

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE/FIOCRUZ

**CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE DE
PRODUTOS, AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA
SANITÁRIA.**

**AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
DE ADENINA EM SOLUÇÃO PRESERVADORA DE BOLSA DE
SANGUE**

ANNA MARIA BARRETO S. FUST

**ORIENTADORES: MICHELE FEITOZA SILVA
WILSON CAMARGO**

MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA

RIO DE JANEIRO/RJ: JANEIRO / 2009

AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE ADENINA EM SOLUÇÃO PRESERVADORA DE BOLSA DE SANGUE

Anna Maria B. S. Fust

Curso de Especialização em Controle da
Qualidade de Produtos, Ambientes e
Serviços Vinculados à Vigilância
Sanitária.

Instituto Nacional de Controle da
Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ.

Orientadores: Michele Feitoza Silva
Wilson Camargo

Rio de Janeiro, 2009

AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DE ADENINA EM SOLUÇÃO PRESERVADORA DE BOLSA DE SANGUE

Autor: Anna Maria Barreto Silva Fust

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Especialista a em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Aprovado:

Prof.: _____
JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR (INCQS)

Prof^a.: _____
CATIA VERONICA DOS SANTOS OLIVEIRA (ENSP)

Prof.^a: _____
KÁTIA MIRIAM PEIXOTO MENEZES (INCQS)

Prof.^a: _____
MARIA APARECIDA AFFONSO BOLLER (INCQS) (Suplente)

Orientadores.: _____
MICHELE FEITOZA SILVA

WILSON CAMARGO

Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

Fust, Anna Maria Barreto Silva

Avaliação e desenvolvimento de metodologia analítica de adenina em solução preservadora de bolsa plástica de sangue / Anna Maria Barreto Silva Fust. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2009.

xiii, 46f.;il.tab.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Controle de Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária. - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009.

Orientadores: Michele Feitoza Silva
Wilson Camargo

1. Bolsa de sangue. 2. Adenina. 3. Cromatografia líquida de alta Eficiência. 4. Portaria nº 950/98 I. Título

Aos meus pais, marido e filhos, amores que sustentam a minha vida.

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

A DEUS, força inesgotável para o meu viver;

À Direção do INCQS, pelo incentivo e o investimento aos profissionais da “casa”;

À Chefe de Departamento por permitir a participação deste curso;

Ao Chefe de Laboratório WILSON CAMARGO, por todas as vezes que permitiu meu desenvolvimento profissional;

Aos meus orientadores MICHELE FEITOZA SILVA e WILSON CAMARGO, pela coragem em me orientar;

Às Coordenadoras MARIA APARECIDA BOLLER e KATIA CHRISTINA LEANDRO, pelo empenho, participação e disposição para realização do Curso Especialização 2008.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação;

Ao “meu povo”: MICHELE FEITOZA SILVA, OZEIAS LIMA LEITÃO e especialmente RENATA DE FREITAS DALAVIA VALE, pela amizade, conforto e companheirismo em todo o decorrer do ano;

Aos colegas de curso que tornaram muito leve e agradável o convívio no decorrer do ano, em especial VALERIA DE MELLO MEDEIROS, que foi exemplo de força, determinação e companheirismo;

À minha irmã CAROLINA FALCÃO pela ajuda e companheirismo;

À minha mãe ALZIRA, meu marido FERNANDO e minhas amigas MARARLENE e MARIA DO ROSÁRIO, pelas preciosas contribuições em minha vida;

À todos os colegas do Departamento de Química, que incentivaram, torceram e demonstraram carinho durante o curso.

RESUMO

As bolsas plásticas para coleta de sangue, utilizadas para preservação do sangue humano regulamentadas pela Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998, podem ser de vários tipos, dependendo da solução anticoagulante e/ou preservadora. São classificadas pela ANVISA como Risco III, devido a sua complexidade e criticidade. O objetivo deste estudo foi avaliar criticamente o método da Farmacopéia Americana XXXI e o proposto na portaria 950/98 para determinação quantitativa da adenina, que é um dos componentes da solução preservadora de bolsa plástica de sangue e assim, desenvolver um novo método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a ser sugerido na revisão da Legislação vigente. Realizou-se um levantamento de dados dos resultados das análises nas amostras de bolsa de sangue que deram entrada no LBAIS. Utilizou-se o Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA) do INCQS e usou-se como filtro a data de entrada das amostras, definindo-se o período de 2000 a 2007. Uma avaliação final, quanto à satisfatoriedade em relação ao ensaio de determinação do teor de adenina, justificou a investigação e a análise do impacto dos resultados no Programa de Bolsa de Sangue. O método difere do oficial por apresentar uma substituição do ácido fosfórico utilizado na fase móvel e do ácido clorídrico utilizado na solubilização da adenina, com a intenção de aumentar a vida útil da coluna cromatográfica. A metodologia foi desenvolvida no período de fevereiro de 2008 a junho de 2008. No período utilizado para amostragem, o INCQS recebeu 279 amostras. A maior ocorrência de resultados insatisfatórios foi observada no ano de 2003 (44,4%), e o total de amostras que tiveram insatisfatoriedade quanto ao teor de adenina foram 19, resultando em um percentual de 24% do total de amostras insatisfatórias. O novo método mostrou bons resultados nos parâmetros modificados: especificidade, seletividade e reprodutibilidade, estando a caminho para futura validação.

Palavras-chave: Bolsa de sangue, cromatografia líquida de alta eficiência, adenina Portaria nº 950/98.

ABSTRACT

The plastic bags for collecting blood, used for preservation of human blood regulated by Decree No 950, from Nov. 26, 1998, can be of various kinds, depending on the anticoagulant solution and / or preservative. They are classified as risk III by ANVISA, due to its complexity and criticality. This study aimed to evaluate critically the method of United States Pharmacopeia XXI and the proposed ordinances 950/98 for the quantitative determination of adenine, one of the components of the solution preserved in a plastic pouch of blood and thus develop a new method by using high performance liquid chromatography (HPLC) to be suggested in the review of existing legislation. We have evaluated data from the results of analysis on samples of blood stock received at the LBAIS. Using the System Management Samples (EMS) of INCQS and used as a filter to the entry of samples, setting up the period 2000 to 2007. And yet a final assessment as to their satisfactoriness, as to the content of adenine test, which justified the investigation and also a critical analysis of current methodology. The method differs from the official by presenting a replacement of phosphoric acid used in mobile phase and hydrochloric acid used in the solubilization of the sample. It was developed in the period from February 2008 to June 2008. During the period under consideration, the INCQS received 279 samples. The highest incidence of unsatisfactory results were observed in 2003 (44.4%), and the total number of samples that were unsatisfactory about the content of adenine was 19, resulting in a percentage of 24% of unsatisfactory samples. The new method showed good results in the modified parameters: specificity, selectivity and reproducibility, and the path for future validation

Keywords: Stock Exchange of blood, adenine, high-pressure liquid chromatography, preservation of blood, Decree No 950/98

LISTA DE ABREVIações

<i>ABO</i>	Sistema de grupo sanguíneo
ACD	Citrato, ácido cítrico e dextrose
ATP	Trifosfato de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPG	Bifosfoglicerato
CPD	Fosfato, citrato e dextrose
CPDA	Fosfato, citrato, dextrose e adenina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOU	Diário Oficial da União
DQ	Departamento de Química
EC	European Commission
EP	European Pharmacopoeia
FB	Farmacopéia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GT-AIS	Grupo Técnico – Artigo e Insumos de Saúde
HCl	Ácido clorídrico
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
LACENS	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LBAIS	Laboratório de biológicos, artigos e insumos de Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
SAG	Adenina e glicose
SAGM	Adenina, glicose e manitol
SGA	Sistema de Gerenciamento de Amostra
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucléico
REBLAS	Rede Brasileira de Laboratórios de Saúde
USP	United States Pharmacopoeia - Farmacopéia Americana
USP XXXI	United States Pharmacopoeia 31
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Tipos de solução preservadora de bolsas plásticas e tempo médio de armazenamento	04
Tabela 02: Avaliação critica dos parâmetros do ensaio alternativo da portaria nº 950/98	14
Tabela 03: Variações de concentrações de reagentes na fase móvel	15
Tabela 04: Tipos de solventes utilizados na verificação da solubilização ..	21
Tabela 05: Comparação das áreas obtidas na solubilização do padrão ...	22
Tabela 06: Variações de concentrações de reagente na fase móvel e tempo de retenção	24
Tabela 07: Variações na concentração de acido acético na fase móvel ...	25
Tabela 08: Ajuste da adição de acetato de amônio	28
Tabela 09: Planilha de demonstração de cálculo do teor de adenina – Análise	35
Tabela 10: Planilha de demonstração de cálculo do teor de adenina – Re-análise	35
Tabela 11: Verificação da influência da temperatura no sinal obtido	36
Tabela 12: Verificação da influência do heptano sulfonato de sódio	37
Tabela 13: Verificação do efeito da adição da trietilamina na fase móvel .	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática de bolsa plástica	03
Figura 02: Esquema formação do ATP.....	06
Figura 03: Modelo esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência	07
Figura 04: Organograma do INCQS	10
Figura 05: Gráfico do percentual de amostras insatisfatórias quanto ao ensaio da adenina	18
Figura 06: Esquema de avaliação das metodologias analíticas para adenina	19
Figura 07: Cromatograma obtido com padrão solubilizado em ácido acético 1:1	22
Figura 08: Cromatograma obtido com padrão solubilizado em ácido clorídrico 1% v/v	22
Figura 09: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e ácido acético 1% v/v	26
Figura 10: Cromatograma obtido com fase móvel contendo 50 mg/L de heptano sulfonato de sódio e ácido acético 5%v/v	26
Figura 11: Cromatograma obtido com fase móvel contendo acetato de amônio 50 mg/L e ácido acético 1% v/v	27
Figura 12: Cromatograma obtido com fase móvel contendo acetato de amônio 50 mg/L e ácido acético 5% v/v	27
Figura 13: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L e ácido acético 3 %v/v	28
Figura 14: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L, acetato de amônia a 100 mg/L e ácido acético 3 %v/v	29
Figura 15: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L, acetato de amônia a 300 mg/L e ácido acético 3% v/v	29
Figura 16: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L, acetato de amônia a 200 mg/L e ácido acético a 3% v/v	30

Figura 17: Demonstração do cálculo de assimetria do sinal cromatográfico, realizado com Cromatograma da Figura 16	30
Figura 18: Curva Analítica 01	32
Figura 19: Curva Analítica 02	33
Figura 20: Curva Analítica 03	34
Figura 21: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sodio 50 mg/L e acido acético 1%v/v	36
Figura 22: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e acido acético 1%v/v	36
Figura 23: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, acetato de amônio 150 mg/L e acido acético 3%v/v	37
Figura 24: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 100 mg/L, acetato de amônio 150 mg/L e acido acético 3%v/v	38
Figura 25: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, acetato de amônio 200 mg/L e acido acético 3%v/v	38
Figura 26: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, trietilamina 0,2%v/v e acido acético 3%v/v	39
Figura 27: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, trietilamina 0,4%v/v e ácido acético 3% v/v ...	40
Figura 28: Cromatograma obtido na varredura “Scan” de solução da adenina de 250nm a 300nm	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Aspectos Gerais.....	01
1.2 A Bolsa Plástica	03
1.2.1 A importância e os tipos de soluções anticoagulantes	03
1.2.2 Bolsas plásticas contendo solução preservadora de adenina	04
1.2.3 A adenina	05
1.2.4 A metodologia analítica para determinação da adenina	06
1.2.5 Adequação do sistema cromatográfico	07
1.3 O Contexto de Vigilância Sanitária	08
1.3.1 Disposições legais	08
1.3.2 O INCQS e o controle de qualidade de bolsas de sangue	09
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Avaliação de dados	13
3.2 Avaliação crítica do ensaio indicado na legislação vigente	13
3.3 Desenvolvimentos de metodologia analítica para adenina	14
3.3.1 Solubilidade da adenina	14
3.3.2 Modificações para ajuste da fase móvel.....	15
3.3.3 Determinação do comprimento de onda máximo.....	16
3.4 Descrição do procedimento adotado no preparo de padrões e de amostras	16
3.5 Sistematização de dados	16
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	17
4.1 Resultado da Avaliação de dados	17
4.1.1 Quanto à satisfatoriedade das amostras no período de 2000 a 2007	17
4.1.2 Quanto à insatisfatoriedade do ensaio da adenina	17
4.2 Resultado da Avaliação crítica do ensaio indicado na legislação	18
4.3. Descrições das etapas do desenvolvimento de metodologia analítica	20
4.3.1 Resultados da verificação de solubilidade da adenina	21
4.3.1.1 Baseado na verificação visual.....	21
4.3.1.2 Baseado na comparação de áreas	21
4.3.2 Resultados das modificações para ajuste da fase móvel	23
4.3.2.1 Variação na concentração de reagentes.....	24
4.3.2.2 Ajuste na concentração de acetato de amônio	28
4.3.2.3 Cálculo de assimetria e T_f	30
4.3.2.4 Curvas analíticas obtidas com o novo método cromatográfico	31
4.3.2.5 Outros testes.....	34
4.3.3 Resultado da determinação do comprimento de onda máximo	40
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. ANEXO	47

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos Gerais

Além da cor vermelha, da textura característica e por estar fortemente ligada aos conceitos de vida, morte, saúde e doença a consideração a respeito do sangue aos poucos foi se modificando ao longo da história da humanidade, partindo do misticismo até as atuais e importantes descobertas científicas (VICENTE, 2002). Na antiguidade as pessoas usavam o sangue como um medicamento e acreditava-se que, se uma pessoa doente ingerisse o sangue de uma pessoa saudável ficaria curada. Era, então, ingrediente importante de “poções milagrosas” indicadas para tratar algumas doenças atribuídas aos espíritos, como a epilepsia, ou para garantir a longevidade (OBERMAN, 1996). Os sacerdotes astecas do séc. XIV usavam-no em seus rituais religiosos, pois acreditavam que possuía poderes sobrenaturais. Seu uso tinha caráter essencialmente místico (LOPES et al. 1995).

A partir de 1613, quando William Harvey descreveu pela primeira vez a circulação sanguínea, começou-se a perceber que seria possível injetar ou retirar líquidos das veias. Iniciaram-se as primeiras práticas de transfusões sanguíneas, foram vários os experimentos e fracassos durante o séc. XVII. Transfusões de animais para humanos, transfusões direta dos vasos sanguíneos para o receptor, com morte de pessoas, entre outros, e o que culminou a proibição e o esquecimento desta prática por quase dois séculos. Depois disso, somente no séc. XIX, em 1818 um médico obstetra chamado Blundell retomou as experiências, preocupado com as mortes de mulheres durante os partos. Conseguiu bons resultados disseminando a prática somente entre humanos, mas ainda realizando a transfusão diretamente do braço do doador para o braço do receptor, o que causava a perda dos vasos sanguíneos ocasionada com a lesão no momento da anastomose¹ (HÖGMAN et al., 2002).

Utilizando recursos tecnológicos de cada época, os cientistas iam aperfeiçoando as técnicas aos poucos.

1-Anastomose: comunicação natural ou resultante de processo cirúrgico, entre tubos, vasos sanguíneos ou nervos da mesma natureza, que promove a união entre eles.

Evitar a coagulação do sangue era o maior desafio e segundo HASHIMOTO (1997, p.45), “foi dado um grande salto no avanço das conquistas sobre circulação sangüínea, quando em 1900 Landsteiner descobriu o grupo ABO, e assim foram se formando conceitos sobre o sistema circulatório e as prováveis compatibilidades entre os tipos sangüíneos”.

Logo após, inicia-se a estocagem do sangue em frascos de vidro, mas o tempo de preservação era pequeno. Foi quando em 1916, ROUS & TUMER desenvolveram as primeiras soluções anticoagulantes e preservadoras compostas por citrato de sódio e açúcar, tendo capacidade de manter o sangue anticoagulado e fornecer nutrientes necessários para o metabolismo das células durante o período de armazenamento. A seguir, Robertson, em 1918 aperfeiçoou a solução permitindo a preservação do sangue por até 26 dias, foi-se observando a evolução dos estudos e descobertas a respeito da composição do sangue, utilizados nos procedimentos terapêuticos atualmente (AUTHEMENT et al., 1986).

A partir desses avanços, observamos a aparição dos primeiros Bancos de Sangue no mundo, iniciando pelos Estados Unidos. Era finalmente possível coletar o sangue, armazená-lo em um recipiente e preservá-lo por até 21 dias, mantendo suas funções e garantindo uma transfusão com boa qualidade. As transfusões e conseqüentemente as doações foram aumentando, impulsionando novas descobertas, como por exemplo, novos grupos sanguíneos. Até meado do séc. XX, o sangue ainda era armazenado em frascos reutilizáveis, e como o sistema era aberto, a incidência de contaminação era grande (VICENTE *apud* SANTOS, 1991).

As duas guerras mundiais ajudaram no aperfeiçoamento das técnicas de transfusão. Durante a 2ª Guerra Mundial iniciou-se a substituição dos frascos de vidros pelas bolsas plásticas, permitindo a coleta em sistema fechado, impossibilitando o contato do sangue com o ar (HARMENING, 1992). Seguindo com as descobertas importantes, o início do uso das centrifugas para um melhor fracionamento do sangue juntamente com a utilização de bolsas mais aprimoradas, como as bolsas satélites contribuíram para garantia de um sistema de transfusão mais eficaz e seguro. O aumento do tempo de armazenamento, o aprimoramento dos testes pré-transfusionais e a utilização rotineira dos hemocomponentes (plasma, plaquetas, crio-precipitado e albumina) impulsionaram a hemoterapia em meados dos anos 60 (RAZOUK, 2004).

1.2 – A Bolsa Plástica

A Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998, estabelece requisitos mínimos necessários às bolsas plásticas para armazenagem de sangue comercializadas no Brasil – regulamentando e fixando as condições exigíveis de qualidade, além de estabelecer os testes para avaliação e garantia destas condições. Define que, bolsa plástica para coleta e armazenamento de sangue: trata-se de um recipiente completo com o tubo de coleta e agulha, os tubos de saída, as soluções anticoagulantes e/ou preservadoras e os tubos de transferência e recipientes associados, quando existentes podendo ser dupla, tripla ou quádrupla (BRASIL, 1998). Segundo os requisitos na Portaria, as bolsas plásticas devem ser transparentes, incolores, flexíveis, estéreis, apirogênicas, isentas de toxicidade, resistentes nas condições de uso e compatíveis com o conteúdo sob condições normais de estocagem. Devem ser estáveis biológica, química e fisicamente em relação ao seu conteúdo durante o período de validade e não devem permitir a entrada de microorganismos. Na composição do plástico da bolsa, não deve haver liberação de qualquer substância para a solução anticoagulante e ou preservadora, sangue ou componentes, seja por interação química ou dissolução física (BRASIL, 1998).

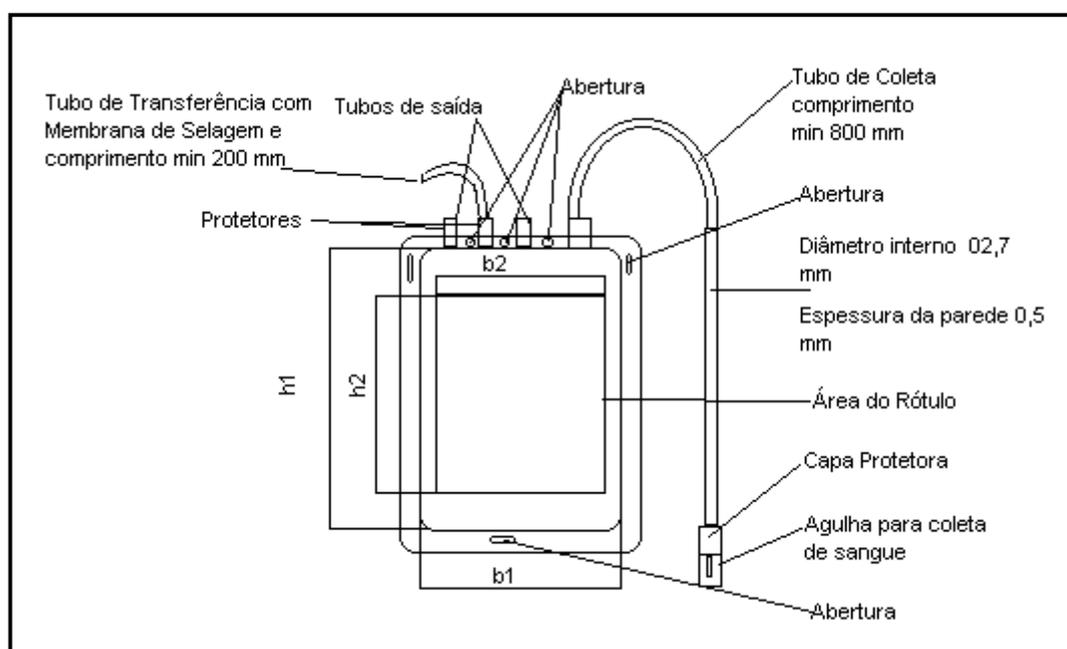


Figura 1: Representação esquemática de bolsa plástica.
(BRASIL, 1998)

1.2.1 – A importância e os tipos de solução anticoagulante usados em bolsa plástica de sangue

Os tipos de bolsa plástica diferem na sua aplicação, no tipo de componente do sangue que irá armazenar e com o tipo de solução anticoagulante e/ou preservadora que ela contém. Desde que a primeira solução preservativa com citrato ácido e dextrose (ACD) foram desenvolvidas, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de desenvolver meios para manter a viabilidade e a capacidade funcional do sangue estocado por longos períodos (BUCHIGNANI, et al. 1998). A estocagem em soluções anticoagulantes tem por objetivo manter a viabilidade e a função de cada constituinte sanguíneo. Além disso, busca prevenir alterações físicas prejudiciais aos seus componentes e evitar a proliferação bacteriana no sangue. A viabilidade do sangue estocado está na dependência da técnica da coleta, do anticoagulante, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos e, inclusive, da frequência de homogeneização durante o armazenamento (WILLER & RIEDESEL, 1985).

Tabela 01: Tipos de solução preservadora de bolsas plásticas e tempo médio de armazenamento.

Tipos de Solução	Composição (bolsa primária)	Tempo de armazenamento (média) (*)
ACD	ácido cítrico, citrato de sódio e glicose.	até 21 dias
CPD	citrato de sódio, ácido cítrico, glicose e fosfato de sódio.	até 21 dias
CPDA	citrato de sódio, ácido cítrico, glicose fosfato de sódio e adenina.	até 35 dias
CPD-SAGM1	citrato de sódio, ácido cítrico, glicose, fosfato de sódio, adenina, cloreto de sódio e manitol	até 42 dias
CPD- SAGM2	citrato de sódio, ácido cítrico, glicose e fosfato de sódio, adenina, cloreto de sódio e manitol	até 42 dias

(*): o tempo de armazenamento apresentado nesta tabela dependerá do tipo de hemocomponente

(Adaptado de Vicente, 2002)

1.2.2 – Bolsas plásticas contendo solução preservadora de adenina

Os tipos de bolsa de sangue analisadas no INCQS e que possuem adenina na sua composição são: CPDA; CPD-SAGM1 e CPD-SAGM2. Segundo a Portaria nº 950/98, os valores encontrados nos ensaios de teor dos componentes realizados nas amostras de soluções anticoagulante e/ou preservadoras, não devem diferir dos especificados na norma vigente conforme 6.2.1 a 6.2.6 do Anexo 1 (BRASIL, 1998).

Dos componentes presentes na solução podemos citar alguns aspectos relevantes para sua utilização (PRO-SANGUE, 2008).

- ♦ Citrato – anticoagulante
- ♦ Ácido cítrico – estabiliza a dextrose
- ♦ Fosfato – previne a redução do pH durante o armazenamento
- ♦ Dextrose – suporte para a formação de ATP
- ♦ Adenina – substrato para produção de ATP pelas hemácias

1.2.3 – A adenina

Investigações realizadas ao longo do tempo têm demonstrado que a suplementação do anticoagulante não é a melhor forma de se preservar eritrócitos. Soluções aditivas são baseadas, de um modo geral, na presença de substratos importantes para o metabolismo dos eritrócitos, na manutenção do pH, dos níveis de ATP e de 2,3 BPG, da morfologia e da viabilidade e no retardamento da hemólise. As soluções aditivas mais empregadas são: SAG, que contém cloreto de sódio, adenina e glicose, SAGM, que além desses compostos contém manitol como inibidor de hemólise (HÖGMAN et al, 1983a).

Essas soluções preservam os eritrócitos viáveis no período de 35 a 42 dias a 4°C, porém só mantêm níveis aceitáveis de 2,3 BPG nas primeiras 2 ou 3 semanas (HEATON et al., 1984).

A adenina é uma das cinco bases nucleicas usadas na formação dos nucleotídeos do DNA e RNA. A adenina forma a adenosina um nucleosídeo quando ligado à ribose, e forma adenosina trifosfato (ATP), quando ligada a três grupos de fosfato, conforme apresentado no esquema a seguir. A ATP é usada no metabolismo celular como um dos métodos básicos de transferir energia química entre reações (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2008).

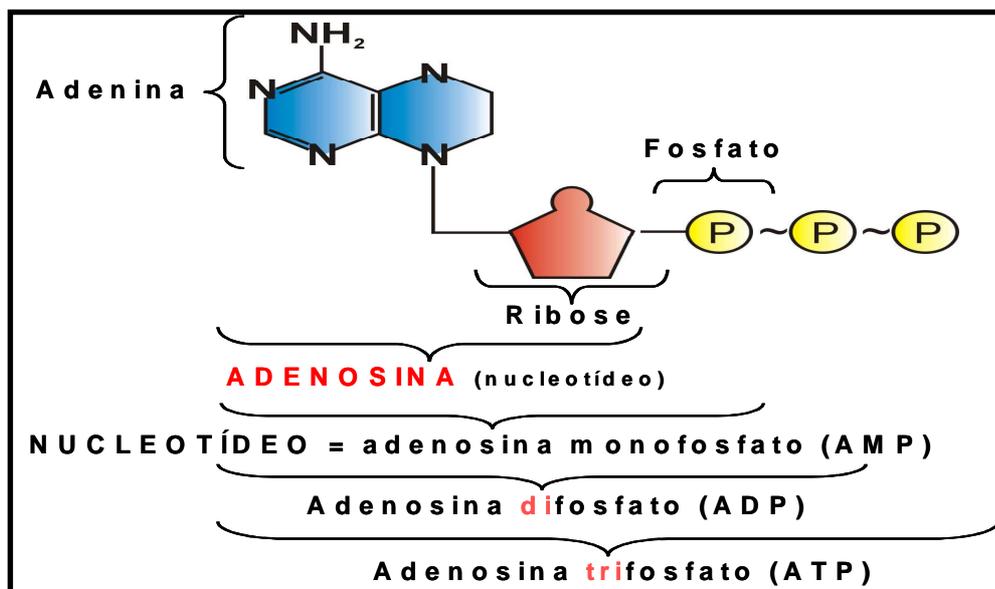


Figura 02: Esquema formação do ATP

(CEC – COC, 2008)

1.2.4 – Metodologia analítica para determinação de doseamento da adenina em solução preservadora

O método utilizado para determinação do teor de adenina indicado no item 6.2.2 e 6.2.3 da Portaria em vigência em (Anexo 1), é o método por cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um dos métodos mais difundidos devido à sensibilidade, facilidade de adaptação para determinações quantitativas, versatilidade para separar espécies voláteis ou termolábeis e capacidade de separar isômeros, além de possibilitar algumas vezes, recuperação das substâncias. De acordo com as características do analito, o fenômeno físico-químico que ocorre pode ser classificado como: cromatografia líquida de adsorção, de partição, de troca iônica ou de permeação em gel (SKOOG, 2002, p. 648).

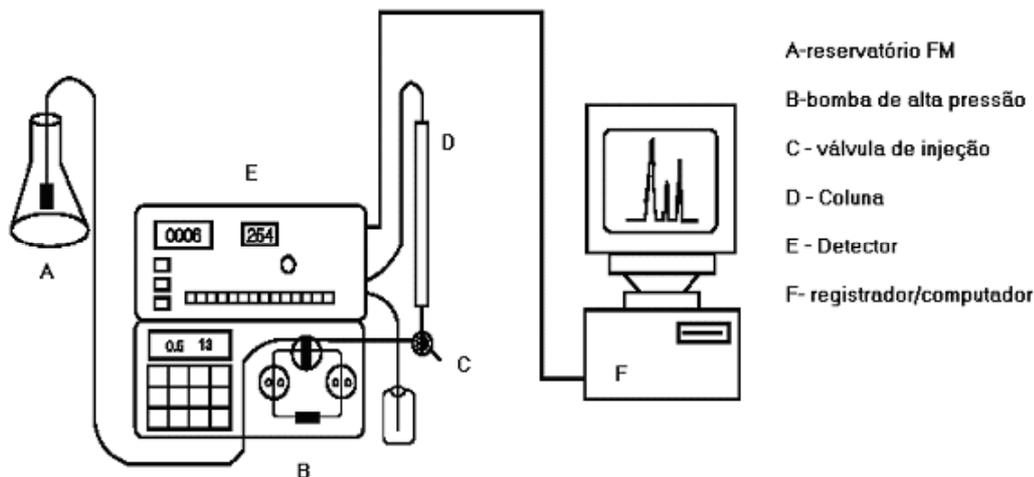


Figura 03: Modelo esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.
(CASS, 1998)

1.2.5 – Adequação do Sistema Cromatográfico

A adequação do sistema é um conjunto de testes aplicados a métodos cromatográficos. Para verificar se os sistemas cromatográficos estão adequados quanto à resolução e a reprodutibilidade são usados vários parâmetros (fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas). Estes testes são baseados no conceito de que equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que devem ser avaliados como um todo (USP 31, 2007).

Parâmetros que indicam uma boa separação cromatográfica:

- Número de pratos teóricos – N – a eficiência da coluna cromatográfica aumenta à medida que o número de pratos teóricos torna-se maior.
- Resolução – fornece uma medida quantitativa da capacidade de separar dois, ou mais, analitos. A resolução para uma dada fase estacionária pode ser melhorada com o alongamento da coluna, aumentado assim o número de pratos teóricos, entretanto, o aumento do número de pratos promove um aumento no tempo para a eluição do analito.
- Fator de Retenção ou fator de capacidade – k – usado para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas

- Fator de Separação - α - de uma coluna é a relação entre a distribuição das espécies mais fortemente retida na coluna e a menos fortemente retidas na coluna.
- Precisão e eficiência são qualidades essenciais para qualquer método analítico de quantificação (SKOOG, 2002).

Os dois parâmetros, precisão e eficiência, são usados para avaliar cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV), detecção essa que se baseia na absorvância de luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda. Dentre as vantagens desta detecção temos: alta absorvância para vários componentes de acordo com o comprimento de onda e, maior sensibilidade; permite maior seletividade, onde o soluto de interesse absorve bastante e também permitiu a obtenção do espectro de absorvância de cada componente em separado após parar a vazão da fase móvel (CASS et al., 2001).

1.3 - O Contexto de Vigilância Sanitária

1.3.1 - Disposições legais

Após a promulgação da Portaria nº 950/98 (DOU - 30/11/98), vários regulamentos técnicos foram elaborados a fim de normatizar os aspectos importantes que envolvem todo o processo de fabricação e controle de qualidade das bolsas plásticas de armazenamento de sangue. A Portaria, por se tratar de um regulamento técnico com especificações para o produto, fixa condições exigíveis para assegurar que a qualidade do sangue e seus componentes sejam mantidos da melhor maneira possível (BRASIL, 1998). Com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999, foi publicada a Resolução nº 9, de 21 de outubro de 1999, que define o Regulamento Técnico para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Bolsas de Sangue, e contém requisitos técnicos e condições necessárias para garantir a qualidade das bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes (BRASIL, 1999).

Com o desenvolvimento de variações deste produto e também com o crescimento dos processos de importação, faz-se necessário à promulgação de um regulamento técnico de BPF específico, para bolsa de sangue.

Em 2001, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 185 de 22/10/01, classificou as bolsas enquanto grau de risco, como Classe III, que é o grupo de produtos com bastante criticidade, entretanto, não revogou a Portaria 950/98, considerando a necessidade da permanência de um regulamento específico para as bolsas de sangue, devido a sua complexidade e criticidade (BRASIL, 2001).

1.3.2 - O INCQS e o controle de qualidade de bolsas de sangue

O INCQS é uma unidade da Fiocruz que atua em áreas de ensino, de pesquisa e tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Age em cooperação com a ANVISA, com Secretarias estaduais e municipais de Saúde, entre outros parceiros (INCQS, 2008).

A fiscalização sanitária apoia-se no laboratório, instrumento fundamental para a avaliação analítica, verificando a conformidade dos produtos com normas sanitárias (SILVA, 2000).

A legislação estabelece as modalidades de análise, sendo elas, a análise fiscal, análise de controle e análise prévia. As análises, que devem ser realizadas em laboratórios oficiais, necessitam de laboratórios ágeis, modernos e equipados *pari passu* com o desenvolvimento científico e tecnológico do seu campo de ação (BRASIL, 1977)a.

O laboratório integra, portanto, a estrutura da Vigilância Sanitária; sem o qual não haveria ações consistentes, especialmente no controle sanitário de produtos. O laboratório central de referência no país é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que, tecnicamente, é vinculado à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e, administrativamente, à estrutura da Fundação Oswaldo Cruz. O INCQS tem o papel de fornecer padrões de referência e métodos de análise de produtos, bem como procedimentos “amostrais” para servir de parâmetro aos demais laboratórios oficiais que integram a rede laboratorial de apoio às ações de Vigilância Sanitária (ROSENBERG, 2001).

O INCQS é o único laboratório no Brasil que realiza análises que verificam a qualidade das bolsas de sangue do País, e que fazem parte de programa do Ministério da Saúde (MS). As análises, em geral, representam um conjunto de

procedimentos ou ensaios realizados pelo INCQS, para se verificar a qualidade de insumos, produtos, ambientes ou mesmo serviços sujeitos à vigilância sanitária. Essas análises podem ser de diversos tipos: por exemplo, quanto ao enfoque técnico, podem ser microbiológicas, químicas, toxicológicas, imunobiológicas, ou quanto à modalidade legal, podem ainda ser de caráter fiscal, de controle ou prévia (BRASIL, 1977)a.

Toda essa atividade é subdividida e coordenada por grupos técnicos (GTs), que distribuem as amostras pelos diferentes laboratórios dos Departamentos de Química, Microbiologia, Farmacologia e Toxicologia e Imunologia, de acordo com as análises a serem realizadas e como podem ser melhor observadas na figura 4, que apresenta os departamentos técnicos que permeiam cada GT específico. Os GTs desempenham também importante papel na formulação de propostas de alteração da legislação, na proposição de linhas de pesquisa, no desenvolvimento tecnológico e na promoção e organização de eventos (tais como congressos, simpósios, oficinas, dentre outros).

No caso das Bolsas de sangue, o GT que coordena as análises no INCQS é o GT-AIS (Grupo Técnico Artigo e Insumos de Saúde), distribuindo as amostras que são analisadas nos Departamentos de Química, Microbiologia e Toxicologia, também conforme a figura 4.

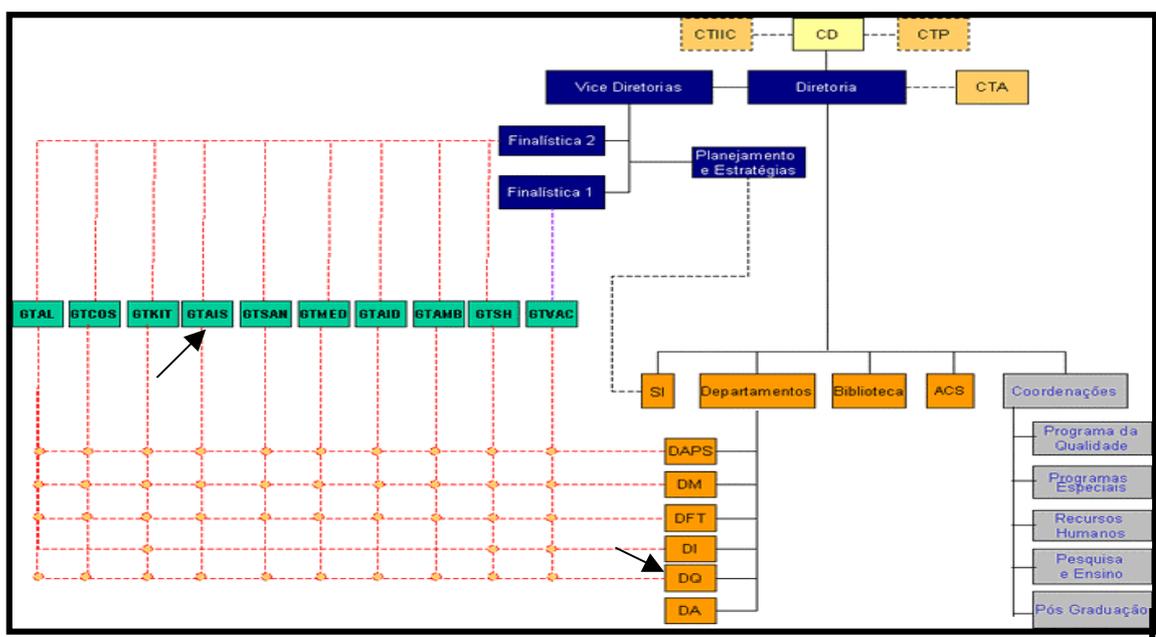


Figura 04: Organograma do INCQS-Destaque para departamentos técnicos que apresentam interface com o GT-AIS quando da análise de bolsas plásticas de sangue.

(Adaptado de INCQS, 2008)

O Programa de Bolsa de Sangue é uma proposta que envolve os entes do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, incluindo o INCQS. Neste programa está inserida a atualização do Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes de Sangue, de 26/11/98.

O LBAIS (Laboratório de Biológicos e Insumos de Saúde) é o laboratório do departamento de química (DQ) que realiza as análises físico-químicas da bolsa de sangue. A maior incidência de análise de bolsa de sangue é na modalidade do tipo prévia, realizada durante o processo de registro, sendo obrigatória para este produto ou para qualquer outro, que contenha bolsas de armazenamento (kits de aférese, bolsas de cordão umbilical ou utilizadas para criopreservação de células), segundo a Lei 6360 de 1976 e ainda pelo Art 3.º, inciso XXXIII do Decreto, n.º 79094/77 que a regulamenta, que preconiza que esta análise deve ser efetuada em determinados produtos sob o regime de Vigilância Sanitária, a fim de ser verificado se os mesmos podem ser objeto de registro (BRASIL, 1976 & BRASIL 1977a).

As análises nas modalidades fiscais e de controle também compõem processos que seguem o mesmo fluxo interno, sendo cadastradas pela Sala de amostras e distribuídas segundo orientação da coordenação do GT específico.

O encaminhamento do Laudo Final de análise, referente à análise prévia, difere das demais, pois neste, a empresa receberá uma das cópias, e a ANVISA a outra para compor o futuro processo de registro, enquanto nas análises de controle e fiscal, receberão cópias o solicitante, seja ele uma Vigilância Municipal ou Estadual, a Vigilância onde a empresa se encontra instalada, além do coordenador do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA (INCQS, 2008 & POP 65.1101-004).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Desenvolver nova metodologia analítica para doseamento de adenina em solução preservadora de bolsa plástica de sangue e propor sua implementação na Portaria nº 950/98.

2.2 - Objetivos específicos

- Avaliar dados do SGA (Sistema de Gerenciamento de Amostras) quanto ao ensaio de teor de adenina e o impacto no Programa de Bolsa de Sangue
- Avaliar criticamente metodologia analítica para adenina preconizada em compêndio oficial e legislação vigente
- Desenvolver nova metodologia para o teor de adenina a partir da anterior superando seus pontos críticos
- Validar nova metodologia e propor sua implementação na revisão da Portaria nº 950/98.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Avaliação de dados

Realizou-se um levantamento dos dados resultantes das análises em amostras de bolsa de sangue analisadas no LBAIS, através do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA) do INCQS. Utilizou-se como filtro a data de entrada das amostras, definindo-se o período de 2000 a 2007. E ainda uma avaliação final quanto à satisfatoriedade das mesmas, verificando as amostras que apresentaram resultados insatisfatórios quanto ao ensaio de teor de adenina quantificados por ano e comparado a outros ensaios.

3.2 - Avaliação crítica do ensaio preconizado na legislação vigente

O método descrito pela Farmacopéia Americana (USP 31), para doseamento de teor de adenina preconiza os seguintes parâmetros:

- Fase móvel → dihidrogênio fosfato de amônia em água e ácido acético glacial
- Solvente → ácido clorídrico diluído (1 em 120)
- Coluna → aço inox de 30 cm com diâmetro interno de 4 mm contendo fase estacionária **L9**
- Detecção → UV em 254nm
- Fase estacionária **L9** → gel de sílica totalmente poroso, irregular ou esférico, com fase quimicamente ligada de troca catiônica fortemente ácida com diâmetro de 3 a 10 mm

Tentativas de reprodução deste método com as colunas de troca catiônica, fortemente ácida disponíveis no Laboratório* (LBAIS) não levaram a bons resultados na eluição da adenina com a fase móvel e nas condições preconizadas pelo método. Diante do fato foi proposto o método alternativo descrito na Portaria nº 950 de 26 de novembro de 1998 (Anexo 1).

*Laboratórios de Órgãos públicos possuem dificuldades em adquirir colunas, face burocracia e falta de recursos.

Na avaliação do método alternativo indicado pela Portaria nº 950/98, foram pontuados parâmetros do ensaio que deveriam ser alterados ou ajustados, já que apontaram dificuldades de reprodutibilidade, conforme tabela abaixo:

Tabela 02: Avaliação crítica dos parâmetros do ensaio alternativo da portaria nº 950/98.

Pontos críticos	Impactos nos resultados
Utilização do ácido fosfórico	Como coluna C-18, ocorrência de hidrólise da fase estacionária → menor vida útil da coluna.
Solvente para adenina	HCl: Solvente corrosivo utilizado para solubilização dos padrões → menor vida útil da coluna.
Comprimento de onda	Comprimento de onda baixo; para análise também de ácido cítrico → menor sensibilidade
Reprodutibilidade dos resultados adenina + citrato	Produtos de degradação (oriundos da esterilização das bolsas. Eluem na mesma faixa de tempo de retenção e piora a resolução).

No que se refere à avaliação da Portaria 950/98, o INCQS, especificamente o DQ, realizou a análise do regulamento no Anexo 6, item 6.2.3.2 (Anexo 1), onde estão descritas as metodologias para determinação das concentrações das substâncias da solução anticoagulante e/ou preservadora de bolsa de sangue.

3.3 - Desenvolvimento de metodologia analítica para adenina

O desenvolvimento de nova metodologia analítica para determinação do teor de adenina na solução anticoagulante e/ou preservadora para bolsa de sangue analisadas no LBAIS do INCQS, utilizou dados da análise crítica do ensaio da Farmacopéia Americana, até então utilizado. O método foi desenvolvido no período de fevereiro a junho de 2008.

A partir das condições pré-estabelecidas verificou-se pontualmente a solubilidade, a fase móvel e a determinação do comprimento de onda máximo, para que com esses resultados pudessem ser sugeridos ajustes ou alterações metodológicas.

3.3.1 - Solubilidade da adenina

No método indicado pela Portaria, o solvente utilizado para a solubilização da adenina é o ácido clorídrico 1%. Devido à corrosividade do ácido clorídrico, observado na análise crítica do ensaio (Tabela 3), descrito na Portaria 950/98, foram realizados vários testes, para verificar a possível substituição do ácido clorídrico pelo ácido acético glacial (Grau HPLC), para aumentar a vida útil da coluna.

Os testes foram realizados modificando também as concentrações do ácido acético glacial, tentando reduzir ao máximo a concentração necessária.

- Etapas: Foram comparadas as soluções e concentrações
 1. ácido clorídrico 1%
 2. ácido acético puro
 3. ácido acético 1:1

3.3.2 - Modificações para ajuste da fase móvel

Os reagentes utilizados atualmente e importantes na geração deste sinal são: ácido fosfórico e heptano sulfonato de sódio.

Alternativa proposta

- Alterar a utilização do ácido fosfórico, para o ácido acético
- Quantidade de heptano sulfonato de sódio
- Quantidade de acetato de amônio

Tabela 03: Variações de concentrações de reagentes na fase móvel

ácido acético (%v/v)	heptano sulfonato (mg/L)	acetato de amônia (mg/L)	triethyl amina (%v/v)
1	50	-	-
5	50	-	-
1	50	50	-
5	50	50	-
3	50	-	-
3	50	100	-
3	50	200	-
3	50	300	-
3	50	150	-
3	100	150	-
3	50	200	-
3	-	-	0,2
3	-	-	0,4

3	-	-	0,6
3	-	-	1,2
3	50	-	0,2
3	50	-	0,4

3.3.3 - Determinação do comprimento de onda máximo

Para obtenção do comprimento de onda máximo ideal para calcular a concentração da amostra frente à concentração do padrão da adenina, foi realizada uma varredura no equipamento utilizado, cromatógrafo líquido, utilizando um recurso do detector de ultravioleta. Encheu-se a célula com a adenina solubilizada nas condições de análise proposta no item 3.3.2, acionando o comando “scan”.

3.4 – Descrição do procedimento adotado no preparo de padrões e de amostras

As soluções padrão foram obtidas por uma seqüência de diluições. A solução mãe é preparada pela dissolução de pesada de adenina em 10 mL de solvente e posterior diluição com água para 100 mL. Os padrões diluídos foram preparados pela diluição de alíquotas da solução mãe correspondentes a 2, 3, 4 e 5 mL para 100 mL e uma de alíquota de 3 mL para 50 mL com a fase móvel.

A solução amostra foi preparada pela diluição em triplicata de alíquotas de 5 mL para 50 mL com a fase móvel.

3.5 – Sistematização de dados

Para sistematização dos dados relativos às análises laboratoriais, foi utilizado o programa EXCEL, versão Windows XP.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação de dados do SGA

4.1.1 - Quanto à satisfatoriedade das amostras no período de 2000 a 2007.

Após busca dos dados no SGA referentes aos processos de Bolsas de Sangue no período de 2000 a 2007 observou-se que 279 amostras foram analisadas, e que para 80, foram liberados laudos insatisfatórios.

E importante destacar que não foram avaliadas amostras canceladas no sistema pela coordenação do GT, ou seja, produtos que deram entrada na sala de amostras foram cadastrados no SGA, e que por algum motivo não foram distribuídas para análise, já que, a caracterização ou avaliação de condições ou regras para esta decisão não estava nos objetivos deste estudo.

A definição do problema é o primeiro passo e um dos mais difíceis, pois se deve escolher a questão a ser respondida. No caso do desenvolvimento de nova proposta de metodologia analítica para o doseamento de adenina em Bolsas de Sangue foi imprescindível avaliar dados anteriores e perceber, conforme apresentado acima, a relevância e o impacto dos ensaios envolvidos neste produto de alta criticidade e risco, conforme Resolução RDC 185 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001).

Observando cerca de 29% de resultados insatisfatórios no período de estudo, o produto “bolsa de sangue” e todos os ensaios relacionados à qualidade foram priorizados pelo LBAIS e apresentados ao GT-AIS para discussão.

Os ensaios de doseamento da solução conservadora foram priorizados quanto à revisão da metodologia até então empregada e também quanto às validações pendentes.

4.1.2 - Quanto à insatisfatoriedade no ensaio de adenina

Segundo REIS, CICONELLI e FALOPPA, 2002, o desafio em formular um estudo não está baseado somente nas incertezas sobre o assunto, mas também na escolha de uma questão importante que possa ser transformada numa pesquisa possível de ser realizada e que seja válida.

As incertezas estavam sendo observadas para o ensaio da adenina, principalmente no que se refere ao desgaste da coluna, entretanto, conhecer o percentual de resultados insatisfatórios no período de 2000 a 2007, especificamente, para o teor de adenina nas soluções conservadoras de bolsas de sangue, cerca de 24%, conforme gráfico abaixo (figura 05), impulsionou a avaliação crítica do ensaio preconizado em legislação vigente.

Além disso, determinou-se que era viável tecnicamente avaliar e desenvolver nova metodologia e que certamente seria muito válido e traria economia à instituição, se reproduzível, seguro e eficaz ao final.

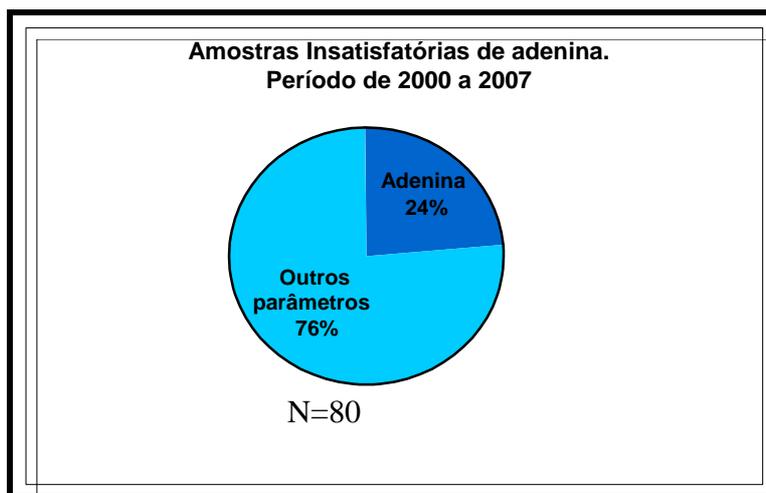


Figura 05: Gráfico do percentual de amostras insatisfatórias quanto ao ensaio da adenina

A motivação para o desenvolvimento da metodologia proposta no item 3.3 página 16, surgiu também devido à dificuldade observada no atendimento a alguns requisitos técnicos da norma NBR ISO/IEC 17025, em especial o que fala sobre a garantia de resultados, no momento desta avaliação, ou melhor, antes do desenvolvimento da nova metodologia, e o que também foi apontado por SANTOS e OLIVEIRA em 2004, quando discutiram em um artigo apresentado no Metrosul sobre “Garantia da Qualidade de Resultados de Ensaio e Calibração”.

4.2- Resultado da avaliação crítica da legislação vigente

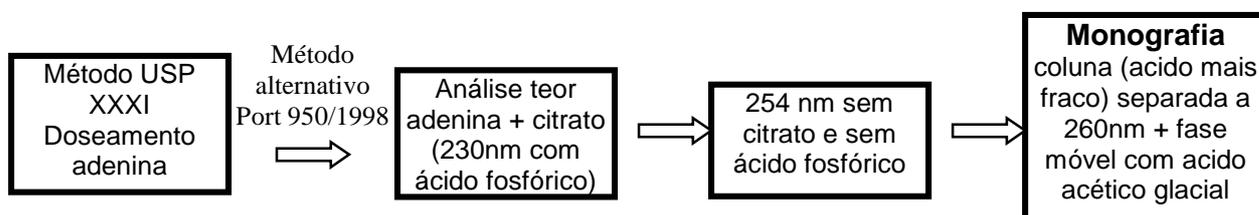
Conforme SANTOS E OLIVEIRA, no trabalho desenvolvido em 2004, observamos que para a metodologia de adenina, havia a necessidade de avaliar, desenvolver e aplicar uma nova metodologia e esta observação permitiu desenvolver o senso de análise crítica no pessoal técnico envolvido, assim como desenvolveu senso de análise crítica para os autores citados, e, por conseguinte, ao LBAIS, a necessidade de reavaliar a legislação vigente e também o compêndio oficial que continha o ensaio.

Para o Compêndio Oficial, citado no parágrafo anterior, foram feitas tentativas de reprodução do método preconizado pela USP XXXI, com as colunas de troca catiônica fortemente ácida, disponíveis no Laboratório (LBAIS), para as quais não foram obtidos bons resultados na eluição da adenina com a fase móvel indicada nas condições descritas no método.

Como o método descrito na Portaria nº 950/98 também apresentava problemas na separação dos componentes e na vida útil da coluna, foram propostas etapas seqüenciais em busca de um melhor resultado de análise, a partir do método indicado pela Portaria, conforme figura 06.

O LBAIS realizou uma proposta bem abrangente, como o aperfeiçoamento da metodologia alternativa por cromatografia líquida (CLAE) para os ensaios de teor de adenina e teor de citrato total, que na proposta anterior apresentava uma baixa resolução entre os sinais referentes aos mesmos. Na nova proposta cada substância passa a ser analisada em separado, em metodologia específica onde as propriedades físico-químicas podem ser mais bem exploradas na resolução do cromatograma e na confiabilidade das curvas de concentração obtidas.

E ainda, acreditava-se que com a análise crítica, nova proposta, e conseqüente desenvolvimento de nova metodologia haveria a possibilidade de geração de documento técnico orientativo para ser apresentado pelo INCQS junto à ANVISA, como proposta de alteração da legislação vigente, assim como também pode-se observar como resultado do trabalho de SANTOS E OLIVEIRA, em 2004, quando apresentaram seu modelo de trabalho para outros laboratórios metrológicos.



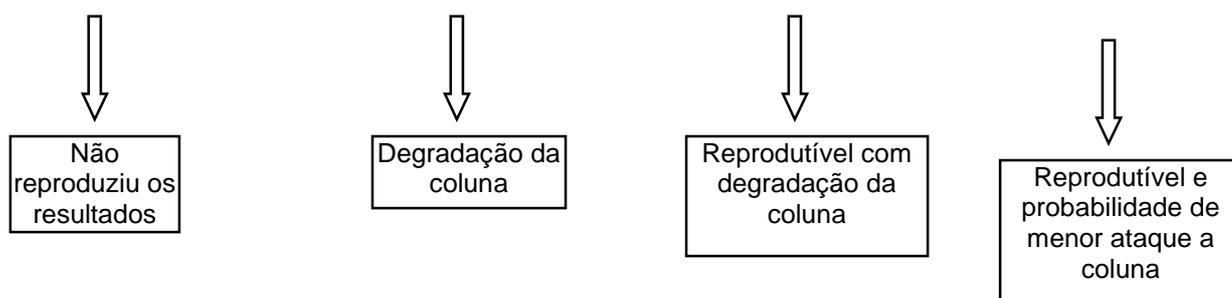


Figura 06: Esquema de avaliação das metodologias analíticas para adenina

Avaliar criticamente a metodologia preconizada pela Portaria 950/1998, desenvolver nova metodologia, e propor alterações ao coordenador do SNVS, a ANVISA, evidencia a importância do INCQS no cenário técnico científico de Vigilância Sanitária no país, principalmente pela inserção de seus técnicos em projetos científicos aplicados à prática laboratorial, possibilitando que propostas técnicas estejam coesas com o papel político da instituição.

4.3- Descrição das etapas de desenvolvimento de metodologia analítica

Em todos os tipos de métodos analíticos validados há requerimentos de pré-validação que precisam estar em conformidade antes de se iniciar o desenvolvimento do método e posteriormente uma boa validação. Alguns itens são de suma importância para a confiabilidade dos resultados, são eles: qualificação analítica do equipamento; conformidade do sistema e, estabilidade das soluções e amostras (PASCHOAL et al, 2007).

A qualificação analítica do equipamento envolve a adequação do mesmo frente aos resultados esperados. Para tanto, este deve estar em boa manutenção e, principalmente, calibrado. Para gerar resultados reprodutíveis e seguros as estabilidades das amostras, dos padrões, dos reagentes e das fases móveis precisam ser avaliadas antes do início do desenvolvimento do método.

Segundo PASCHOAL e colaboradores, em 2007, para o bom desenvolvimento de um determinado método analítico é preciso assegurar que todo o sistema selecionado para o desenvolvimento do processo de análise esteja apto a fornecer resultados com precisão e exatidão aceitáveis e confiáveis. Considerando que esta é a etapa inicial a ser estabelecida, e é obtida para os métodos cromatográficos a partir de testes experimentais de conformidade do sistema, iniciou-se com estas avaliações antes de estabelecer parâmetros definitivos de análise (*system suitability*). Esta etapa inclui avaliação dos seguintes parâmetros:

fator de retenção (k), fator de separação (α), resolução (Rs), número de pratos (N) e fator de assimetria (As).

Na avaliação do método alternativo, Portaria nº 950/98, foram pontuados parâmetros do ensaio que deveriam ser alterados ou ajustados, tais como: maior ataque à coluna devido à corrosividade do solvente para solubilização da adenina e acidez da fase móvel e também a absorção de outros componentes na mesma faixa de tempo de retenção em comprimento de onda baixo.

4.3.1 - Resultados de teste para solubilização da adenina

Diante da ocorrência de degradação da coluna C-18 utilizada na análise da adenina, buscamos encontrar um solvente alternativo para a solubilização do padrão, tendo em vista a elevada acidez e corrosividade do ácido clorídrico.

Realizaram-se testes de solubilização e posteriormente injeções cromatográficas, com o objetivo de comprovar que o ácido acético fornece uma resposta cromatográfica equivalente ao ácido clorídrico.

4.3.1.1 - Baseado na verificação visual

Tabela 04: Tipos de solventes utilizados na verificação da solubilização

SOLVENTE	Solubilidade em condições normais	Solubilidade após ultrassom
HCl 1%	Solúvel	-
Ácido acético (puro)	Parcialmente solúvel	Totalmente solúvel
Ácido acético 1:1 (água)	Parcialmente solúvel	Totalmente solúvel

O ácido acético PA e o diluído após sonificação (uso de ultrassom) apresentaram resultados semelhantes na solubilização da adenina, sendo que o diluído é menos corrosivo.

Conclui-se que o ácido acético diluído (1:1) é perfeitamente aceitável para substituição do ácido clorídrico na solubilização da adenina, além de minimizar a degradação da coluna e aumentar a vida útil da mesma.

4.3.1.2 - Baseado na comparação das áreas obtidas

Foram realizadas duas corridas com cada solvente de diluição da amostra, a primeira com ácido acético (1:1) e a segunda com ácido clorídrico 1%, obtendo-se os seguintes cromatogramas:

1) Cromatograma com a solubilização de ácido acético (1:1)

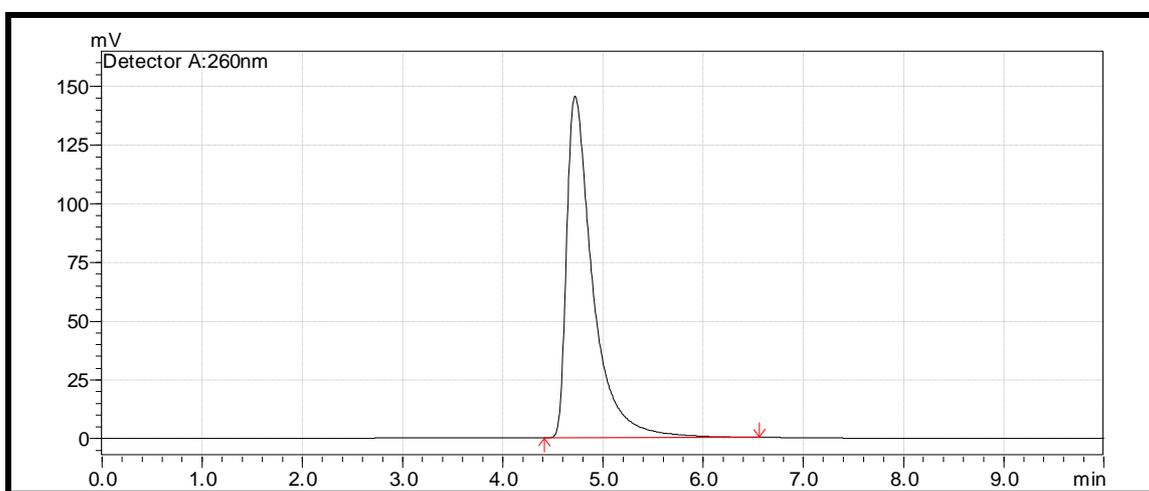


Figura 07: Cromatograma obtido com padrão solubilizado em ácido acético 1:1. Fase móvel contendo 50 mg de heptano sulfonato de sodio, 200 mg de acetato de amônio e de ácido acético 3%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 μ m e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno 40°C.

2) Cromatograma com a solubilização de ácido clorídrico 1%

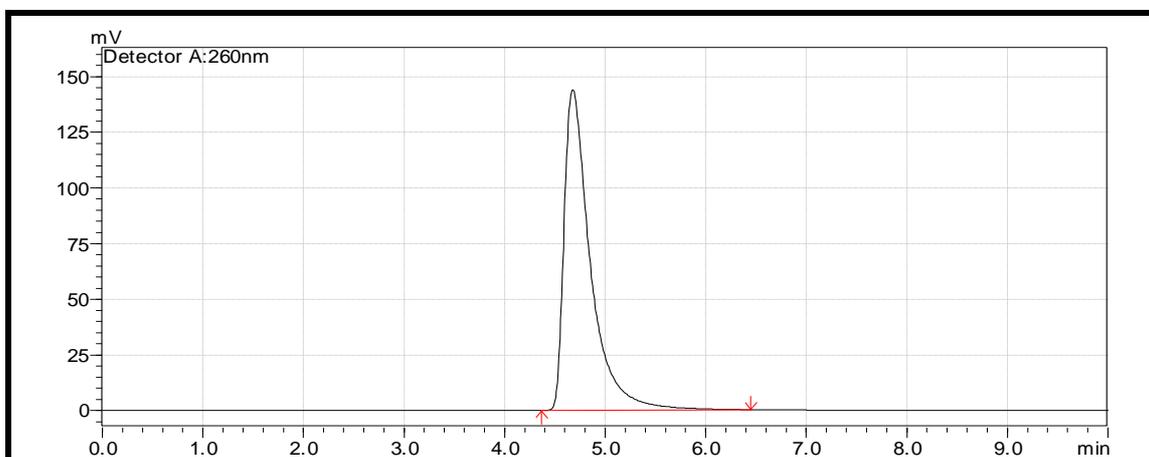


Figura 08: Cromatograma obtido com padrão solubilizado em ácido clorídrico 1% v/v. Fase móvel contendo 50 mg de heptano sulfonato de sódio, 200 mg de acetato de amônio e 30 mL de ácido acético qsp 1000 mL. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno 40°C.

Tabela 05: Comparação das áreas obtidas na solubilização do padrão

Amostra	Solvente	Tr	Área	Altura
SAVA09042008A1	Acido acético 1:1	4.718	2641387	145594
SAVC10042008A2	Acido clorídrico 1%	4.674	2631756	144053

Para avaliação do melhor solvente, realizou-se a solubilização com os três solventes da tabela 04, primeiramente observou-se que, o ácido acético diluído apresentava boa resposta.

Entretanto, fez-se necessário a observação das áreas após solubilização e posterior injeção.

Conforme figuras 7 e 8 pode-se observar que o ácido acético 1:1 foi satisfatório e com isso confirmar que o que foi observado primeiramente visualmente procederia e que poderia ser reproduzido enquanto etapa anterior à futura injeção no novo método, ou seja, no preparo da amostra, com uma maior segurança e à coluna cromatográfica por causa da menor corrosividade.

4.3.2 - Resultados das modificações para ajuste na fase móvel

A proposta de modificação para o ajuste na fase móvel tem o objetivo de otimizar a resposta em forma de largura do sinal obtido na análise cromatográfica. Segundo LANÇAS (2004), a escolha da fase móvel pode ser considerada a etapa mais importante do processo cromatográfico. São as especificidades químicas, neste caso, da fase móvel que irão contribuir e caracterizar o tipo de cromatografia empregada e também, o tipo de interações predominantes no sistema fase estacionária - fase móvel - analito, e ainda, quais as condições ideais para manipular estas interações da melhor forma possível, como gradientes de pressão, temperatura ou composição.

Considerando as especificidades anteriores e o entendimento de uma avaliação cromatográfica, a fase móvel foi selecionada através dos parâmetros

cromatográficos quanto à composição e proporção dos componentes. O ácido fosfórico foi substituído pelo ácido acético glacial contribuindo para uma boa separação dos componentes da amostra (sinal único), com um tempo de retenção intermediário numa faixa de pH menos ácida, e ainda com a vantagem de ser menos corrosivo à coluna C-18.

O método da Portaria vigente utiliza heptano sulfonato de sódio e este foi mantido por apresentar função de formar par iônico com a adenina e interagir com a coluna C-18, possibilitando seu doseamento.

A adição do acetato de amônia melhorou a reprodução do sinal, evitando que o sinal apresente um alargamento de sua base e/ou presença de cauda, aumentando a sua altura.

Tabela 06: Variações de concentrações de reagente na fase móvel e tempo de retenção

ácido acético (%v/v)	heptano sulfonato (mg/L)	acetato de amônia (mg/L)	trietil amina (%v/v)	tempo de retenção / altura do sinal
1	50	-	-	6,4
5	50	-	-	2,9
1	50	50	-	19
5	50	50	-	3,6
3	50	-	-	5,2 / 155
3	50	100	-	5,2 / 157
3	50	200	-	4,7 / 165
3	50	300	-	4,6 / 162
1	50	-	-	10 (40 °C)
1	50	-	-	12 (30 °C)
3	50	150	-	4,9 / 132
3	100	150	-	6,3 / 118
3	50	200	-	4,7 / 143
3	-	-	0,2	2,6 / 207
3	-	-	0,4	2,8 / 214
3	-	-	0,6	3,3 / 184
3	-	-	1,2	4,2 / 92
3	50	-	0,2	3,5 / 165
3	50	-	0,4	3,6 / 132

A tabela (06) sintetiza os resultados dos testes realizados para o ajuste da fase móvel. Nos tópicos 4.3.2.1 a 4.3.2.4, a seguir, especificaremos cada etapa.

4.3.2.1 - Variação na concentração do ácido acético

O parâmetro utilizado para a escolha da concentração ideal foi o faixa de tempo de retenção. Diferentes fases móveis foram preparadas variando-se a concentração de ácido acético frente à presença de heptano sulfonato de sódio e acetato de amônio.

As demais condições de análise - comprimento de onda, temperatura do forno, coluna de separação, volume de injeção e volume de fase móvel – foram mantidas.

Tabela 07: Variações na concentração de ácido acético na fase móvel

ácido acético (%v/v)	heptano sulfonato (mg/L)	acetato de amônia (mg/L)	tempo de retenção
1	50	-	6,4
5	50	-	2,9
1	50	50	19
5	50	50	3,6

Como foi observado na tabela anterior (tabela 06), inicialmente, o ajuste da fase móvel, foi realizado apenas pela presença do heptano sulfonato de sódio, na concentração já utilizada na Portaria, frente a concentrações de 1 e 5%(v/v) de ácido acético. Foi obtido o tempo de retenção muito próximo ao V_0 (saída do solvente) na concentração de 5% e um aumento deste na concentração de 1%. O acréscimo do reagente acetato de amônio na fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio e ácido acético (1 e 5%) alterou o tempo de retenção significativamente para 19 minutos com ácido acético a 1% e para 3,6 minutos com ácido acético a 5% e resultou em cromatogramas de melhor resolução.

Sendo assim, para obter-se um tempo de retenção intermediário ficou definida a concentração de ácido acético correspondente a 3% e passamos para a definição da concentração de acetato de amônia a ser utilizada.

Os cromatogramas obtidos com as variações são os da figura 09 e 12:

1) Cromatograma com fase móvel ácido acético a 1% + heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L

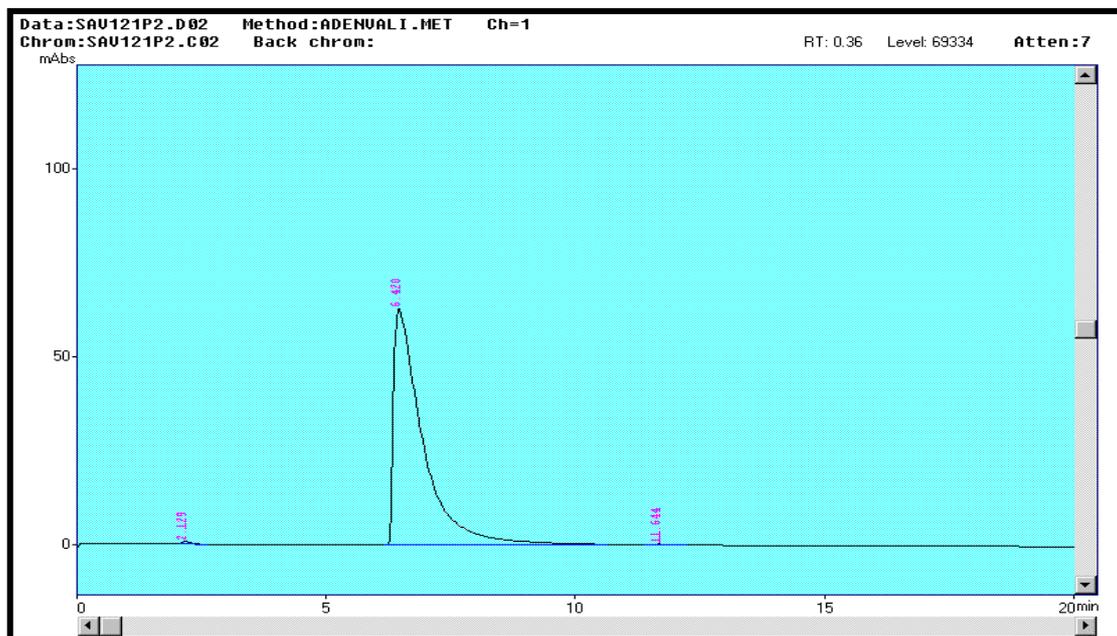


Figura 09: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e ácido acético 1% v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 μ m e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno 40°C.

2) Cromatograma com fase móvel ácido acético a 5% + heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L

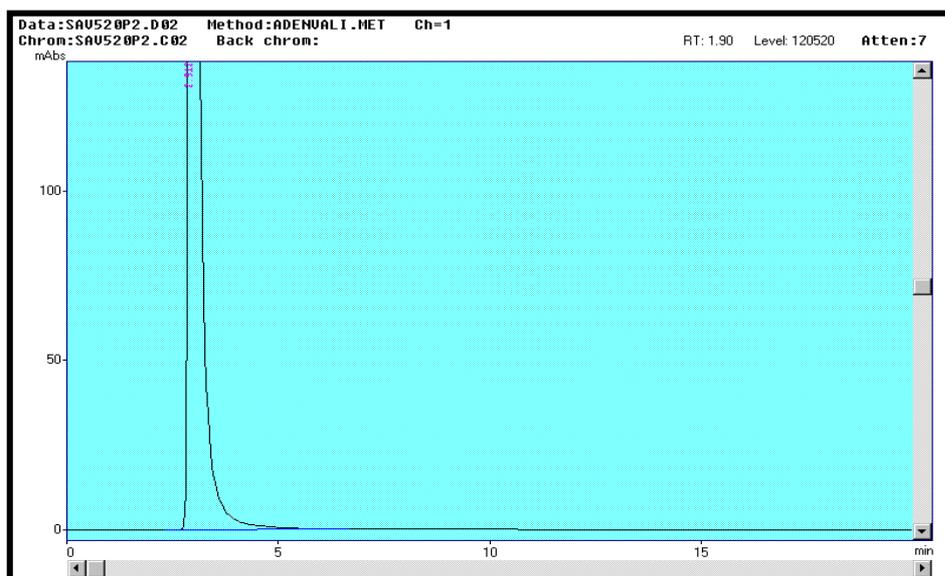


Figura 10: Cromatograma obtido com fase móvel contendo 50 mg/L de heptano sulfonato de sódio e ácido acético 5%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 μ m e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno 40°C.

3) Cromatograma com fase móvel ácido acético 1% + acetato de amônia a 50 mg/L

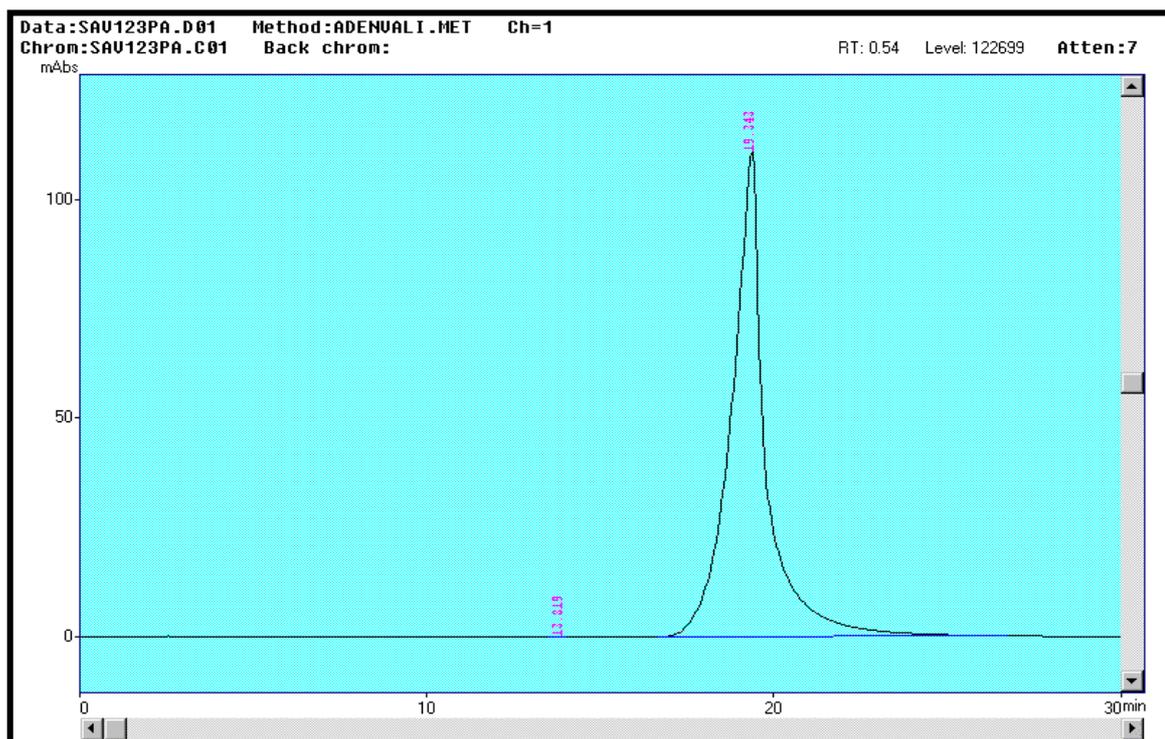


Figura 11: Cromatograma obtido com fase móvel contendo acetato de amônia 50 mg/L e ácido acético 1% v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno 40°C.

4) Cromatograma com fase móvel 5% + acetato de amônia a 50 mg/L

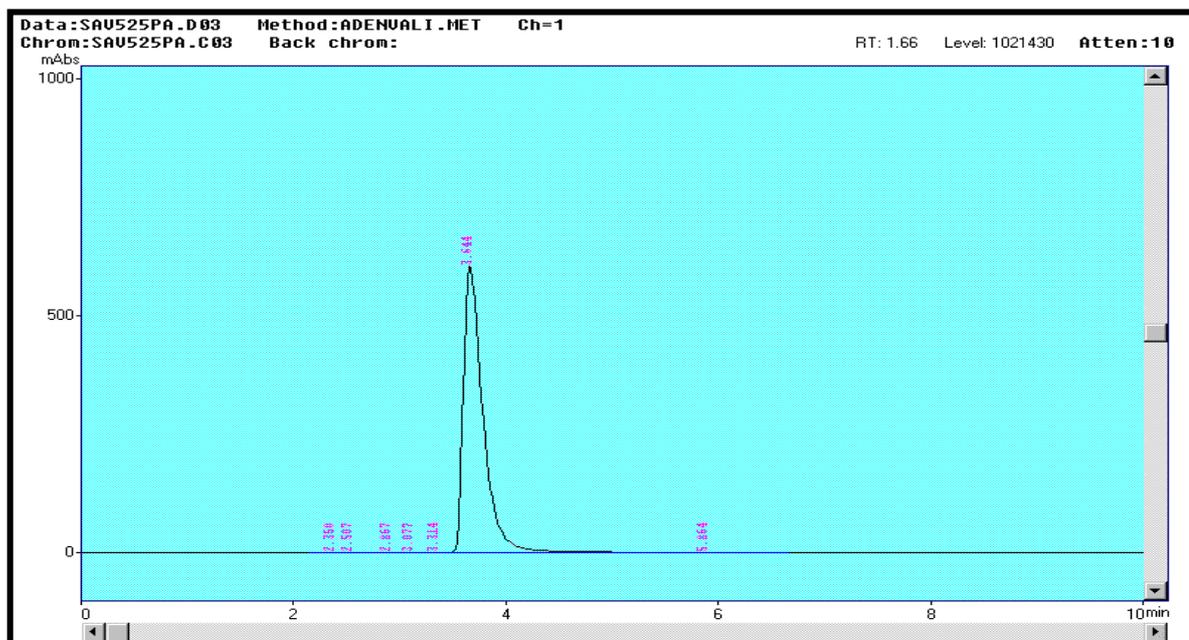


Figura 12: Cromatograma obtido com fase móvel contendo acetato de amônia 50 mg/L e ácido acético 5% (v/v). Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 40°C.

4.3.2.2 - Ajuste da concentração de acetato de amônia

Após estipularmos que a concentração de ácido acético ideal deveria ser 3% testou-se o efeito do acetato de amônio para redução do efeito cauda. Foram mantidas todas as condições de análises alterando apenas a concentração de acetato de amônia.

Tabela 08: Ajuste da adição de acetato de amônia

ácido acético (% v/v)	heptano sulfonato (mg/L)	acetato de amônia (mg/L)	tempo de retenção / altura do pico
3	50	-	5,2 / 155
3	50	100	5,2 / 157
3	50	200	4,7 / 165
3	50	300	4,6 / 162

Obs: O aumento na quantidade de acetato de amônia para 150 mg não forneceu bons resultados, diminuição da altura e alargamento do pico.

Cromatogramas obtidos para o ajuste da adição de acetato de amônio para redução do efeito de cauda:

1) Cromatograma de fase móvel ausente de acetato de amônia

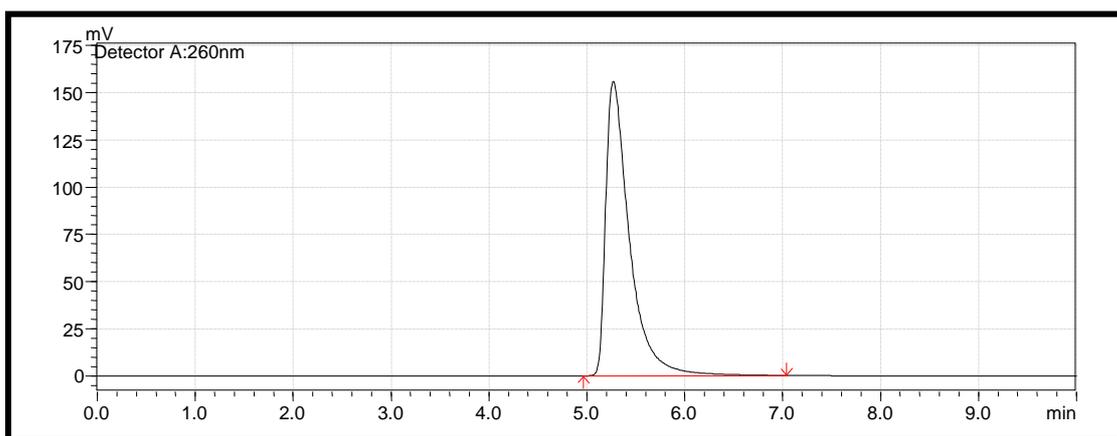


Figura 13: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e ácido acético 3 %v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno de 40°C.

2) Cromatograma de fase móvel com acetato de amônia a 100 mg/L

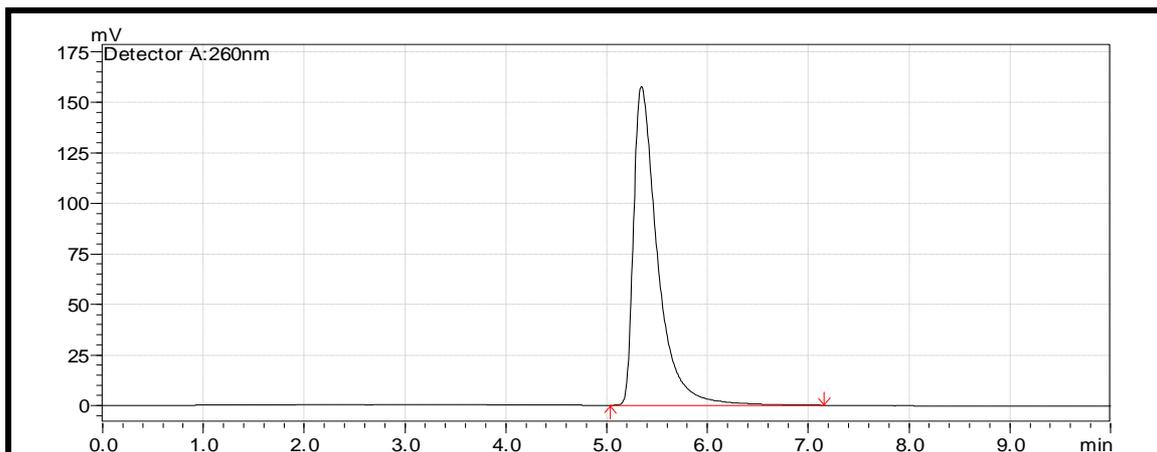


Figura 14: Cromatograma obtido com fase móvel contendo 50 mg/L heptano sulfonato de sódio, 100 mg/L de acetato de amônia e ácido acético 3 %v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 40°C

3) Cromatograma de fase móvel com acetato de amônia a 300 mg/L

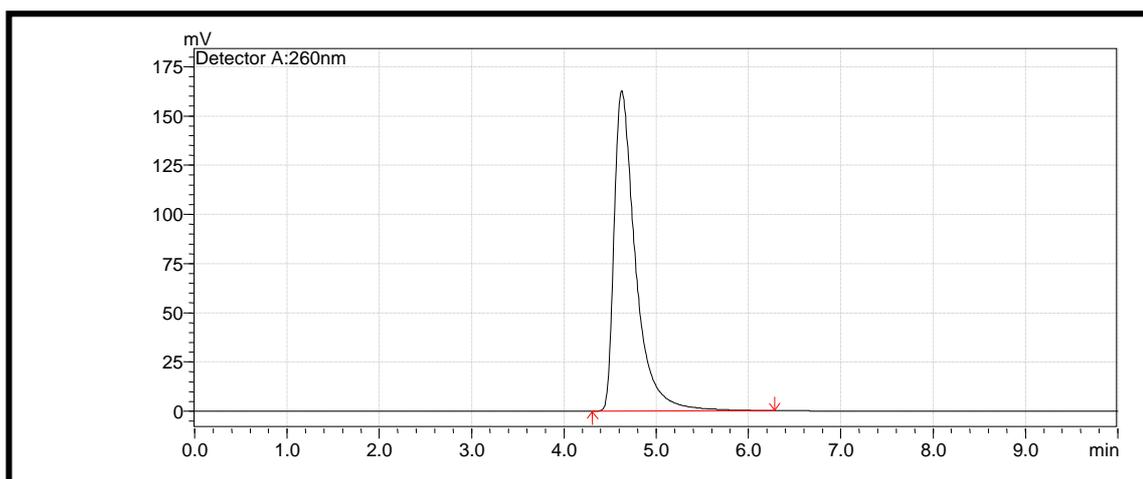


Figura 15: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L, acetato de amônia a 300 mg/L e ácido acético 3% v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção de comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno 40°C.

Após várias comparações observou-se a diminuição do efeito cauda e melhor simetria do sinal obtido. Os resultados obtidos (pureza do pico e resolução) nas condições citadas indicam que o método é capaz de determinar quantitativamente a substância sem interferência de produtos formados (DELAZZERI *et al*, 2005).

Concluindo que seria a fase móvel mais próxima da ideal, as seguintes quantidades e concentrações de reagentes:

Ácido acético glacial – 3% v/v / Heptano sulfonato de sódio - 50 mg/L / Acetato de amônia - 200 mg/L

O que resultou no seguinte cromatograma

4) Cromatograma de fase móvel com acetato de amônia a 200 mg/L

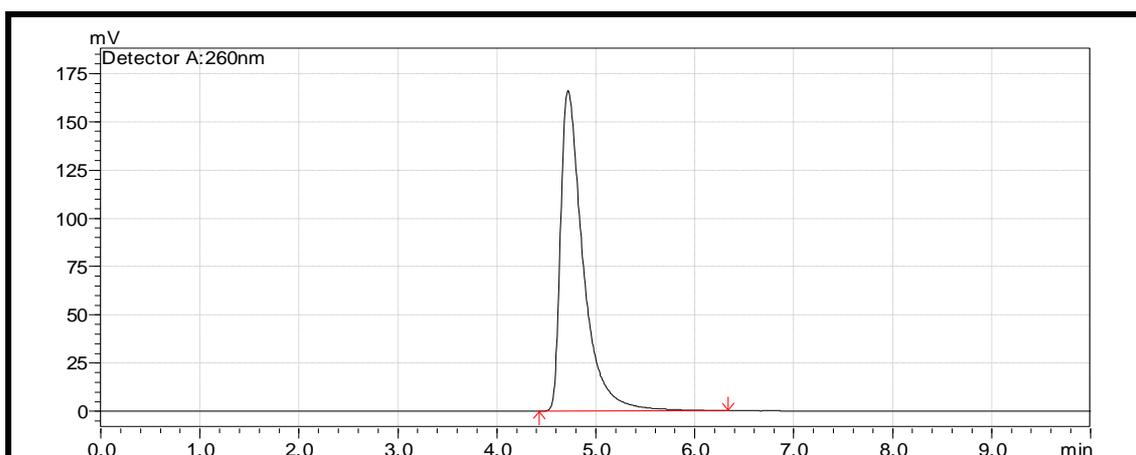


Figura : Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L, acetato de amônia a 200 mg/L e ácido acético a 3% v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 mL/minuto. Temperatura do forno de 40°C.

4.3.2.3 - Cálculo de assimetria (*As*) e Alargamento (*Tf*)

Ambos medem a simetria e as distorções frontais ou posteriores (caudas) de um pico cromatográfico, sendo *As* calculado a 10% da altura e *Tf* calculado a 5% da altura do pico (PASCOAL et al, 2007). Realizado com cromatograma após determinação de λ (comprimento de onda máximo).

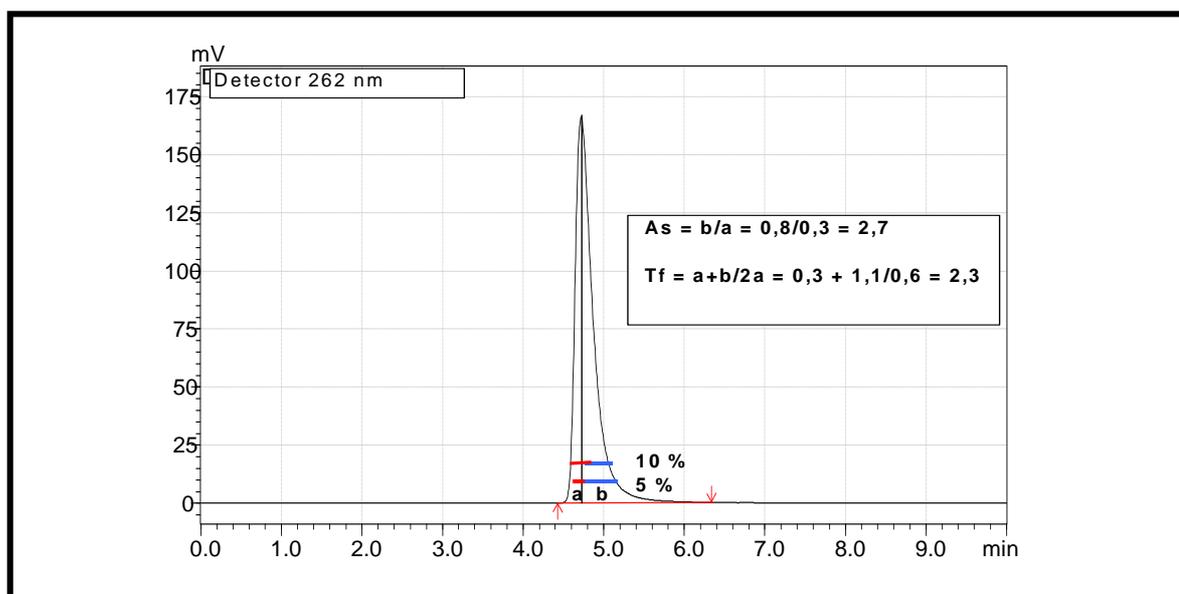


Figura 17: Demonstração do cálculo de assimetria do sinal cromatográfico.

Observou-se que a assimetria do sinal está visualmente mais próxima da ideal que nos cromatogramas anteriores.

4.3.2.4 - Curvas analíticas obtidas com metodologia proposta

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. Segundo RE nº 899, de 29/05/03 da ANVISA a curva de calibração, ou melhor, curva analítica (por se tratar de uma substância), representa a relação entre o sinal (resposta) e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003).

A EC recomenda que cinco níveis de concentração sejam empregados na construção da curva e ainda, estabelece que sejam descritas a faixa de trabalho, a equação matemática e a regressão linear da curva (PASCHOAL *et al*,2007).

A construção da curva analítica é a primeira etapa para a verificação do parâmetro de linearidade, um dos parâmetros para futura validação do método.

Foram realizadas 3 curvas analíticas, utilizando padrão USP de adenina, em 3 dias diferentes, contendo 5 níveis de concentração. As medidas das áreas absolutas obtidas através da análise das soluções foram utilizadas para a construção da curva padrão conforme figuras 18, 19 e 20.

1ª) Valores observados para construção da curva analítica de padrão de adenina 01

02-07-08

Curva dos Padrões de Adenina					
Códigos	C01	C02	Média	conc. (mg/mL)	pesada (mg)
SADE02072008A	2660560	2664922	2662741,0	0,01367	69,1
SADE02072008B	4016546	4021328	4018937,0	0,02051	
SADE02072008C	5333017	5339758	5336387,5	0,02735	Regressão Linear Interseção -17849,5 conc.(g/L) 196216011,8
SADE02072008D	6686163	6686773	6686468,0	0,03418	
SADE02072008E	8044465	8028657	8036561,0	0,04102	

Coluna: Nova-Pack C-18 4 µm (3,9 x 150) mm WAT086344 lote 1117363051 nº 1117363051 38 30

RESUMO

DOS RESULTADOS

Estatística de regressão

R múltiplo	0,999991
R-Quadrado	0,999981
R-quadrado ajustado	0,999975
Erro padrão	10559,47
Observações	5

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação			
Regressão	1	1,8E+13	1,8E+13	161401,6	3,4E-08			
Resíduo	3	3,35E+08	1,12E+08					
Total	4	1,8E+13						
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-17849,5	14167,02	1,2599333	0,2967896	62935,324	27236,324	62935,324	27236,324
conc.(mg/mL)	196216012	488405,44	401,74821	3,401E-08	194661686	197770337	194661686	197770337

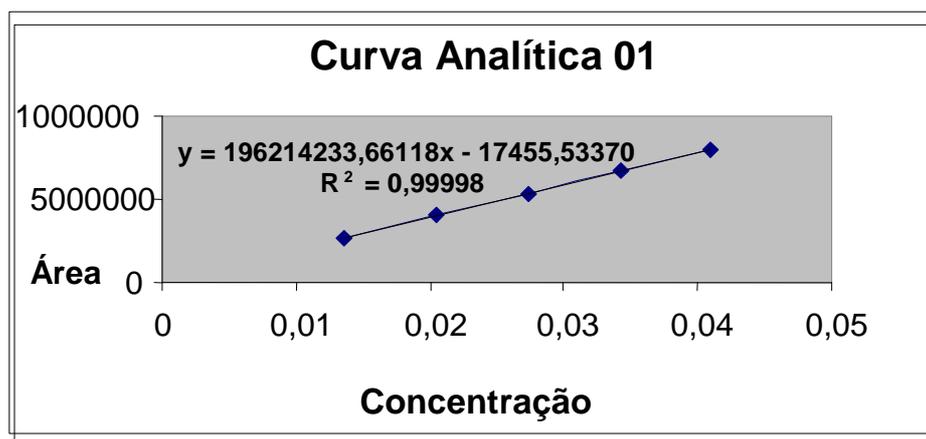


Figura 18: Curva Analítica 01

2ª) Valores observados para construção da curva analítica de padrão de adenina 02

10-07-08

Curva dos Padrões de Adenina					
Códigos	C01	C02	Média	conc. (mg/mL)	pesada (mg)
SADE10072008A	1631506	1626101	1628803,5	0,00833	42,07
SADE10072008B	2448418	2456121	2452269,5	0,01249	Regressão Linear
SADE10072008C	3263292	3255268	3259280,0	0,01666	
SADE10072008D	4084282	4086220	4085251,0	0,02082	Interseção: - 5,691 conc.(g/L): 196343816,1
SADE10072008E	4898875	4903333	4901104,0	0,02499	

Coluna: Nova-Pack C-18 4 µm (3,9 x 150) mm WAT086344 lote 1117363051 nº 1117363051 38 30

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão

R múltiplo	0,999995
R-Quadrado	0,99999
R-quadrado ajustado	0,999987
Erro padrão	4634,457
Observações	5

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação			
Regressão	1	6,69E+12	6,69E+12	311352,3	1,27E-08			
Resíduo	3	64434576	21478192					
Total	4	6,69E+12						
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção conc.	-5691,4	6217,777	-0,91534	0,427509	-25479,2	14096,36	-25479,2	14096,36
(mg/mL)	1,96E+08	351877,2	557,9896	1,27E-08	1,95E+08	1,97E+08	1,95E+08	1,97E+08

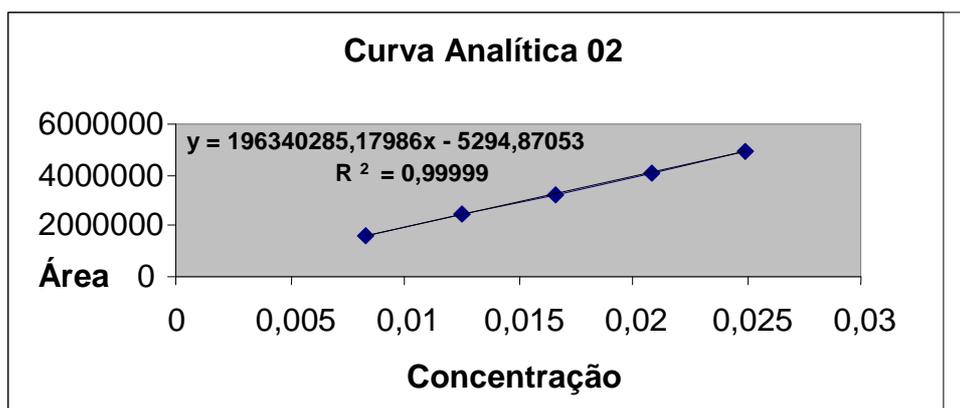


Figura 19: Curva Analítica 02

3ª) Valores observados para construção da curva analítica de padrão de adenina 03

18-11-08

Curva dos Padrões de Adenina					
Códigos	C01	C02	Média	conc. (mg/mL)	pesada (mg)
SADE18112008A	1589994	1569950	1579972,0	0,00832	42,00
SADE18112008B	2409826	2409280	2409553,0	0,01247	Regressão Linear
SADE18112008C	3215882	3221206	3218544,0	0,01663	Interseção
SADE18112008D	4039095	4039665	4039380,0	0,02079	conc.(g/L)
SADE18112008E	4833401	4835247	4834324,0	0,02495	195731866,3

Coluna: Nova-Pack C-18 4 µm (3,9 x 150) mm WAT086344 lote 1117363051 nº 1117363051 38 30

RESUMO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão

R múltiplo	0,999977
R-Quadrado	0,999953
R-quadrado ajustado	0,999938
Erro padrão	10144,51
Observações	5

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação			
Regressão	1	6,62E+12	6,62E+12	64362,02	1,35E-07			
Resíduo	3	3,09E+08	1,03E+08					
Total	4	6,62E+12						
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-39057,8	13610,292	2,8697254	0,0640647	82371,863	4256,2634	82371,863	4256,2634
conc. (mg/mL)	195731866	771519,13	253,69671	1,351E-07	193276546	198187187	193276546	198187187

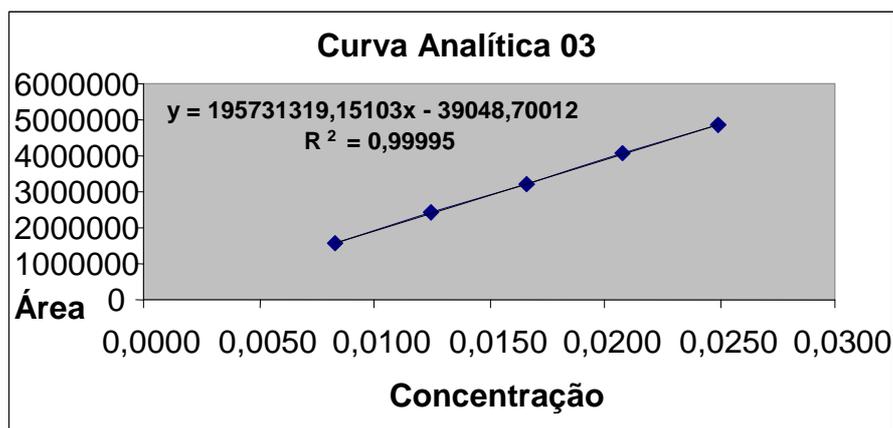


Figura 20: Curva Analítica 03

Obteve-se um coeficiente de correlação (r) de 0,99998 para Curva Analítica nº 1 e de 0,99999 para Curva nº 2 e 0,99995 para Curva nº 3, mostrando a linearidade adequada de resposta da adenina, conforme figuras 18,19 e 20. Os intervalos de concentrações para as soluções foram suficientemente lineares indicando correlação com a reta obtida. Sabe-se que os métodos desenvolvidos na química analítica buscam obter uma relação linear entre um sinal analítico “y” e uma quantidade ou concentração “x”, isto é buscam a linearidade que se trata da capacidade que um método possui em obter sinais analíticos que sejam diretamente proporcionais à concentração ou quantidade do analito na amostra (CARDOSO et al, 2007).

Podemos confirmar que o presente método foi satisfatório para análise de adenina, uma vez que foi realizado paralelamente ao seu padrão.

4.3.2.5 - Outros Testes

I) Iniciando verificação de repetibilidade

Segundo RE nº 899 de 29/08/03 da Anvisa, repetibilidade é um dos parâmetros analíticos necessários a uma validação. Foi realizado um teste no qual iniciou-se o processo de análise comparativa da determinação em triplicata de cada amostra e re-análise da mesma amostra após 04 meses.

Tabela 09: Planilha de demonstração de cálculo do teor de adenina – Análise

Sag-M1 Valor de referência: (0,161 - 0,177) g/L

Análise de Adenina em bolsa de sangue por HPLC utilizado a curva 1							
Amostras		A	B	C	Média	Incerteza	Resultado(g/L)
1486/08	C01	3092108	3064060	3123987			
	C02	3126765	3092889	3124053			
02-07-08	média	3109436,5	3078474,5	3124020			
ADE14862008*	conc. (g/L)	0,15937976	0,1578018	0,160122993	0,159101516	0,002942748	(0,159 ± 0,003)

* A, B, C

Tabela 10: Planilha de demonstração de cálculo do teor de adenina – Re-análise

Análise de Adenina em bolsa de sangue por HPLC utilizando a curva 3							
Amostras		A	B	C	Média	Incerteza	Resultado(g/L)
1486/08	C01	3077463	3110266	3085047			
	C02	3075568	3111132	3082685			
18-11-08	média	3076515,5	3110699	3083866			
ADE14862008*R	conc. (g/L)	0,15917558	0,160922	0,159551118	0,159882906	0,002282217	(0,160 ± 0,002)

* A, B, C

As tabelas nºs 09 e 10 apresentam resultados em triplicata em dois momentos diferentes com intervalo de quatro meses, o que trouxe à nova metodologia variabilidade aceitável, considerando serem os dois resultados independentes, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições.

É importante destacar que, a repetibilidade, como citado na resolução RE nº 899/2003, é um dos parâmetros de validação o que não é objeto do estudo proposto, entretanto, foi realizada para ser utilizada na validação posterior desta metodologia.

Foi verificada a manutenção dos resultados obtidos na primeira análise. Posteriormente, serão realizados testes para comprovar repetibilidade do método.

II) Influência da Temperatura

O método da Portaria utiliza a temperatura de 40°C e resolveu-se testar a temperatura de 30°C para estudar seu efeito.

Para tal estipulou-se que seria utilizada, a fase móvel com ácido acético na concentração de 1% e heptano sulfonato de sódio na concentração utilizada pelo método da Portaria nº 950/98, a condições de análise seriam mantidas e apenas a temperatura seria variada.

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 11 de acordo com os cromatogramas das figuras 21 e 22.

Tabela 11: Verificação da influência da temperatura no sinal obtido.

Temperatura (°C)	Tempo de retenção
40	10
30	12

1) Cromatograma obtido com forno na temperatura de 40° C

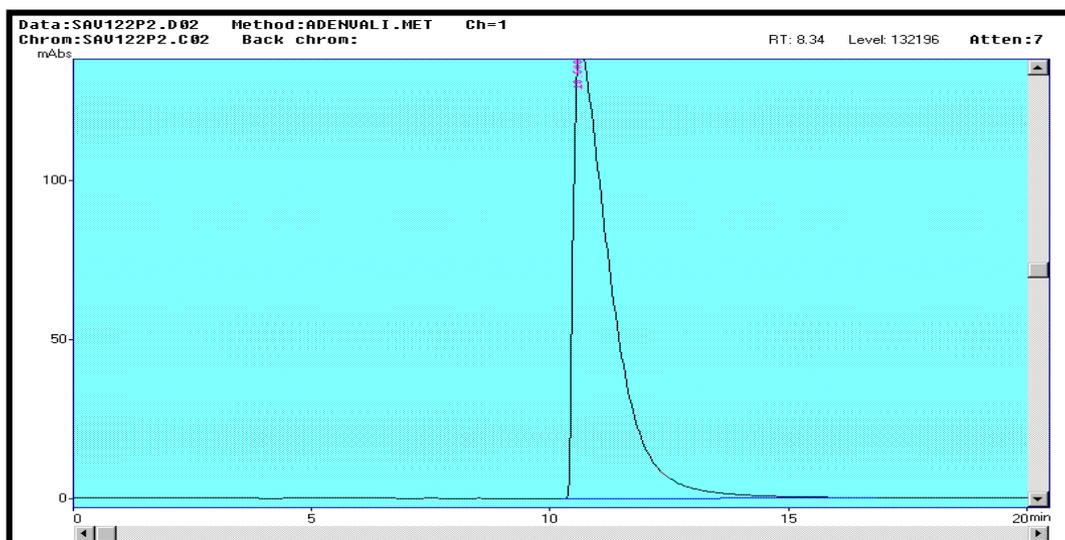


Figura 21: Cromatograma obtido com fase móvel: heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e ácido acético 1%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9x150 mm. Detecção do comprimento onda em 260 nm. Fluxo fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura forno de 40°C.

2) Cromatograma obtido com forno na temperatura de 30° C

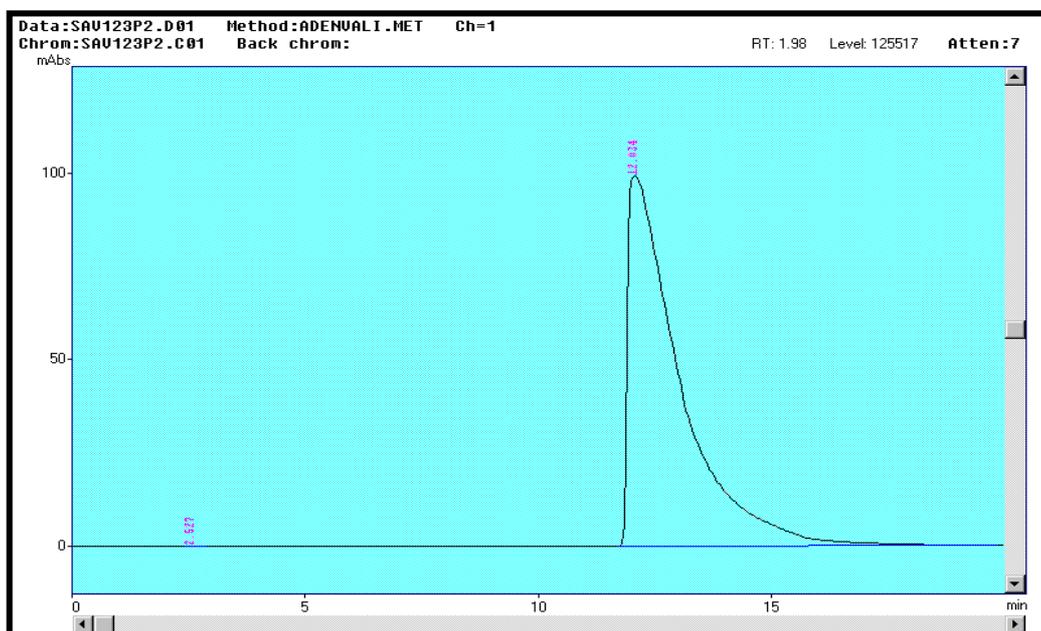


Figura 22: Cromatograma obtido com fase móvel: heptano sulfonato de sódio 50 mg/L e ácido acético 1%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção de comprimento onda em 260 nm. Fluxo fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura forno de 30°C.

A alteração da temperatura para 30°C não promoveu melhoras ao método, já que aumentou o tempo de retenção, o que acarreta maior gasto de material (custo de análise) e maior tempo para do produto. De acordo com com os resultados a

temperatura que oferece melhor resultado é 40° C, pois apresenta melhor tempo de eluição e melhor simetria do pico.

III) Influência da concentração de heptano sulfonato de sódio

Testou-se o comportamento do heptano sulfonato de sódio depois de estabelecida a concentração de ácido acético – 3% v/v e frente ao acetato de amônio na fase móvel, conforme a tabela 12.

Tabela 12: Verificação da influência do heptano sulfonato de sódio

Heptano sulfonato (mg/L)	Acetato de amônia (mg/L)	Tempo de retenção / altura do pico
50	150	4,9 / 132
100	150	6,3 / 118
50	200	4,7 / 143

Abaixo os cromatogramas obtidos na verificação, conforme figuras 23, 24 e 25.

1) Cromatograma de fase móvel com heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L e acetato de amônia a 150 mg/L

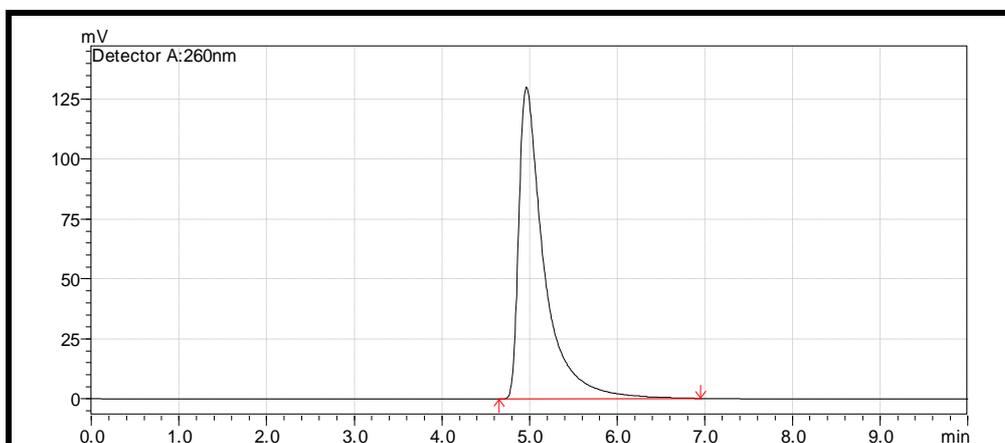


Figura 23: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, acetato de amônia 150 mg/L e ácido acético 3%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 30°C.

2) Cromatograma de fase móvel com heptano sulfonato de sódio a 100 mg/L e acetato de amônia a 150 mg/L

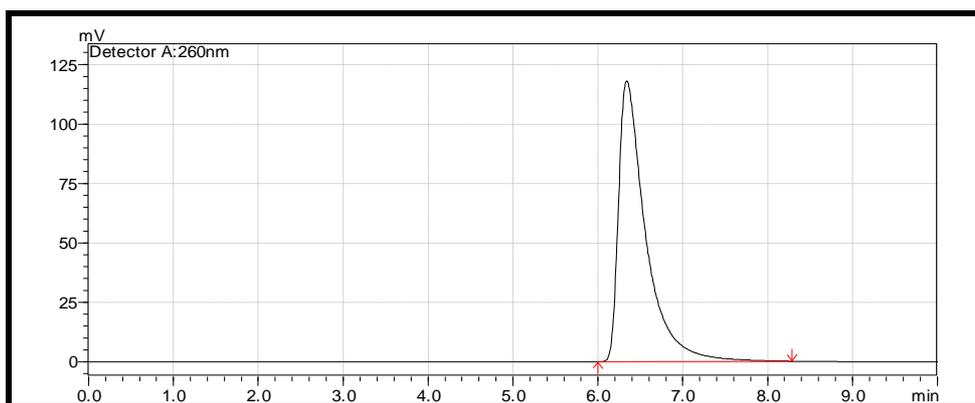


Figura 24: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 100 mg/L, acetato de amônia 150 mg/L e ácido acético 3%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção no comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 30°C.

1) Cromatograma de fase móvel com heptano sulfonato de sódio a 50 mg/L e acetato de amônia a 200 mg/L

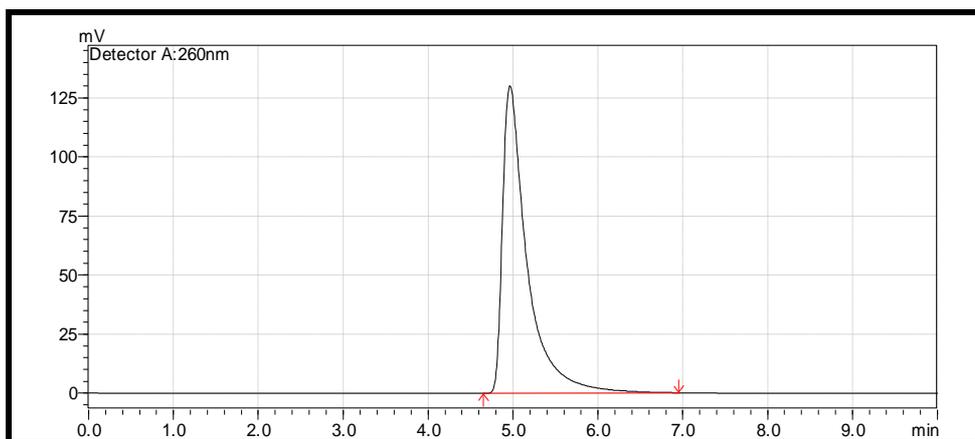


Figura 25: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, acetato de amônio 200 mg/L e ácido acético 3%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção de comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 30°C.

Foi observado que com o aumento da concentração de heptano sulfonato de sódio, o cromatograma apresentava maior tempo de retenção e ainda, apresentava alargamento, o que não representava vantagens ao método.

Entretanto, testar sua concentração foi importante já que se sabe que o heptano sulfonato de sódio é responsável por formar o par iônico com a adenina e conseqüentemente permitir seu doseamento.

Devido à resposta insatisfatória pelo alargamento dos picos, mantivemos a concentração utilizada na Portaria 950/98 – 50 mg/L de heptano sulfonato de sódio.

IV) Efeito da Trietilamina na fase móvel

Para confirmar que o acetato de amônia é o melhor reagente para eliminar o efeito cauda, resolvemos testar sua substituição com a trietilamina, na presença e na ausência de heptano sulfonato de sódio.

Tabela 13: Verificação do efeito da adição da trietilamina na fase móvel

ácido acético (% v/v)	heptano sulfonato (mg/L)	trietilamina (% v/v)	tempo de retenção / altura do sinal
3	-	0,2	2,6 / 207
3	-	0,4	2,8 / 214
3	-	0,6	3,3 / 184
3	-	1,2	4,2 / 92
3	50	0,2	3,5 / 165
3	50	0,4	3,6 / 132

Abaixo apresentamos alguns dos cromatogramas obtidos na verificação.

1) Cromatograma de fase móvel com trietilamina a 0,2% v/v

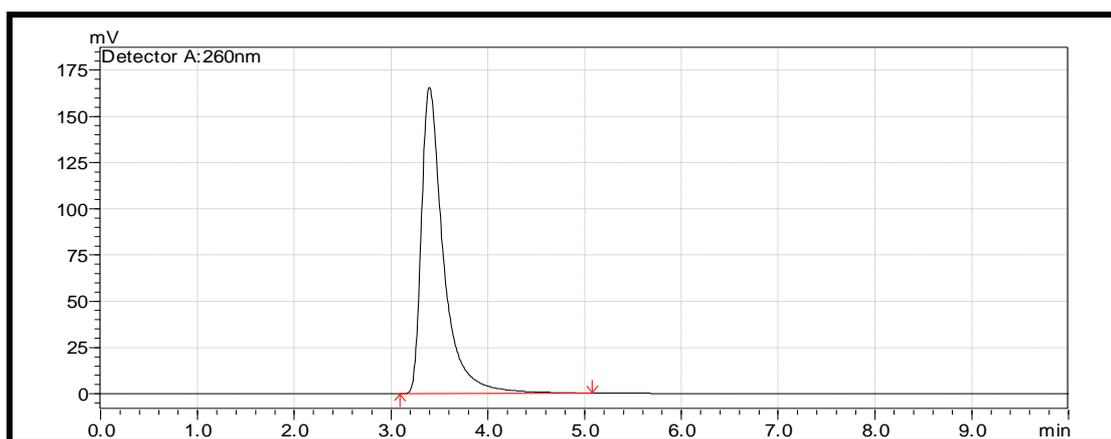


Figura 26: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, trietilamina 0,2%v/v e ácido acético 3%v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 µm e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção de comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 40°C

2) Cromatograma de fase móvel com trietilamina a 0,4% v/v

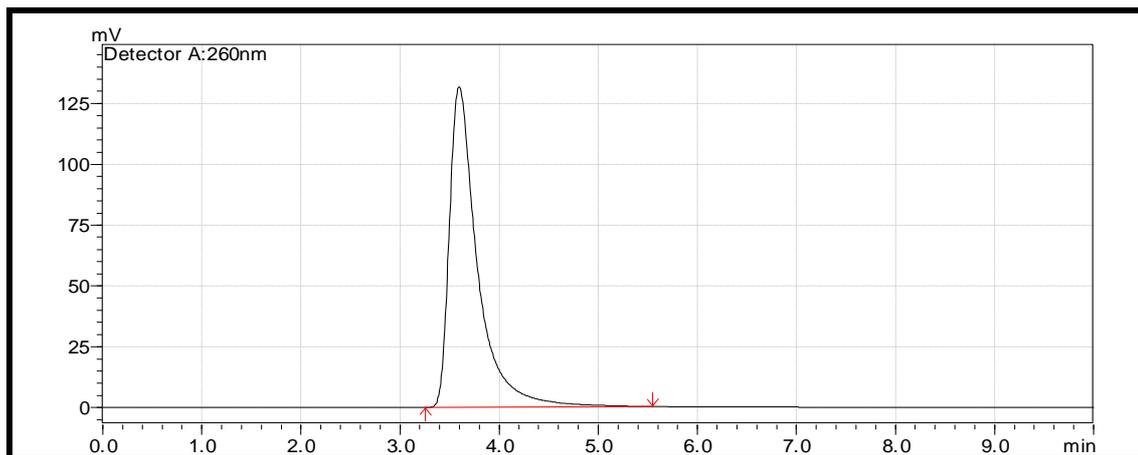


Figura 27: Cromatograma obtido com fase móvel contendo heptano sulfonato de sódio 50 mg/L, trietilamina 0,4%v/v e ácido acético 3% v/v. Coluna Nova-Pack C-18, 4 μ m e tamanho 3,9 x 150 mm. Detecção de comprimento de onda em 260 nm. Fluxo de fase móvel de 0,6 ml/minuto. Temperatura do forno de 40°C.

Resultado: Verificou-se alteração no tempo de retenção, mas não eliminou a cauda.

4.3.3 - Resultado da determinação do comprimento de onda máximo da adenina

Encheu-se a célula com a adenina nas condições de análise (na fase móvel definida acima), acionando o comando “scan”, obteve-se um espectro onde o comprimento de absorção máximo foi em 262 nm.

1) Espectro de absorção máxima da adenina

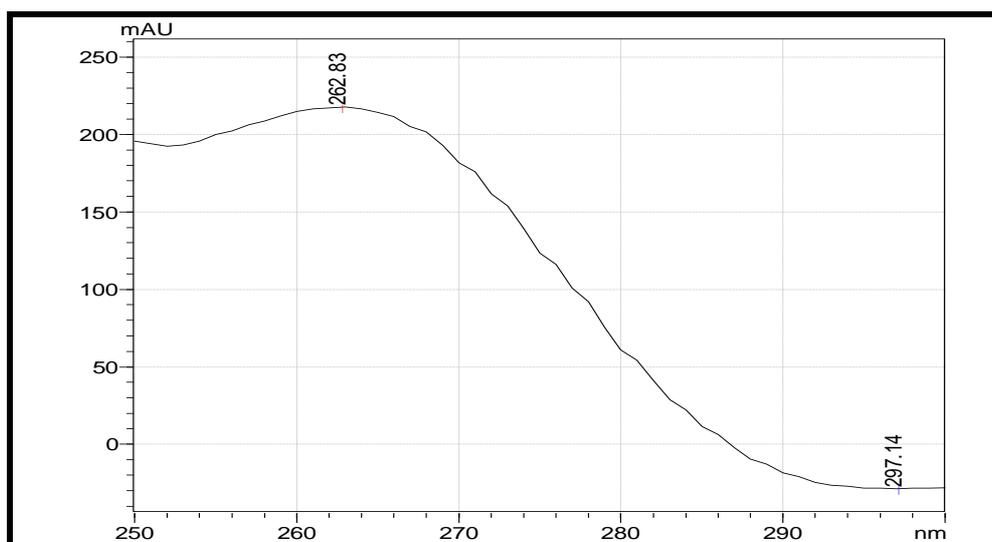


Figura 28: Cromatograma obtido na varredura “Scan” de solução da adenina de 250nm a 300nm.

No comprimento de onda de 262 nm, observa-se a absorção somente da adenina, sem a influência dos produtos de degradação e dos demais componentes da solução anticoagulante e/ou preservadora.

5 - CONCLUSÃO

A avaliação do resultado das análises prévias de bolsas de sangue no período de 2000 a 2007 impulsionou a análise crítica da metodologia para adenina em Bolsa de Sangue preconizada na Portaria nº 950/1998 e implementada no LBAIS/DQ/INCQS.

A metodologia analítica apresentada neste estudo foi desenvolvida a partir desta análise crítica que apresenta como principais vantagens, a melhor solubilização da adenina e a utilização de solvente menos corrosivo, e que dará a coluna cromatográfica uma vida útil maior.

Com esta nova técnica foi possível obter a curva analítica da adenina, e não foi observada a presença de outras substâncias, visto cromatograma com sinal único. Observou-se que o melhor comprimento de onda máximo para a substância é o de 262 nm e a melhor fase móvel é a 15 mL de ácido acético glacial (3%), 25,0 mg de heptano sulfonado de sódio, 100,0 mg de acetato de amônia diluídos em água deionizada para 500 mL, como mostrado nos cromatogramas no desenvolvimento do trabalho.

Além disso, o novo método que mostra-se eficiente para determinação de adenina em soluções conservadoras de Bolsa de Sangue, será posteriormente validado como continuação deste estudo para viabilizar a proposta institucional de substituição da legislação vigente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTHEMENT, J.M. et al. Canine blood component therapy: product preparation, storage and administration. **Journal of American Animal Hospital Association**, Denver, v. 23, p. 483-493, 1986.

BRASIL. Decreto n.º 79094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6360/76, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 jan de 1977.a

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (1998). Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998. Anexo. Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para a coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. de 1998.

BRASIL. Resolução nº 9, de 21 de outubro de 1999. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo. "Regulamento Técnico para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Bolsas de Sangue". **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 22 Out 1999.

BRASIL. Resolução RDC nº 59, de 27 de junho de 2000. Determina a todos fornecedores de produtos médicos, o cumprimento dos requisitos estabelecidos pelas "Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos"./D O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 29 de junho de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. "Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA". **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Brasília, 24 Out. 2001.

BRASIL. Resolução n.899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2 jun 2003.

BUCHIGNANI, M. R. et al. Controle de qualidade de concentrados de plaquetas (CP). **Revista brasileira de análises clínicas**, Rio de Janeiro, v. 30. n. 3, p. 137-140, 1998.

CARDOSO, D. et al. Desenvolvimento de método analítico para determinação de ricina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV-Visível. In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa, 2007. II CONNEPI, 2007.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação. Ed. UFSCar. **Universidade Federal de São Carlos**, Série apontamentos, São Paulo: 2001.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária**: proteção e defesa da saúde. São Paulo, Hucitec/Sobravime, 1999.

COOPESR /Cooperativa de ensino e cultura de Santa Rita do Passa Quatro. Disponível em
< www.cec.coc.com.br/medio/conteudo_arquivos/bioenergetica240108.ppt>
Acesso em 20/08/08.

DELAZZERI, L.;BORBA,S.B.;BERGOLD, A .M. Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para o doseamento do cloridrato de bupropiona.**Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**,v.26 n.3,p211-216,2005.

EC (European Commission; Official Journal of the European Communities, L221/8-36, 2002.

HARMENING, D. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992.

HASHIMOTO, M. C. T. **Estudo da preservação de sangue em diferentes bolsas de coleta com di-octil-ftalato e anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina**. 1997. 95 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1997

HEATON, A.; MIRIPOL, J.; GRAPKA, B. et al. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a manitol, adenine, saline, glucose solution. **Transfusion**. Philadelphia, v. 21, p.600-601. 1984.

HÖGMAN, C. F.; AKERBLOM, O.; HEDLUND, K.; et al. Red cell suspensions in SAGM médium. **Vox Sang**. Basel, v. 45. p. 217-223. 1983a.
HÖGMAN et al. Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBC's stored in a modified additive solution. **Transfusion**, v.42, p.824-829, 2002.

LANCAS, F.M.; MUHLEN, C.V. Cromatografia Unificada. **Revista Química Nova**. São Paulo, v.27, nº 5, 2004.

LOPES et al. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total, conservado para transfusão em bolsas plásticas com ACD-f. **Revista Universidade Rural: Ciência da Vida**, v.17, p.91-94, 1993.

MS/FIOCRUZ/Instituto Nacional de Controle de Qualidade-INCQS. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=9>
Acesso em 19/06/2008.

MS/FIOCRUZ/Instituto Nacional de Controle de Qualidade -INCQS. Disponível em:<http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=8&query=simple&search%5Fby%5Fauthname=all&search%5Fby%5Ffield=tax&search%5Fby%5Fheadline=false&search%5Fby%5Fkeywords=any&search%5Fby%5Fpriority=all&search%5Fby%5Fsection=all&search%5Fby%5Fstate=all&search%5Ftext%5Foptions=all&sid=13&site=fio&text=organograma> Acesso em 29/10/2008

NIH / National Institutes of Health. [Definition of Adenine from the Genetics Home Reference](http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/glossary/adenine) - [National Institutes of Health](http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/glossary/adenine). Disponível em <
<http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/glossary/adenine>. Acesso em 22/08/08.

OBERMAN, H. A. The history of transfusion medicine. In: PETZ, L. D. **Clinical Practice of Transfusion Medicine**, 3 ed. Los Angeles: Churchill Livingstone, 1996. p.11-31.

OLIVEIRA, J.C.V.; SANTOS, J.A.N. Confiabilidade e exatidão de processos de calibração: uma proposta de metodologia. In: IV Congresso Latino Americano de Metrologia, Foz de Iguaçu, 2004. **METROSUL IV**, 2004.

PASCHOAL, A. et al. Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, vol. xy. São Paulo, 2007.

PROSANGUE/Programa Nacional de Sangue. O sangue e seus constituintes. Disponível em < www.prosangue.sp.gov.br/prosangue/arquivos/curiosidades/O-sangue-e-seus-constituientes.ppt > Acesso em 21/10/08

QA/HPLC. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Disponível em <
<http://www.uma.pt/jcmarques/docs/qaii/QAI4HPLC2007JCM.pdf> > Acesso em 26/10/2008

RAZOUK, Fernanda H.; REICHE, Edna M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais Hemocomponentes **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 126-134, 2004.

REIS, F.B.; CICONELLI, R.M.; FALOPPA, F. A importância da metodologia. **Revista Brasileira Ortopédica**, v.37, 2002.

ROSENBERG, F. J. Mecanismos legais de controle da segurança do medicamento. **Revista de Direito Sanitário**, v. 1, n. 2, p. 102-112. 2001.

SANTOS, L. A. C. A hemoterapia no Brasil de 64 a 80. **Physis**. Rio de Janeiro, v. 1, n.1, p.161-181, 1991.

SILVA, A.C. P. O Laboratório Oficial na avaliação analítica. In: ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro, Ed. Fiocruz, 2000. p. 271-301.

SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

THE UNITED States Pharmacopeia. 31. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008. 3539 p. il. 1 CD-ROM.

VICENTE, Cláudia Spegiorin. **Implantação de um sistema de gestão da qualidade internacional ISO no Hemocentro da Unicamp e seu impacto na sistematização e melhoria da assistência de enfermagem aos doadores de sangue**. 2002. 195 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia Mecânica). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

WILLER, R. L.; RIEDESEL, D. H. Transfusion therapy and blood banking in the dog and cat. **Iowa State University Veterinarian**, Iowa, v. 47, p.102-109, 1985.

ANEXO I

PORTARIA Nº 950, DE 26 DE NOVEMBRO DE 1998

O Secretário de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições e considerando a necessidade de se estabelecer os requisitos mínimos necessários das bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes, resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes, constante do anexo desta Portaria.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO

1 - OBJETIVO

2 - DEFINIÇÕES

3 - NORMAS DE REFERÊNCIA

4 - REQUISITOS GERAIS

5 - REQUISITOS ESPECÍFICOS

6 - ENSAIOS

1 - OBJETIVO

1.1 - Este regulamento fixa as condições exigíveis, incluindo aquelas pertinentes ao desempenho do plástico policloreto de vinila (PVC) plastificado com o di (2-etilhexil) ftalato(DEHP), triocitrimelitato (TOTM) ou outros que venham a ser aprovados pelo Ministério da Saúde, para bolsas plásticas, estanques, estéreis e apirogênicas, completas com tubo de coleta, agulha e tubo de transferência opcional para coleta, armazenamento, transporte, separação e administração de sangue total e seus componentes.

1.2 - As bolsas plásticas podem conter soluções anticoagulantes e/ou preservadoras dependendo da sua aplicação.

1.3 - Essas exigências para bolsas plásticas são necessárias para:

13.1 - Assegurar que a qualidade do sangue e seus componentes seja mantida a melhor possível.

1.3.2. - Possibilitar uma coleta, identificação, armazenamento, fracionamento e transfusão de seu conteúdo, de forma eficiente e segura, especialmente para reduzir-se ao mínimo os riscos devido a:

1.3.2.1 - Contaminação, particularmente a microbiológica

1.3.2.2 - Embolia gasosa.

1.3.2.3 - Erros na identificação de bolsas plásticas e das amostras de seu conteúdo.

1.3.2.4 - Interação entre bolsa plástica e seu conteúdo.

1.3.3 - Assegurar compatibilidade funcional com os equipos para transfusão de sangue de acordo com a ISO 1135/4.

1.3.4 - Possibilitar o máximo de resistência à ruptura e à deterioração da bolsa plástica fabricada com o mínimo de massa e volume.

2 - DEFINIÇÕES

2.1 - Bolsa plástica.

O termo "bolsa plástica" é utilizado neste Regulamento Técnico para definir o recipiente completo com o tubo de coleta e agulha, os tubos de saída, as soluções anticoagulantes e/ou preservadoras e os tubos de transferência e recipientes associados, quando existentes.

2.2 - Esterilidade

Ausência de todo microorganismo capaz de multiplicar-se.

2.3 - Volume nominal

Volume de sangue a ser envasado no recipiente, conforme indicado no rótulo pelo fabricante.

2.4 - Vida útil/validade

Período entre a data de esterilização e a data em que o produto não poderá mais ser utilizado para coleta de sangue.

2.5 - Lote

Para bolsas plásticas com solução anticoagulante e/ou preservadora, o termo "lote" significa a quantidade de bolsas preparadas e cheias com um único lote de solução anticoagulante e esterilizada em um único ciclo.

Para bolsas plásticas vazias, o termo "lote" significa a quantidade de bolsas preparadas em um dia de trabalho e esterilizadas em um ciclo.

3 - NORMAS DE REFERÊNCIA

3.1 - Farmacopéia Brasileira

3.2 - Farmacopéia Européia

3.3 - Farmacopéia Americana

3.4 - Norma ISO 3826 ou similar nacional

3.5 - Norma ISO 1135/4

3.6 - Norma DIN 13097

3.7 - Lei 6360/76

3.8 - Decreto 79094/77

3.9 - Portaria Conjunta SVS/SAS 01/96

4 - REQUISITOS GERAIS

4.1 - As bolsas plásticas devem ser transparentes, incolores, flexíveis, estéreis, apirogênicas, isentas de toxicidade, resistentes nas condições de uso e compatíveis com o conteúdo sob condições normais de estocagem.

As bolsas devem ser estáveis biológica, química e fisicamente em relação ao seu conteúdo durante o período de validade e não devem permitir a entrada de microorganismos. Não devem liberar qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante e/ou preservadora, sangue ou componentes, quer por interação química ou dissolução física.

NOTA - O processo de fabricação deve garantir um volume mínimo de ar dentro das bolsas, de modo a permitir a coleta e fracionamento do volume integral de sangue.

5 - REQUISITOS ESPECÍFICOS

5.1 - Dimensões.

Figura 1: Representação esquemática de bolsa plástica.

Nota: Apenas os valores dimensionados são obrigatórios.

Tabela 1 - Dimensões para bolsas plásticas, áreas para rótulo e capacidade nominal (Guia de Referência apenas)

Capacidade Nominal (mL)	Largura Interna (b1) (mm)	Altura Interna (h1) (mm)	Tamanho da área do rótulo (mm) (b2+5) (h2+5)	
100	75	120	60	85
250	120	130	90	85
400	120	170	100	100
500	120	185	100	100

5.1.1 - A bolsa plástica deve ser fornecida com uma pinça a ser usada no tubo de coleta, de modo a não permitir a passagem de ar e a contaminação do sangue durante a coleta. O tubo de coleta, com no mínimo 800 mm de comprimento, deve ter marcações idênticas com intervalos em torno de 75 mm entre si, ao longo do tubo, para serem usados como amostras-piloto para análise.

5.1.2 - No caso de bolsas plásticas de transferência, o comprimento do tubo de transferência deve ser de, no mínimo, 600 mm e deve conter marcações idênticas com intervalos em torno de 75 mm entre si, ao longo do tubo.

5.1.3 - As bolsas plásticas devem permitir coletar a quantidade de sangue e seus componentes estipulada pelo Ministério da Saúde, ou seja, um volume de sangue e correspondente volume de solução anticoagulante e/ou preservadora num total de 500 mL e também permitir sua adaptabilidade aos copos de centrífugas usuais e sua centrifugação, com volume nominal das bolsas satélites entre 300 e 500 mL.

5.2 - Tubos de coleta e de transferência

5.2.1 - As bolsas plásticas devem ser providas com um tubo de coleta ou um ou mais tubos de transferência para permitir a coleta e separação do sangue e seus componentes.

O tubo de transferência deve ser montado com um dispositivo que atue primeiro como um selo e depois, quando quebrado, permita livre fluxo dos componentes do sangue.

5.2.2 - Os tubos devem ser tais que possam ser selados hermeticamente e não colapsem em condições normais de uso.

5.2.3 - Em inspeção visual os tubos não devem apresentar cortes, bolhas, dobras ou outros defeitos

5.2.4 - Não deve haver vazamento nas junções entre os tubos e o corpo da bolsa plástica quando realizado teste de resistência, conforme 6.1.2.

5.3 - Agulha para coleta.

5.3.1 - A agulha deve ser conectada ao tubo de coleta, coberta com a capa protetora. A capa protetora deve prevenir vazamentos da solução anticoagulante e/ou preservadora da bolsa plástica, durante a estocagem, para manter a esterilidade do sistema e ser facilmente removível. A capa protetora deve ser a prova de

violação e fabricada de tal forma que seja impossível recolocá-la ou, qualquer tentativa de manipulação seja claramente observada.

5.3.2 - A agulha para coleta deve resistir, sem soltar-se do conjunto, quando ensaiada conforme 6.1.3.

5.3.3 - As agulhas devem atender às especificações da norma DIN 13097.

5.4 - Tubos de saída

5.4.1 - As bolsas plásticas devem possuir um ou mais tubos de saída para administração de sangue e seus componentes através de um equipo de transfusão. O(s) tubo(s) de saída deve(m) possuir uma membrana perfurável, não selável novamente, que permita a conexão do equipo de transfusão sem vazamento durante a administração ou condições de uso, incluindo esvaziamento sobre pressão. Para assegurar o intercambiamento, o tubo de saída deve possuir tamanho e forma que permitam a introdução de um equipo de transfusão, possuindo um dispositivo de perfuração e vedação, de acordo com a ISO 1135/4. Antes da perfuração da membrana pelo dispositivo de perfuração e vedação, o tubo de saída deve ficar firmemente ocluído pela mesma.

5.4.2 - Cada tubo de saída deve ser selado e montado com um lacre hermético à prova de violação para manter a esterilidade interna.

5.4.3 - As bolsas plásticas devem ter meios de suspensão ou posicionamento que não interfiram no uso da bolsa durante coleta, armazenamento, processamento, transporte e administração, conforme 6.1.9.

5.5 - Amostras-Piloto

A bolsa plástica deve ser projetada de modo que amostras-piloto de identidade inconfundível possam ser coletadas para execução dos ensaios de laboratório, sem que o sistema fechado da bolsa seja violado.

5.6 - Embalagem primária

As bolsas plásticas devem ser acondicionadas em embalagem, de modo a atender os seguintes critérios:

5.6.1 - As bolsas plásticas não devem perder mais do que 2,5% (m/m) de água da solução anticoagulante e/ou preservadora, durante um ano de estocagem a 50% de umidade relativa, a $(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica.

5.6.2 - A vida útil da bolsa plástica deve ser estabelecida pelo fabricante com base no dado de estabilidade. Quando contém solução anticoagulante e/ou preservadora, a vida útil não deve exceder aquela em que a perda de água é igual a 5% (m/m).

5.6.3 - O interior da embalagem não deve interagir com o seu conteúdo e deve ser tratado para prevenir a formação e crescimento de bolor ou fungos. Em caso de utilização de fungicidas químicos deve-se comprovar que não há penetração prejudicial ou deterioração da bolsa plástica e seu conteúdo.

5.6.4 - A embalagem plástica deve ser selada de maneira tal que seja inviolável.

5.6.5 - A embalagem deve ser suficientemente forte para resistir a danos sob condições normais de manuseio e uso.

