperatura de trabalho situa-se entre 5 a 40°C? Valor medido _____	Rubrica _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>3.4</b>	A humidade relativa situa-se entre 20 a 80% Valor medido _____	Rubrica _____	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<b>3.5</b>	Existem interferências elétricas ou magnéticas?		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Data ___/___/___ Verificado por _____			

Desvios	Ação Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/___	

4	PROCEDIMENTO DE INSTALAÇÃO	Sim	Não
<b>4.1</b>	Verificar se o elétrodo está ligado corretamente ao medidor de pH	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>4.2</b>	Verificar se a sonda de temperatura NTC está corretamente ligada ao medidor de pH e elétrodo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Data ___/___/___ Verificado por _____			

Desvios	Ação Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/___	

5	OPERACIONALIDADE DO EQUIPAMENTO	Sim	Não
5.1	Verificar que ao pressionar a tecla ON a luz LED ao lado se acende.		
5.2	Navegar pelos modos de medição pH, mV e T(°C).		
5.3	Para verificar a última calibração selecione CAL DATA.		

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por \_\_\_\_\_

Desvios	Acção Corretiva

Aprovado por \_\_\_\_\_ A implementar por \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Anexo VII - Protocolo de qualificação de operação do medidor de pH 301 da *Hanna Instruments*, 290PH001

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	03.14	Original	LG

### PALAVRAS-CHAVE

Qualificação de equipamento; Qualificação de operação; QO; 301 *Hanna Instruments*; Medidor de pH; 290PH001.

### ASSINATURAS

---

---

---

## Índice

1.	ÂMBITO	111	
2.	RESPONSABILIDADES	111	
3.	DESCRIÇÃO DE OPERACIONALIDADES	111	
4.	PROCEDIMENTO	111	
4.1.	EQUIPAMENTO AUXILIAR DE MEDIÇÃO		111
4.2.	PLANO DE CALIBRAÇÃO	112	
4.3.	TESTES	112	
5.	CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO	113	
6.	DOCUMENTOS IMPRESSOS ASSOCIADOS	113	
7.	ANEXOS	113	

### 1. Âmbito

Este protocolo estabelece os procedimentos a seguir, através do registo documentado, da qualificação de operação do medidor de pH modelo 301 da *Hanna Instruments*, com código CIPAN 290PH001.

Este protocolo representa evidência de que o medidor permite em rotina obter resultados analíticos consistentes. Na qualificação de operação do medidor deve usar-se o método de calibração descrito na instrução técnica C290IT02027.

### 2. Responsabilidades

Função	Responsabilidades
Operador/Analista I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>Realização de todos os testes necessários á qualificação de operação.</li><li>Elaboração do protocolo de qualificação de operação e respetivo relatório.</li><li>Supervisionamento e avaliação dos testes realizados pelo analista.</li></ul>
Responsável I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>Pela aprovação do registo de qualificação de instalação (QO) após preenchimento de todos os pontos.</li><li>Pela aprovação de eventuais ações corretivas e pela nomeação do membro a implementá-las.</li><li>Verificação da eficácia das ações corretivas.</li><li>Emissão e atualização deste documento.</li></ul>

### 3. Descrição de operacionalidades

Verificar que o equipamento executa funções básicas necessárias ao trabalho de rotina. Com este ponto não se pretende verificar todas as potencialidades do equipamento. Assim as funções operacionais são:

- Inicializar o equipamento
- Aceder aos métodos de análise de calibração
- Executar uma calibração
- Executar uma análise
- Aceder aos dados de calibração e de análise armazenados em GLP.

## 9. Procedimento

### 9.1. Equipamento auxiliar de medição

Material e Equipamento	Reagentes
<ul style="list-style-type: none"><li>Medidor de pH 290PH001</li><li>Eléctrodo de pH de combinação com corpo de vidro refª HI 1131B, <i>Hanna Instruments</i></li><li>Sonda de temperatura refª HI 7669/2W, <i>Hanna Instruments</i></li><li>Recipiente de despejos para lavagem do eléctrodo</li><li>Copos de plástico de 30ml</li><li>Papel absorvente</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Água purificada para a lavagem do eléctrodo</li><li>Solução de electrólito 3,5 KCl refª HI 7071</li><li>Solução de armazenamento refª HI 70300</li><li>Gama alcalina: Soluções tampão pH 9, pH 8 e pH 7 (rastreadáveis pelo NIST)</li><li>Gama ácida: Soluções tampão pH 7, pH 5 e pH 4 (rastreadáveis pelo NIST)</li><li>Etanol 96%</li></ul>

## 9.2. Plano de calibração

O eléctrodo combinado de pH com corpo de vidro ref<sup>a</sup> HI131, *Hanna Instruments* possui certificado de calibração do fabricante, sendo verificado diariamente ou sempre que utilizados.

A calibração é feita segundo a instrução técnica C290IT02027 e é registado no respetivo logbook.

## 9.3. Testes

De modo a verificar se o medidor de pH 301 *Hanna Instruments* opera de acordo com as instruções elaboradas realizam-se testes que se dividem em duas fases.

1º Fase – Calibração do sistema medidor pH, se tudo estiver conforme passa-se então para a fase seguinte. A precisão dos resultados será tanto maior quanto mais precisa for a calibração, sendo importante a utilização de tampões rastreáveis ao NIST.

2º Fase – Calibração do sistema medidor pH em amostra padrão. Efetuar as medições de pH á temperatura  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$  na solução tampão certificada pela IUPAC  $\text{pH}=6,865\pm 0,010$  ao longo de 24h.

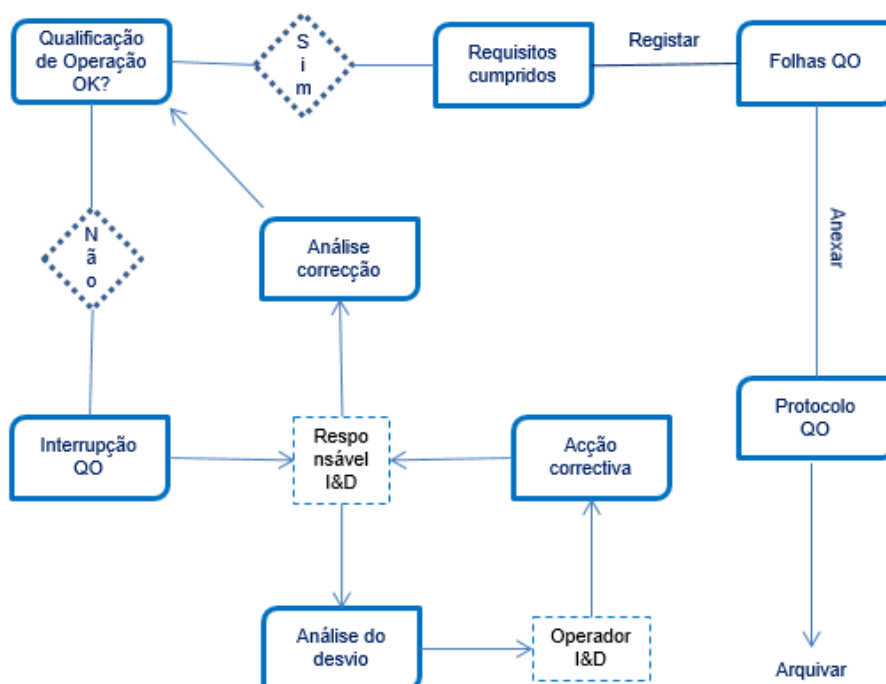


Figura 1 – Procedimento após a realização do teste de qualificação de operação.

Sempre que for detetado algum desvio, o técnico responsável pela secção deverá registar nas referidas folhas de registo QO qual o desvio detetado e quais as ações corretivas a implementar.

Seguidamente, as ações corretivas sugeridas serão avaliadas e aprovadas pela responsável da secção de investigação e desenvolvimento, a qual nomeará o responsável para implementação das mesmas. Após implementação das ações corretivas, é necessário verificar novamente o cumprimento do ponto que originou o desvio, sendo emitida uma nova folha de registo.

A deteção de um desvio implica a interrupção da qualificação, devendo ser retomada apenas após implementação da Ação corretiva aprovada e verificação da sua eficácia.

## 10. Critérios de aceitação

A qualificação de instalação está aceite quando todos os pontos existirem e forem afirmativos.

## 11. Documentos impressos associados

Folha de registo de qualificação de operação do medidor de pH 290PH001

## 12. Anexos

N.º Anexo	Título	N.º folhas
Anexo II	Folhas de registo de QO <i>Hanna Instruments</i> , 290PH001	3

1	DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO	Sim	Não
1.1	O código CIPAN indicado na etiqueta de identificação: _____		
1.2	Número de série do medidor: _____		
1.3	Eléctrodo associado: Modelo: _____, nº série _____		
1.4	Sonda de temperatura associada: Modelo: _____, nº série _____		
1.5	O relatório de qualificação de instalação foi aprovado? Código do relatório de qualificação de instalação _____		
Data ___/___/_____ Verificado por _____			

Desvios	Acção Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/_____	

2	PROCEDIMENTO DE CALIBRAÇÃO	Sim	Não
2.1	Calibração		
2.1.1	Pressionar botão <i>pH</i> ;		

2.1.2	Pressionar botão <i>Cal</i> ;		
2.1.3	Introduzir elétrodo e sonda no copo que contém o tampão pH 7; O elétrodo e o sensor de temperatura devem estar mergulhados cerca de 1,5cm, quando aparecer <i>CFM</i> , pressionar <i>CFM</i> .		
2.1.4	Introduzir elétrodo e sonda no copo que contém o tampão pH 10; O elétrodo e o sensor de temperatura devem estar mergulhados cerca de 1,5cm, quando aparecer <i>CFM</i> , pressionar <i>CFM</i> .		
2.1.5.	Introduzir elétrodo e sonda no copo que contém o tampão pH 4; O elétrodo e o sensor de temperatura devem estar mergulhados cerca de 1,5cm, quando aparecer <i>CFM</i> , pressionar <i>CFM</i> .		
2.1.5	Resultado obtido para o zero pH _____		
2.1.6	Resultado obtido para a sensibilidade _____		
2.1.7	Resultado obtido para a temperatura _____		
2.1.8	Imprimir os resultados da calibração		
Data ___/___/____ Verificado por _____			

Desvios	Acção Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/____	

3	<b>PROCEDIMENTO DE MEDIÇÃO DE pH EM AMOSTRAS</b>	Sim	Não
3.1	<i>Medição do pH em amostras-padrão</i> Registrar marca, lote e prazo de validade do tampão pH 6,865 Marca _____ Lote _____ Val. _____		
3.1.1	Introduzir o elétrodo e a sonda no copo contendo tampão 6,865 e pressionar pH.  O elétrodo e o sensor de temperatura devem estar mergulhados cerca de 1,5cm		
3.1.2	Resultado obtido para o tampão pH 6.865 á temperatura ambiente; t = 0 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.3	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura de aproximadamente 20°C; t= 0 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.4	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura de aproximadamente 30°C; t= 0 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.5	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura ambiente; t =6 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.6	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura 20°C; t =6 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.7	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura 30°C; t =6 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.8	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura ambiente; t =24 horas  pH = _____ T(°C) = _____		
3.1.9	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura de aproximadamente 120°C; t =24 horas  pH = _____ T(°C) = _____		

<b>3.1.10</b>	Resultado obtido para a nova solução tampão pH 6.865 á temperatura de aproximadamente 30°C; t =24 horas pH = _____ T(°C) = _____
<b>3.1.11</b>	Imprimir os resultados das medições
Data ___/___/____ Verificado por _____	

Desvios	Ação Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/____	

## Anexo VIII - Protocolo de qualificação de desempenho do medidor de pH 301 *Hanna Instruments*, 290PH001

### HISTÓRICO DE REVISÕES

Versão	Data	Descrição	Responsável
1	03.14	Original	LG

### PALAVRAS-CHAVE

Qualificação de equipamentos; Qualificação de desempenho; QD; 301 *Hanna Instruments*; Medidor de pH.

### ASSINATURAS

Nome	Função	Assinatura	Data

### Índice

1.	ÂMBITO	120
----	--------	-----

- 2. RESPONSABILIDADES 120
- 3. PROCEDIMENTO 120
- 3.1. VERIFICAÇÕES GERAIS 120
- 3.2. ESCOLHA DA AMOSTRA 120
- 3.3. TESTES DE DESEMPENHO 120
- 3.4. TESTES DE DESEMPENHO REPETIBILIDADE E EXATIDÃO 121
- 5. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO 122
- 6. DOCUMENTOS IMPRESSOS ASSOCIADOS 122
- 7. ANEXOS 122

#### 4. Âmbito

Este protocolo estabelece os procedimentos a seguir, através do registo documentado, da qualificação de desempenho do medidor de pH modelo 301, da *Hanna Instruments*, com código CIPAN 290PH001.

Este protocolo representa a evidência de que o medidor 301 *Hanna Instruments* instalado e operacional permite a obtenção em rotina de resultados analíticos consistentes. Os testes e verificações a realizar para a qualificação de desempenho têm por base a gama de utilização do medidor de pH em questão.

#### 5. Responsabilidades

<i>Função</i>	<i>Responsabilidades</i>
Operador/Analista I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Pela realização dos pontos que constituem a qualificação de desempenho.</li><li>▪ Pelo preenchimento das folhas de registo de qualificação de desempenho, que se encontram no anexo I.</li><li>▪ Pela elaboração do protocolo e respetivo relatório de qualificação de desempenho.</li></ul>
Responsável I&D	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Pela aprovação do registo de qualificação de instalação (QD) após preenchimento de todos os pontos.</li><li>▪ Pela aprovação de eventuais ações corretivas e pela nomeação do membro a implementá-las.</li><li>▪ Verificação da eficácia das ações corretivas.</li><li>▪ Emissão e atualização deste documento.</li></ul>

#### 6. Procedimento

##### 6.1. Verificações gerais

- Localização do medidor de pH;
- Identificação do medidor de pH
- Identificação do elétrodo e sensor de temperatura associado;
- Verificação do estado e programação de funcionamento do equipamento;
- Identificar a amostra a usar nos testes de performance.

##### 6.2. Escolha da amostra

Escolheu-se a fase móvel do método de análise do cloridrato de minociclina como amostra a utilizar nos testes de qualificação de desempenho do medidor de pH em questão, dado o conhecimento desta fase móvel e inúmeros dados históricos já recolhidos. Deste modo, existe garantia de que os resultados são homogéneos e os intervalos de variação são conhecidos.

##### 6.3. Testes de desempenho

De modo a verificar se o equipamento medidor 301 *Hanna Instruments* tem o desempenho esperado, realizaram-se dois testes.

1º Fase - Calibração do medidor ph, utilizando padrões de pH rastreáveis. Se tudo estiver conforme passa-se á fase seguinte.

2º Fase - Medição do pH em amostra corrente do laboratório I&D

#### 6.4. Testes de desempenho repetibilidade e exatidão

Permitem avaliar o comportamento do equipamento ao nível do desempenho, através de testes práticos, determinando a repetibilidade e exatidão.

Através da análise da repetibilidade pretende-se garantir que um resultado obtido é idêntico a outro, obtido imediatamente a seguir, nas mesmas condições.

Calcula-se então o limite de repetibilidade, para um nível de confiança de 95% através da seguinte expressão:

$$r = 2,8\sqrt{S_{ij}^2}, \text{ onde } S_{ij}^2 \text{ é a variância associada aos resultados considerados.}$$

Com a exatidão, pretende-se garantir que os resultados obtidos estão próximos do valor tido como verdadeiro.

Todos os testes devem ser feitos no intervalo de temperatura de 20-30°C.

As folhas de registo apresentam a discriminação de todos os parâmetros avaliados para qualificar a instalação. Com o objetivo de verificar se o equipamento foi entregue e instalado corretamente, de acordo com o manual do fabricante. Os testes apresentam-se descritos em anexo, e no relatório de qualificação do protocolo.

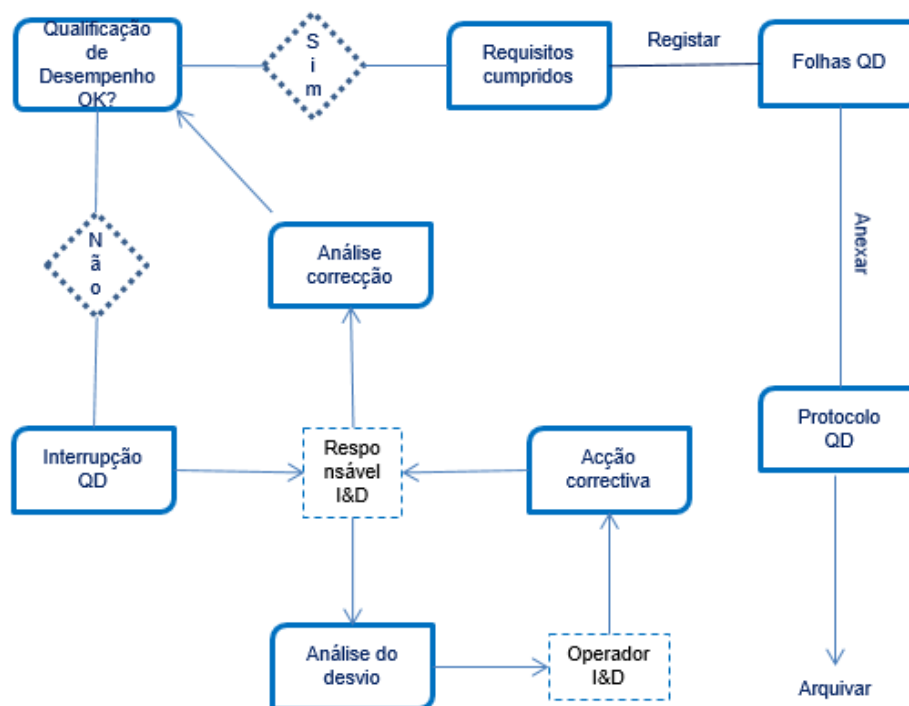


Figura 1 – Procedimento após a realização do teste de qualificação de desempenho.

Sempre que for detetado algum desvio, o técnico responsável pela secção deverá registar nas referidas folhas de registo QD qual o desvio detetado e quais as ações corretivas a implementar.

Seguidamente, as ações corretivas sugeridas serão avaliadas e aprovadas pela responsável da secção de investigação e desenvolvimento, a qual nomeará o responsável para implementação das mesmas. Após implementação das ações corretivas, é necessário verificar novamente o cumprimento do ponto que originou o desvio, sendo emitida uma nova folha de registo.

A deteção de um desvio implica a interrupção da qualificação, devendo ser retomada apenas após implementação da ação corretiva aprovada e verificação da sua eficácia.

### 5. Critérios de aceitação

A qualificação de instalação está aceite quando todos os pontos existirem e forem afirmativos.

### 6. Documentos impressos associados

Folha de registo de qualificação de desempenho do medidor de pH 290PH001

### 7. Anexos

N.º Anexo	Título	N.º folhas
Anexo I	Folhas de registo de QD <i>Hanna Instruments</i> , 290PH001	3

1	VERIFICAÇÕES GERAIS	Critério Aceitação	Resultado	Cumpre	Não Cumpre
1.1	Localização do equipamento: _____				
1.2	Temperatura ambiente	20 - 30°C			
1.3	O código CIPAN indicado na etiqueta de identificação coincide com a referência indicada no protocolo?	Resposta Afirmativa			
1.4	Número de série do medidor de pH: _____				
1.5	Número de série do eletrodo, modelo e marca: _____				
1.6	Número de série modelo e marca do sensor de temperatura: _____				
1.7	O relatório de Qualificação de Operação foi aprovado?	Resposta Afirmativa			
	Código do relatório de qualificação de operação: _____				
1.8	O equipamento está devidamente calibrado?	Resposta Afirmativa			
	Registrar os parâmetros: Zero pH _____ Sensibilidade _____ Temp <sup>a</sup> Cal. _____				
1.9	Os parâmetros introduzidos para a caracterização do método são os que constam no documento C230IT02032?	Resposta Afirmativa			
1.10	Identificar fase móvel de análise de cloridrato de minociclina a utilizar nos testes de performance: _____				
Verificações efetuadas por _____ Data ____/____/____					

Desvios	Acção Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ____/____/____	

2	TESTES DE PERFORMANCE		Critério Aceitação	Resultado	Cumpre	Não Cumpre
2.1	ÁGUA FERVIDA E RESFRIADA OU DE GRAU 1					
2.1.2	Introduzir o eletrodo e a sonda no copo contendo água fervida e resfriada ou de grau 1 e premir o botão CAL. Tanto o eletrodo como a sonda de temperatura estão imersos a pelo menos 1,5cm?		Resposta Afirmativa			
	Registrar os resultados obtidos para a água fervida e resfriada ou de grau 1.		5,8 ≤ pH ≤ 6,6	1) _____, _____°C 2) _____, _____°C		
2.2	AMOSTRA					
2.2.1	Introduzir o eletrodo e a sonda no copo contendo a solução amostra e premir o botão CAL. Tanto o eletrodo como a sonda de temperatura estão imersos a pelo menos 1,5cm?		Resposta Afirmativa			
2.2.2	RESULTADOS					
Ensaio	Identificação da fase móvel	Dia	Medição pH	Medição T (°C)	Operador	
1		____/____/____			_____	
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
Verificações efetuadas por _____ Data ____/____/____						


Desvios	Ação Corretiva

Aprovado por \_\_\_\_\_ A implementar por \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

2	TESTES DE PERFORMANCE (CONT.)	Critério Aceitação	Resultado	Cumpre	Não Cumpre
2.3	<b>REPETIBILIDADE</b>				
2.3.1	Registar o resultado obtido para a repetibilidade.	$r < 0,02$			
2.4	<b>EXACTIDÃO</b>				
2.4.1	Registar a amplitude de resultados obtido para as 10 soluções amostra.	$? \leq \text{pH} \leq ?$	_____ (Mín. pH) a _____ (Máx. pH)		
2.5	Imprimir os resultados.				
Verificações efetuadas por _____ Data ___/___/___					

Desvios	Ação Corretiva
Aprovado por _____ A implementar por _____ Data ___/___/___	

## Anexo IX – Inventário de reagentes

				<b>LISTAGEM DE REAGENTES</b> Armazém de Reagentes													
CÓDIGO PRODUTO	NOME PRODUTO PT	NOME PRODUTO EN	CAS	CÓDIGO CATEGORIA	UNI.	CÓDIGO JBA	PROJETO	FÓRMULA QUÍMICA	ESTRUTURA QUÍMICA	VALIDADE	UTILIZAÇÃO	COMPOSTO	CLASSIFICAÇÃO	PESO MOLECULAR	FRASES R/S	PERIGO	INCOMPATIBILIDADE QUÍMICA

## **Anexo X – Preparação das soluções de reagentes**

Solução Hidróxido Sódio – Dissolver 8,5g de hidróxido de sódio em água, em balão volumétrico de 100mL e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução ácido fosfórico – a 115g de ácido fosfórico concentrado adicionar 885g de água e agitar.

Solução de bissulfato de tetrabutilamônio 10g/L, pH=8,0 – Para um balão volumétrico de 1000mL, pesar 10g de bissulfato de tetrabutilamônio, dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Acertar o pH em 8,0 com solução diluída de hidróxido de sódio R.

Solução de hidrogenofosfato dipotássico 35g/L, pH=8,0 – Para um balão volumétrico de 1000mL, pesar 35g de hidrogenofosfato dipotássico, dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Acertar o pH em 8,0 com solução diluída de ácido fosfórico R.

Solução de EDTA disódico 40g/L, pH=8,0 – Para balão volumétrico de 1000mL, pesar 40g EDTA disódico, dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH em 8,0 com solução diluída de hidróxido de sódio R.

Solução diluída de ácido fosfórico – A 115g de ácido fosfórico concentrado adicionar 885g de água e agitar.

Solução diluída de hidróxido de sódio – Dissolver 8,5g de hidróxido de sódio em água, em balão volumétrico de 100mL e completar o volume com o mesmo solvente.

Solução de metabissulfito de sódio 40g/L – Para o balão volumétrico de 100mL, pesar 4g de metabissulfito de sódio, dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente.

Ácido clorídrico 0,1M – Diluir 100mL de ácido clorídrico 1N com água, em balão volumétrico e completar com o mesmo solvente.

Ácido clorídrico 0,05M – Diluir 50mL de ácido clorídrico 1N com água, em balão volumétrico e completar com o mesmo solvente.

Ácido clorídrico 0,01M – Diluir 10mL de ácido clorídrico 1N com água, em balão volumétrico de 1000mL e completar o volume com o mesmo solvente.

## **Anexo XI – Preparação de fase móvel A e B**

### **Preparação da Fase móvel do método A**

Em balão volumétrico 1000mL adicionar 72g de butanol terciário, 100mL de solução de hidrogenofosfato dipotássico, 200mL de solução de hidrogenossulfato de tetrabutílamónio, 10mL de EDTA disódico e completar o volume com água.

### **Preparação da Fase móvel do método B**

Em balão volumétrico a 1000mL adicionar 50mL de ácido trifluoracético e completar volume com água. Em balão á parte adicionar 800ml de acetonitrilo, 150 de metanol e 50 de tetrahydrofurano.

## Anexo XII – Preparação das soluções de amostras e padrão

Amostra - Para um balão volumétrico de 1000mL, dissolver 125g de amostra de limeciclina FE, em 5mL de água. Adicionar 1mL de solução de metabissulfito de sódio e deixar repousar entre 16 a 24h, em local escuro a 20-25°C. Após repouso adicionar 50mL de ácido clorídrico 0,05M, agitar para dissolver o precipitado e completar o volume com água. As amostras foram feitas em duplicados e diluídas 1:100 v/v e 5:100 v/v.

Padrões FE e amostras CIPAN usadas na preparação das soluções padrão e soluções amostra.

Padrões	Amostras
<b>Cloridrato de tetraciclina FE</b>	Cloridrato de tetraciclina lote 305.40059 1 3
<b>Cloridrato de 4-epitetraciclina FE</b>	Cloridrato de tetraciclina lote 305.40060 1 3
<b>Cloridrato de anidrotetraciclina FE</b>	Cloridrato de tetraciclina lote 305.40068 1 3
<b>Cloridrato de 4-epianidrotetraciclina FE</b>	Cloridrato de tetraciclina lote 305.40001 1 4
	Cloridrato de tetraciclina lote 305.40002 1 4

Solução padrão (a) – Em balão volumétrico de 25mL, dissolver 25mg de cloridrato de tetraciclina FE em ácido clorídrico 0,01M e completar o volume com o mesmo ácido.

Solução padrão (b) - Em balão volumétrico de 25mL, dissolver 12,5mg de cloridrato de 4-epitetraciclina FE em ácido clorídrico 0,01M e completar o volume com o mesmo ácido.

Solução padrão (c) - Em balão volumétrico de 50mL, dissolver 5mg de cloridrato de anidrotetraciclina FE em ácido clorídrico 0,01M e completar o volume com o mesmo ácido.

Solução padrão (d) - Em balão volumétrico de 25mL, dissolver 5mg de cloridrato de 4-epianidrotetraciclina FE em ácido clorídrico 0,01M e completar o volume com o mesmo ácido.

Solução padrão resolução (e) - Em balão volumétrico de 25mL, misturar 1mL de solução padrão (a) 2mL de solução padrão (b) e 5mL de solução padrão (d) completar o volume com o mesmo ácido.

Solução padrão resolução (f) - Em balão volumétrico de 200mL, misturar 40mL de solução padrão (b) 20mL de solução padrão (c) e 5mL de solução padrão (d) completar o volume com o mesmo ácido.

