

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Anna Maria Barreto Silva Fust

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DOSAGEM DE ADENINA EM SOLUÇÃO DE BOLSA DE SANGUE**

Rio de Janeiro

2011

Anna Maria Barreto Silva Fust

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DOSAGEM DE ADENINA EM SOLUÇÃO DE BOLSA DE SANGUE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Mestrado Profissional em Controle de Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Rio de Janeiro

2011

Fust, Anna Maria Barreto Silva

Desenvolvimento e validação de método analítico para dosagem de adenina em bolsa de sangue / Anna Maria Barreto Silva Fust. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

89 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Dra. Ana Cristina M.A. Nogueira

1. Adenina. 2. Bolsa de sangue. 3. CLAE. 4. Validação

Development and validation of analytical method for determination of adenine in blood bag solution

Anna Maria Barreto Silva Fust

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA DOSAGEM DE ADENINA EM SOLUÇÃO DE BOLSA DE SANGUE**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em:25/07/2011

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Kátia Christina Leandro (FIOCRUZ)

Dr^a Tânia Maria Monteiro (INMETRO)

Dr^a. Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (FIOCRUZ)

Dedico à

*Quem começou a lutar por minha vida,
desde que eu estava em seu ventre,
quem muitas vezes deixou de comer,
para que eu comesse, quem com seu amor
deu-me sustento e alicerce para
que eu chegasse até aqui: minha mãe Alzira*

*Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda ciência,
Ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de
transportar montes, se não tiver Amor, nada serei.
(1 Coríntios 13:2)*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, força, coragem e perseverança, sem as quais, as dificuldades não seriam superadas e, eu não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus maiores amores, meu marido Fernando e meus filhos Thiago e Gustavo, pela compreensão aos tantos "não posso" ditos nesse período.

À minha mãe, não há palavras que expressem tanto agradecimento.

Ao meu pai Antônio (*in memoriam*), que ainda vive em meu coração, pelo despertar da importância do estudo e dos bons costumes.

Às minhas amadas irmãs Selma e Carolina, por todo incentivo em minha vida, a primeira, com suas imprescindíveis orações e a segunda com sua demonstração de admiração e orgulho.

À minha orientadora Dr^a Ana Cristina A. M. Nogueira, pela coragem em aceitar meu trabalho mesmo sendo a proposta um pouco distante dos trabalhos já concluídos, por sua sinceridade, estímulo, confiança e colaboração neste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Filipe S. Q. Silva, por valorizar seu lado professor, aceitando orientar-me, mesmo sabendo de minhas limitações sobre o assunto, pelo desenrolar e clarear da parte escrita da dissertação, pela compreensão e serenidade durante meus "nervosismos", por toda liberdade, receptividade e credibilidade durante todo o trabalho.

À direção do INCQS, por incentivar e permitir mais essa oportunidade.

À chefe de Laboratório Msc. Sinéa Mendes, pela preciosa colaboração na parte final dessa dissertação, pela preocupação e palavras de ânimo e estímulo ao mestrado e a tantos outros, desde que eu cheguei aqui neste departamento.

À responsável pelo Setor Msc Michele Feitoza Silva, que chegou para mudar a visão do nosso laboratório, por adotar-me quando estava órfã, por "vestir nossa camisa", por viver correndo atrás de tudo o que possa acrescentar nossa parte profissional, por confiar, ajudar e estimular de maneira imparcial, tentando fazer de nós mais e mais uma verdadeira equipe.

Aos membros das duas bancas examinadoras, que contribuíram de maneira significativa com todas as sugestões para esta dissertação, em especial à Dr^a Kátia Christina Leandro, que além da amizade, sempre soube de maneira serena e imparcial mostrar meus erros e acertos, estimular e direcionar a conclusão deste trabalho.

A todos os professores da pós-graduação, em especial à Dr^a Shirley de Mello Abrantes e Maria da Conceição Viana, que demonstraram grande comprometimento e preocupação com o aprendizado de seus alunos.

Ao Msc JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR pela inestimável e incansável ajuda na elaboração deste trabalho. Espero algum dia retribuir todo o empenho e preocupação nesses 3 anos. Não existem palavras que possam agradecer.

À Renata e Mariana Berendonk, pela ajuda no laboratório, sem a qual essa dissertação não teria saído.

À Renata, por todas as vezes que me ouviu, me acalmou e me compreendeu nos meus vários momentos de “DR” e de desabafo.

À Ana Lúcia, André Mazzei, Beth, Lilian, Michele, Ozéias e Renata pela impagável ajuda na elaboração deste trabalho. (o.a.).

Ao colega de Dept^o Fábio Basílio, pela preciosa ajuda nas planilhas de Efeito matriz.

Aos meus queridos colegas de turma, que demonstraram um verdadeiro espírito de companheirismo, em especial: Ângela, Euclides, Fernando, Hosana, Nelson Nunes, Patrícia Maia, Paulo Ricardo e Rosa, sempre me lembrarei de vocês.

À minha querida VALERIA DE MELLO MEDEIROS, parte integrante nesta conquista, desde a inscrição, o companheirismo nas aulas, sempre, mesmo passando pelas maiores dificuldades em sua vida, não deixou um só momento de tentar me ajudar, estimular, ouvir e aconchegar, obrigada para sempre.

À Amanda, Claudia Rangel, Hilda, Márcia Jusan, Ozéias e Virgínia pela preocupação e palavras de conforto durante esse período.

Aos funcionários da biblioteca, em especial Alexandre Sousa, que sempre atendeu a todos os meus pedidos.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, por toda a colaboração e

Por fim, meu agradecimento muito especial a muitas dessas pessoas que me ajudaram sem esperar nada em troca. Retribuo com as minhas sinceras orações a Deus por vocês.

RESUMO

As bolsas de coleta utilizadas para preservação do sangue humano variam de acordo com a solução anticoagulante e/ou preservadora utilizada, sendo estas, no Brasil, regulamentadas pela Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998. A adenina é um dos componentes desta solução, sendo adicionada para a biosíntese do ATP nas hemácias para diminuir a hemólise durante a estocagem do sangue. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método alternativo aos oficiais - da Portaria nº 950 e da Farmacopéia Americana - para determinação quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com pareamento iônico da adenina, utilizando reagentes menos agressivos para aumentar o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. O método proposto empregou coluna cromatográfica de fase reversa Symmetry® C₈ (250 x 4,6 mm; 5,0µm) e fase móvel constituída de uma mistura de 2,5% (v/v) de ácido acético + 0,02% (p/v) acetato de amônio + 0,005 % (p/v) heptano sulfonato de sódio + 5% (v/v) de acetonitrila. O fluxo empregado foi de 0,6 mL/min e detecção UV a 262 nm. Este estudo demonstra que o método desenvolvido apresentou especificidade, linearidade na faixa de 0,0264 a 0,0480 mg/mL. A estatística t de Levene não foi significativa ($p > 0,05$), a independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson e a significância da regressão foi alta ($p < 0,001$). O método está livre de tendência (valor p da interseção $> 0,05$), ($r \approx 0,999$) e mostrou-se satisfatório na avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, efeito matriz, estabilidade e robustez. A importância da validação deste método alternativo, que atende aos critérios tanto da Anvisa quanto do Inmetro, é a diminuição do custo das análises e a possível alteração da legislação vigente no que concerne à normatização de bolsas de sangue utilizadas no Brasil. De acordo com os resultados de validação obtidos através dos testes estatísticos a metodologia proposta pode ser empregada em laboratórios para o controle de qualidade.

Palavras chave: adenina, bolsa de sangue, CLAE e validação.

ABSTRACT

Blood bags differ according to the anticoagulant /preservative solution used and, in Brazil, are regulated by a specific normative (Decreto 950, 26/11/1998). Adenine improves red blood cell survival by adding substrate for ATP synthesis and, therefore, works as a preservation component increasing the interval of blood storage. The objective of this study was to develop and validate an alternative method to the official ones - United States Pharmacopeia and official Brazilian methodology (Portaria nº 950, 26/11/1998) - for adenine quantification in bag solution, using ion pair reversed phase chromatography with less aggressive reagents to increase column life time. The proposed method employed Symmetry® C₈ column (250 x 4.6 mm, 5.0 µm) and 2.5% acetic acid + 0.02%(p/v) ammonium acetate + sodium heptane sulfonate 0,005% (p/v)+ 5% (v/v) acetonitrile as mobile phase. Flow rate was 0.6 mL. min⁻¹ with UV detection at 262 nm. The results obtained specificity with photodiode array detection, linearity in the range of 0.0264 to 0.04780 mg/mL. Levene's t statistic was not significant (p > 0.05); independence of regression residuals was evidenced by the Durbin-Watson test; regression significance was great (p < 0.001). The method is free of bias (p-value of the intersection > 0.05), (r ≈ 0.999), is satisfactory in standard solution stability, precision, accuracy, matrix effect and robustness. The importance of validating this alternative method, that fulfills both Anvisa's and Inmetro's criteria, is the decrease of analysis' cost and a suggestion for changing the national requirements regarding the normalization of blood bags used in Brazil. Regarding the statistic results obtained in the present study, this the developed method is feasible to be applied in quality control laboratories.

Keywords: adenine, blood bag, HPLC and validation

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD – Ácido cítrico, citrato e dextrose
ACN – Acetonitrila
AcOH – Ácido acético
AcONH₄ .. Acetato de amônio
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM – *American Society for Testing and Materials*
ATP – Trifosfato de adenosina
BPF – Boas Práticas de Fabricação
2,3 BPG – 2,3 Bifosfoglicerato
C₁₈ - coluna de sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPDA - Citrato, dextrose, fosfato e adenina
CPD -SAGM1 - Citrato, fosfato, dextrose - solução de manitol, glicose e adenina
CPD -SAGM2 - Citrato, fosfato, dextrose - solução de manitol, glicose e adenina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DOU – Diário Oficial da União
DDSS – Dodecilbenzenosulfonato de sódio
FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GT-AIS – Grupo Técnico – Artigo e Insumos de saúde
ICH – *International Conference on Harmonisation's*
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO - *International Organization for Standardization*
LACENS – Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LBAIS – Laboratório de biológicos, artigos e insumos de saúde
MMQO – Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
RE – Resolução Específica
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SGA – Sistema de Gerenciamento de Amostras
USP - *United States Pharmacopoeia* - Farmacopéia Americana
UV/VIS – Ultravioleta/visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática de bolsa plástica	18
Figura 02	Estrutura da adenina e do ATP	20
Figura 03	Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu	44
Figura 04:	Representação das sobreposições dos cromatogramas obtidos nas condições proporcionais testadas na tabela 16, quanto ao pH e a concentração de substâncias da fase móvel	55
Figura 05:	Representação das sobreposições dos cromatogramas obtidos nas condições proporcionais testadas na tabela 17, quanto ao pH e a concentração de substâncias da fase móvel	57
Figura 06:	Cromatograma obtido por CLAE com coluna C ₈ symmetry (4,6 µm, 250 x 3,9 mm d.i), concentração de adenina 0,0246 mg/mL, fase móvel: AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS e ACN 5% v/v (pH 2,8) temperatura de 40° C, fluxo 0,6mL/min, volume de injeção de 20 µL, detecção a 262 nm.	58
Figura 07:	Gráfico das áreas de várias injeções do padrão de adenina nas condições cromatográficas: fase móvel: AcOH 2,5%v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v;coluna C ₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	60
Figura 08:	Gráfico das áreas de várias injeções da amostra de adenina nas condições cromatográficas: fase móvel: AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v ;coluna C ₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	60
Figura 09:	Cromatograma em 3D de absorção molecular na região ultravioleta referente ao cromatograma do padrão de adenina sem autoclavar: fase móvel : AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	61
Figura 10:	Cromatograma em 3D de absorção molecular na região ultravioleta referente ao cromatograma da amostra de adenina sem autoclavar fase móvel : AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	62
Figura 11:	Comparação dos espectros de absorção molecular no ultravioleta obtido do sinal no cromatograma do padrão de adenina 30,0mg/mL (a) com o do sinal do cromatograma da amostra (b) com auxílio do detector PDA.	62

Figura 12:	Cromatograma do placebo antes e após autoclavação nas condições cromatográficas: fase móvel AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	63
Figura 13:	Cromatograma do padrão de adenina antes e após autoclavação nas condições cromatográficas: fase móvel AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	63
Figura 14:	Cromatogramas da amostra antes e após autoclavação nas condições cromatográficas: fase móvel AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	64
Figura 15:	Cromatograma em 3D da amostra após autoclavar , fase móvel :AcOH 2,5% v/v, AcONH ₄ , HSS, ACN 5% v/v; coluna C ₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	64
Figura 16:	Gráfico da 1ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.	65
Figura 17:	Gráfico da 2ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.	66
Figura 18:	Gráfico da 3ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.	66
Figura 19:	Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão da adenina (esquerda) e a curva analítica (direita). Condições: fase móvel: AcOH 20%, AcONH ₄ , HSS, ACN 5%; coluna C ₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Tipos de solução preservadora de bolsas plásticas e tempo médio de armazenamento	19
Tabela 02	Metodologia recomendada pela USP 34 e pela Portaria nº 950/98 para determinação do teor de adenina	23
Tabela 03	Avaliação crítica dos parâmetros do ensaio alternativo descrito na portaria nº 950/98	24
Tabela 04	Métodos para a determinação de adenina por CLAE descritos na literatura científica	25
Tabela 05:	Parâmetros de adequação do sistema	29
Tabela 06:	Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa	32
Tabela 07:	Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro	32
Tabela 08:	Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica	34
Tabela 09:	Recuperação do analito em função da concentração	36
Tabela 10:	Fatores permitidos à variação para o teste de robustez, segundo a USP,34	41
Tabela 11:	Parâmetros da metodologia analítica desenvolvida	46
Tabela 12:	Concentrações das soluções de trabalho da adenina.	49
Tabela 13	Concentrações finais de Adenina nas soluções para estudo de recuperação	49
Tabela 14:	Variações nos fatores para a determinação da robustez	51
Tabela 15:	Matriz dos fatores para determinação da robustez do método	52
Tabela 16:	Resultados dos parâmetros de adequação do sistema com a coluna Nucleosil	56
Tabela 17:	Resultados dos parâmetros de adequação do sistema com as colunas C ₁₈ e C ₈ Symmetry	57
Tabela 18:	Valores de adequação do sistema do sinal cromatográfico	59
Tabela 19:	Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho da adenina	65
Tabela 20:	Resultados obtidos da curva de adição padrão da adenina	67
Tabela 21:	Cálculo de Repetitividade do método para a adenina	68
Tabela 22:	Cálculo da Precisão intermediária do método para adenina	69
Tabela 23:	Resultados dos parâmetros das variações inferiores às nominais	71
Tabela 24:	Resultados dos parâmetros das variações superiores às nominais	71
Tabela 25:	Cálculo dos efeitos para cada variação inferior de fator na determinação da adenina	72
Tabela 26:	Cálculo dos efeitos para cada variação superior de fator na determinação da adenina	73

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	16
1.1 – ARMAZENAMENTO DO SANGUE – HISTÓRICO.....	16
1.2 – BOLSAS PLÁSTICAS PARA ARMAZENAMENTO DE SANGUE.....	17
1.3 – A ADENINA.....	19
1.4 – CONTROLE DE RISCOS À SAÚDE.....	20
1.5 – O INCQS E O CONTROLE DE QUALIDADE DE BOLSAS DE SANGUE.....	22
1.6 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ADENINA EM SOLUÇÃO.....	23
1.7 – ADEQUAÇÃO DE UM SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	26
1.7.1 – Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema.....	29
1.8 – VALIDAÇÃO.....	30
1.8.1 – Especificidade (resolução) e seletividade (pureza do sinal).....	33
1.8.1.1 – <i>Efeito matriz</i>	34
1.8.2 – Linearidade.....	34
1.8.2.1 – <i>Faixa de trabalho</i>	35
1.8.3 – Exatidão.....	36
1.8.4 – Precisão.....	37
1.8.4.1 – <i>Repetitividade</i>	38
1.8.4.2 – <i>Precisão intermediária</i>	38
1.8.5 – Robustez.....	39
1.9. – RELEVÂNCIA DO ESTUDO PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	41
2 – OBJETIVO	42
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 – MATERIAIS.....	43
3.1.1 – Equipamentos.....	43
3.1.2 – Reagentes.....	44
3.1.3 – Colunas cromatográficas.....	44
3.1.4 – Amostras.....	44
3.2 – MÉTODOS.....	45
3.2.1 – Otimização do método cromatográfico.....	45
3.2.2 – Validação do método.....	46
3.2.2.1 – <i>Adequação do sistema</i>	46
3.2.2.2 – <i>Estabilidade da solução estoque padrão e da amostra de adenina</i>	46

3.2.2.3 – Avaliação da seletividade.....	46
3.2.2.3.1 – Verificação do efeito matriz.....	47
3.2.2.4 – Avaliação da linearidade.....	47
3.2.2.4.1 – Faixa linear de trabalho.....	48
3.2.2.5 – Avaliação da exatidão.....	49
3.2.2.6 – Avaliação da precisão.....	49
3.2.2.6.1 – Repetitividade.....	49
3.2.2.6.2 – Precisão intermediária.....	50
3.2.2.7 – Determinação da robustez.....	50
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	53
4.2 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	58
4.2.1 - Adequação do sistema	58
4.2.2 - Avaliação da estabilidade da solução padrão e da amostra de adenina	58
4.2.3 – Avaliação da seletividade.....	60
4.2.3.1– Verificação do efeito matriz.....	64
4.2.4 – Avaliação de linearidade da curva analítica da adenina	65
4.2.5 – Determinação da exatidão	67
4.2.6 – Determinação da precisão: repetitividade e precisão intermediária	68
4.2.6.1 – Repetitividade	68
4.2.6.2 – Precisão intermediária.....	69
4.2.7 – Determinação da robustez	69
5 – CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXO A	81
Descrição da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Souza & Junqueira, 2005.	81
ANEXO B	84
Tabela da Avaliação da linearidade da curva analítica da Adenina	84
ANEXO C	85
Tabela de avaliação estatística do efeito matriz	85
ANEXO D	87
Tabela da Avaliação da linearidade da curva matriz da Adenina	87
ANEXO E	88
Tabela de dados de cálculo efeito matriz em curva adição padrão e analítica	88

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – ARMAZENAMENTO DO SANGUE – HISTÓRICO

A partir de 1613, quando William Harvey descreveu pela primeira vez a circulação sanguínea, começou-se a perceber que seria possível injetar ou retirar sangue de pacientes, para o tratamento de doenças. Iniciaram-se as primeiras tentativas de transfusões sanguíneas, com vários experimentos e fracassos durante o séc. XVII. Depois disso, somente em 1818 Blundell, um obstetra, retomou essas experiências (HÖGMAN et al., 2002).

Evitar a incompatibilidade entre os pacientes era o maior desafio e segundo HASHIMOTO (1997), “foi dado um grande salto no avanço das conquistas sobre circulação sanguínea, 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 sanguíneos”.

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 sem a formação de coágulos e fornecer nutrientes necessários para o metabolismo das células durante o período de armazenamento. Em seguida, Robertson, em 1918 aperfeiçoou a solução permitindo a preservação do sangue por até 21 dias, tendo sido observado, a partir desta descoberta, uma evolução nos estudos e nas descobertas sobre a composição do sangue (AUTHEMENT et al., 1986).

A partir desses avanços, surgiram os primeiros bancos de sangue, inicialmente nos 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 consequentemente as doações foram aumentando, impulsionando novas descobertas, como por exemplo, novos grupos sanguíneos (VICENTE, *apud* SANTOS, 1991).

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. A forte demanda de transfusões sanguíneas durante as duas guerras mundiais

resultaram na busca pelo 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,2001). 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), aumentando o uso do sangue e hemoderivados em diversos tratamentos.

Atualmente as bolsas plásticas são o principal recipiente utilizado para o armazenamento de sangue, sendo esse produto fundamental para os serviços de saúde. A qualidade das bolsas plásticas para sangue humano é importantíssima, garantindo bons resultados da hemoterapia.

1.2 – BOLSAS PLÁSTICAS PARA ARMAZENAMENTO DE SANGUE

A Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998, estabelece requisitos mínimos necessários às bolsas plásticas para armazenagem de sangue comercializado no Brasil – regulamentando e fixando as condições exigíveis de qualidade, além de estabelecer os testes para avaliação e garantia destas condições. Segundo esta Portaria, a bolsa plástica para coleta e armazenamento de sangue é definida como: “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 quádruplas“ (BRASIL, 1998).

Segundo os requisitos estabelecidos 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. Além disso, estas devem ser estáveis, em relação ao seu conteúdo durante o período de validade, em suas características biológicas, químicas e físicas e não devem permitir a entrada de microrganismos. Na composição do plástico da bolsa, não deve haver qualquer substância que possa ser

liberada para a solução anticoagulante e/ou preservadora, sangue ou componentes, seja por interação química ou física (BRASIL, 1998).

A Figura 1 ilustra esquematicamente a bolsa plástica com suas conexões. A agulha para a coleta é ligada ao tubo coletor, por onde passa o sangue até a área de armazenagem, que fica sob o rótulo. A área de armazenagem contém a solução anticoagulante/preservadora da bolsa.

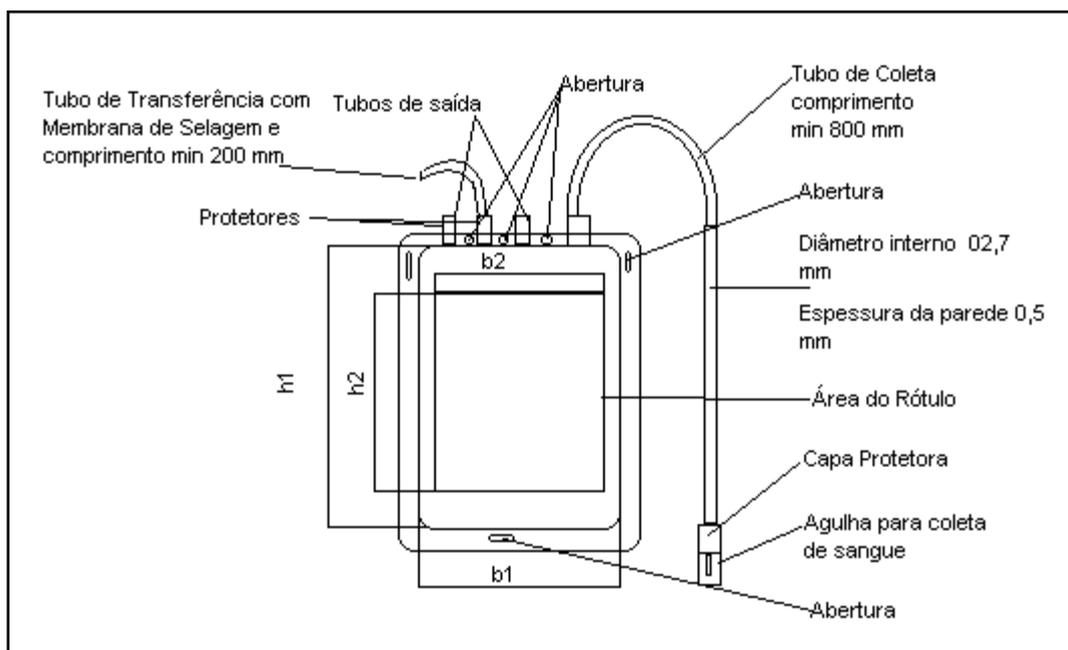


Figura 1: Representação esquemática de bolsa plástica (BRASIL, 1998).

Os tipos de bolsa plástica diferem na sua aplicação, no tipo de componente do sangue que irá armazenar e no tipo de solução anticoagulante e/ou preservadora que ela contém. 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 depende da técnica de coleta, do anticoagulante utilizado, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos e da frequência de homogeneização durante o armazenamento (WILLER & RIEDESEL, 1985). Desde que foi desenvolvida a primeira solução preservativa com ácido cítrico e dextrose (ACD), muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de aprimorar os meios para manter a viabilidade e a capacidade funcional do sangue estocado por maiores períodos de tempo (BUCHIGNANI, et al. 1998).

O sangue total é caracterizado como o sangue coletado de um doador misturado com a solução preservativa e anticoagulante, na proporção de aproximadamente 450 mL de sangue para 63 mL de solução, estocado em refrigerador com temperatura monitorada entre 1 a 6° C. Seu prazo de validade depende da solução utilizada na bolsa de coleta: Citrato - Fosfato-Dextrose (CPD) é de 21 dias e Citrato - Fosfato-Dextrose - Adenina (CPDA) é de 35 dias (RAZOUK & REICHE, 2004).

Os tipos de bolsa de sangue utilizadas no Brasil, de acordo com a composição da solução anticoagulante, estão descritos na Tabela 1. Essas soluções são conhecidas por seus nomes abreviados 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 (BRASIL, 1998).

Tabela 1: Soluções preservadoras de bolsas plásticas e tempo de armazenamento.

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

*Depende do hemocomponente armazenado; ** Diferença na concentração de adenina, glicose e manitol (Adaptado de Vicente, 2002).

1.3 – A ADENINA

Investigações realizadas ao longo do tempo têm demonstrado que soluções aditivas são baseadas na presença de substratos importantes para o metabolismo dos eritrócitos, a manutenção do pH, dos níveis trifosfato de adenosina (ATP) e de 2,3 bifosfoglicerato (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 e 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 (Figura 2) é uma das cinco bases nucleicas usadas na formação dos nucleotídeos do DNA e RNA. A adenina quando ligada à ribose forma a adenosina, um nucleotídeo. Esta, por sua vez forma o ATP, nucleotídeo presente nas células, quando ligada a três grupos de fosfato. Essa molécula é o principal intermediário entre as vias metabólicas que produzem energia e as funções celulares que utilizam a energia. Nas hemácias, o ATP é necessário no controle do balanço eletrolítico pela bomba de sódio e potássio e na manutenção da forma celular, diminuindo a possibilidade de hemólise durante a conservação do sangue (COSTA JUNIOR et al., 2008). A biossíntese do ATP é a principal função da suplementação com adenina nas bolsas de sangue.

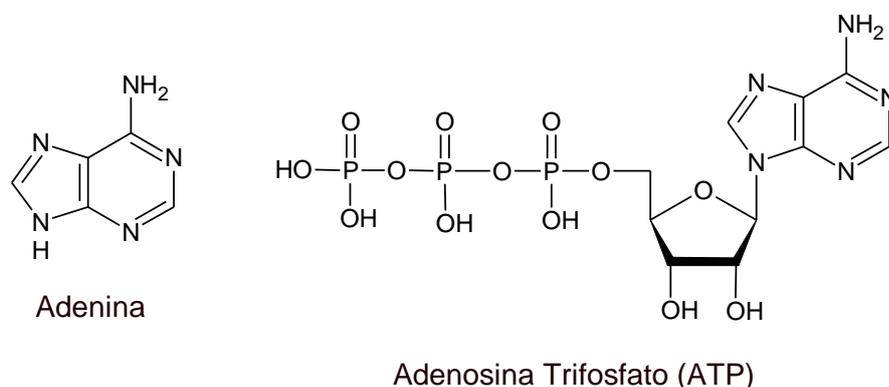


Figura 2: Estrutura da adenina e do ATP

1.4 – CONTROLE DE RISCOS À SAÚDE

Riscos e danos à saúde relacionados ao consumo de produtos, tecnologias e serviços de interesse sanitário podem ser decorrentes de defeitos ou falhas de fabricação, falhas de diagnóstico, inadequação da prescrição, e de ilicitudes intencionais de fabricantes, comerciantes ou prestadores de serviços. Determinados produtos e serviços já contêm, por si mesmos, certo grau de risco “intrínseco” ou certa periculosidade, que impõe a observância rigorosa com cuidados na produção, distribuição, uso e na deposição de seus resíduos no ambiente. Com a produção em grande escala e a intensa circulação das mercadorias em uma economia globalizada, os riscos decorrentes de produto defeituoso colocado no mercado

podem afetar a saúde da população em dimensões que extrapolam as fronteiras de um país (COSTA, 1999).

Os riscos e danos também podem resultar da insuficiente produção de conhecimento ou de dificuldades de acesso ao saber já produzido em uma determinada área. Entretanto, as ações de Vigilância Sanitária lidam diretamente com o conhecimento científico e o desenvolvimento tecnológico e, à medida que esta ligação entre o saber, o desenvolvimento tecnológico e as medidas de vigilância é reconhecida como fundamental para o estabelecimento e a permanente atualização tanto das normas e técnicas quanto dos fins legais, esta área de atuação torna-se uma ciência bem definida. O saber é uma das dimensões críticas da Vigilância Sanitária, especialmente em países com limitado poder científico e tecnológico. A distribuição desigual do conhecimento científico e tecnológico entre as nações e sua relação com a dificuldade de clareza sobre a qualidade de produtos foi discutida na literatura (COSTA *apud* LIMA et al,1993).

No contexto do processo de fabricação e controle da qualidade das bolsas plásticas de armazenamento de sangue, após a promulgação da Portaria nº 950/98 (DOU - 30/11/98), vários regulamentos técnicos foram elaborados. 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 novo regulamento técnico de BPF específico, que incorpore as novidades tecnológicas para bolsa de sangue.

Em 2001, a ANVISA publicou a Resolução RDC nº 185 de 22/10/01, que classificando as bolsas quanto ao grau de risco, como Classe III, classe de produtos de alto risco. Essa RDC, entretanto, não revogou a Portaria nº. 950/98, considerando a necessidade da permanência de um regulamento específico para as bolsas de sangue (BRASIL, 2001).

1.5 – O INCQS E O CONTROLE DE QUALIDADE DE BOLSAS DE SANGUE

A fiscalização sanitária apóia-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, fiscal, controle e prévia. Essas análises devem ser realizadas em laboratórios oficiais ágeis, modernos e equipados, compatíveis com o desenvolvimento científico e tecnológico (BRASIL, 1977a).

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 atua em áreas de ensino, de pesquisa e tecnologia, além de ter 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 a realizar análises que verificam a qualidade das bolsas de sangue do país, as quais são de grande importância enquanto insumos críticos para a saúde. Essas análises podem ser submetidas ao INCQS nas modalidades: fiscal, controle ou prévia, e serem direcionadas para os enfoques microbiológico, químico, toxicológico ou imunobiológico, tentando sanar a denúncia, ou atender às legislações pertinentes, no caso da modalidade prévia (BRASIL, 1977b).

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. No INCQS esse trabalho é coordenado pelo grupo técnico de artigos e insumos para a saúde (GT-AIS).

1.6 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ADENINA EM SOLUÇÃO

A determinação do teor de adenina é recomendada na USP 34 (Farmacopeia Americana) e na Portaria nº 950/1998 (BRASIL, 1998; ANTICOAGULANT, 2011), devido a importância desse componente na solução preservadora da bolsa de sangue.

A metodologia recomendada pela Farmacopéia Americana (USP, 2011), é por CLAE, utiliza como fase móvel solução de ácido acético e dihidrogenofosfato de amônio sob o fluxo de 2,0 mL/min, coluna de aço inoxidável com empacotamento L9* e detector ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. O teor de adenina é calculado pela comparação das áreas obtidas (amostra e padrão) (ANTICOAGULANT, 2011).

A portaria nº 950/98 propõe dois métodos por cromatografia líquida de alta eficiência: o método descrito na Farmacopéia Americana e um método alternativo. Este último também é recomendado para a determinação do teor de citrato total e utiliza como fase móvel solução de ácido fosfórico, dodecilbenzenossulfonato (DDSS) e metanol sob o fluxo de 0,8 mL/min, coluna C₁₈ e detector ultravioleta no comprimento de onda de 235 nm. Os resultados são obtidos pela comparação das áreas (amostra e padrão) em tempos de retenção diferenciados e expresso em termos de adenina e citrato total (BRASIL, 1998). A tabela 2 descreve as condições analíticas desses ensaios.

Tabela 2: Metodologia recomendada pela USP 34 e pela Portaria nº 950/98 para determinação do teor de adenina

USP 34	Portaria nº 950/1998
Cromatografia líquida	Cromatografia líquida
Fase móvel: Ácido acético e dihidrogenofosfato de amônio	Fase móvel: ácido fosfórico, dodecilbenzenossulfonato (DDSS) e metanol
Fluxo: 2,0 mL / minuto; Isocrático	Fluxo: 0,8 mL / minuto; Isocrático
Coluna de aço inox Fase estacionária L9*	Coluna de fase reversa C ₁₈ (250x4)mm
Detector de ultravioleta	Detector de ultravioleta
$\lambda = 254 \text{ nm}$	$\lambda = 235 \text{ nm}$
Volume de injeção: 20 μL	Volume de injeção: 20 μL
Padrões: Indicação de concentração final	Padrões: Indicação de concentração final

(Adaptado de BRASIL, 1998 e ANTICOAGULANT, 2011).

* L9 = Sílica gel, irregular ou esférica, ligada a um cátion fortemente ácido – 3 a 10, μm de diâmetro.

Apesar da disponibilidade dos métodos oficiais, os estudos realizados demonstram problemas nas análises. No caso da metodologia da USP, houve falta de reprodutibilidade dos resultados (FUST, 2009).

Também foram observados problemas no uso da metodologia da portaria 950/1998. Os pontos críticos relacionados a esse método estão sumarizados na tabela 3. Verificou-se que o tempo de vida útil das colunas nessas condições de análise era pequeno, possivelmente devido a composição da fase móvel. Além disso, o comprimento de onda usado no detector pode afetar os resultados, sendo necessárias alterações metodológicas para superar essas deficiências (FUST, 2009).

Tabela 3: Avaliação crítica dos parâmetros do ensaio alternativo descrito na portaria nº 950/98.

Pontos críticos	Impactos nos resultados
Utilização do H ₃ PO ₄ na fase móvel e HCl (solubilização do padrão)	Menor vida útil da coluna.
Comprimento de onda	Interferência do ácido cítrico

A análise da adenina é problemática devido às características dessa molécula, principalmente sua polaridade (log P -0,1). Vários trabalhos resolveram esse problema utilizando fase reversa e o pareamento iônico na análise.

Este método cromatográfico aplica-se à separação de compostos iônicos de ácidos fortes ou bases fortes que estão completamente ionizados na faixa de pH entre 2 e 8. A separação dos analitos se torna possível, pela adição de determinados contra-íons que formam, com os íons já existentes na solução, derivados com radical alquil de maior afinidade com a fase estacionária que é por natureza apolar (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

A detecção no Ultravioleta é feita em comprimento de onda maior que 235 nm, diferente das condições descritas na portaria. Na tabela 4 são resumidas as condições aplicadas nesses artigos.

Tabela 4: Métodos para a determinação de adenina por CLAE descritos na literatura científica.

Coluna*	Fase móvel**	Detector***	matriz	Referência
C ₁₈ (symmetry) (250 x 4,6; 5)	PB 10mM, 3mM OSS, pH = 4; Sol B: MeOH	UV (280)	Liofilizado de bactérias de ruminantes	MORAL, P.G; 2005
C ₁₈ (150 x 1; 5)	FOH 0,1%	MS	RNA sintético	HINES,HB; 2004
RP- C ₁₈ (250 x 4,6; 5)	AcONa 20mM, 5% ACN pH 6,0,	UV (260)	Infusões de adenina e adenosina	KIEßLING, S,2004
C ₁₈ - ODB (150x 2; 3)	ACN + FONH ₄ pH = 6,5 gradiente	UV (260)/MS	Deteção de DNA clorados e nucleosídeos de RNA	BADOUARD, M,2005
C ₁₈ (150 x 4,6, 3,5)	AcONH ₄ 5mM + MeOH	UV (254)/MS	Quantitativa de nucleosídeos e nucleobases em <i>Ganoderma</i> spp.	GAO, JL,2007

*comprimento, diâmetro em mm; tamanho de partícula em μm ; ** PB tampão fosfato; OSS octano sulfonato de sódio; FOH ácido fórmico; AcONa acetato de sódio; ACN acetonitrila; FONH₄ formiato de amônio; AcONH₄ acetato de amônio; MeOH metanol*** UV ultravioleta, entre parênteses o comprimento de onda em nm; MS espectrômetro de massa.

Tais evidências demonstraram a necessidade de desenvolvimento de um método novo para a determinação de adenina em solução preservadora de bolsa de sangue.

Atualmente um processo analítico pode ser dividido em desenvolvimento de método, sua validação e fase de aplicação, pois assim o método demonstrará que é apropriado para a finalidade pretendida, baseando-se na determinação qualitativa, semi - quantitativa e/ou quantitativa da substância (SOUZA, 2007).

O desenvolvimento de métodos em CLAE está condicionado a avaliação de parâmetros analíticos, que verificam a interação dos analitos com a fase estacionária, fase móvel e a separação dos constituintes da amostra. O atendimento desses parâmetros é um ponto essencial do desenvolvimento, sendo avaliado através da adequação do sistema cromatográfico.

1.7 – ADEQUAÇÃO DE UM SISTEMA CROMATOGRÁFICO

A verificação dos sistemas cromatográficos se faz por um conjunto de testes aplicados, denominados de adequação do sistema. A adequação é avaliada por parâmetros como fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas da amostra. Estes testes são baseados no conceito de que os equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que devem ser avaliados como um todo (SHABIR, 2003; USP 34, 2011). Os valores aceitáveis para cada um dos parâmetros são preconizados pelos principais compêndios oficiais de análise cromatográfica (NATA, 2006; ICH, 2005; USP 34, 2011).

No contexto da dissertação utilizamos para a adequação do sistema cromatográfico, os parâmetros descritos a seguir:

- Volume interno (V_i) e o Volume “morto” referente à coluna (V_0)

Para determinar os parâmetros anteriormente mencionados faz-se necessário calcular o Volume morto (V_0) referente à coluna, que é o Volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. O V_0 da coluna representa cerca de 95% do V_0 total. O Volume referente à coluna (V_0) poderá ser determinado experimentalmente ou calculado levando-se em conta as dimensões da coluna e o tamanho da partícula. (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

- Fator de retenção (K)

O fator de retenção ou fator de capacidade (K) indica o grau de afinidade que a coluna e a fase móvel possuem em relação ao componente. É um parâmetro que permite comparar o tempo ou Volume de retenção de um componente da amostra com o V_0 . Ou seja, revela em quanto tempo em relação ao valor de V_0 o analito eluí (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

Valores de retenção (K) próximos ao V_0 devem ser evitados, pois neste caso ocorrerá pouca interação do composto analisado com a fase estacionária podendo ocorrer a coeluição com outro componente da amostra. Da mesma maneira, não se deve trabalhar com valores altos de retenção, porque isto poderá fazer que possibilite o alargamento do sinal cromatográfico. Idealmente, o valor de (K) deveria variar entre um e dez.

A expressão a seguir correlaciona o fator de retenção (K) de um soluto com o seu Volume de retenção (V_r) e o Volume “morto” (V_0) referente à coluna (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

$$K = \frac{V_r - V_0}{V_0}$$

- Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

A eficiência ou número de pratos teóricos (N) é a medida de quanto o sistema está diluindo a banda do componente analisado durante a corrida cromatográfica, incluem-se neste sistema injetor, tubulações, conexões, coluna, fase móvel, fase estacionária e detector. Esta medida é o alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema (SHABIR, 2003).

$$N = 16(V_n/W)^2 \text{ ou } N = 5,54(V_n/W_{1/2})^2$$

Sendo:

V_n = Volume de eluição do pico

W = Largura do pico na linha de base

$W_{1/2}$ = Largura do pico na meia altura

- Fator de separação ou fator de seletividade (α)

O fator de separação ou fator de seletividade (α) compara a retenção de um componente (K_1) com a do outro componente (K_2) mais retido. Indica o quanto a fase estacionária ou a fase móvel interage com uma substância em comparação com outra. Valores de fator de separação maior que (1) um indica que o sistema está separando os componentes (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

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

- Resolução (R)

A resolução (R) mede o grau e a qualidade da separação entre dois sinais cromatográficos em um determinado sistema. Pode ser calculada a partir da largura dos picos e seus respectivos tempos de retenção. A resolução é afetada pela retenção (K), pela seletividade (α) e pela eficiência (N) de forma diferente (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

- Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do sinal cromatográfico (As)

O fator de cauda (FC) determina o formato do sinal cromatográfico. A Farmacopéia Americana adota o fator de cauda calculado a 5 % da altura do sinal. Outro modo de caracterizar o formato do sinal cromatográfico é determinando o fator de assimetria (As), que é calculado a 10 % da altura do sinal cromatográfico (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001; USP 30 2007).

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

Sendo:

$W_{0,05}$ = Largura do sinal a cinco por cento da altura

f = Distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a cinco por cento da altura.

- Desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV)

O desvio padrão relativo (DPR) é o parâmetro da adequação do sistema que mede a repetitividade do método analítico entre as injeções da mesma amostra contida no mesmo frasco.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} 100$$

Sendo:

DPR = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação

DP = desvio padrão das replicatas

CMD = concentração média determinada

1.7.1 – Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema

Vários fatores afetam a seletividade (α), a retenção (K) e a eficiência (N) e conseqüentemente alteram a resolução do sistema. A seletividade (α) além de ser controlada pelas características químicas da fase móvel, também é afetada pelo pH da fase móvel e pelas características químicas da fase estacionária. A retenção (K) além de ser afetada pela polaridade da fase móvel, também é afetada pela polaridade da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001). A eficiência (N) é determinada pelo tamanho médio das partículas da fase estacionária e pela forma destas partículas (esférica ou irregular), uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, carga (massa) de amostra injetada, tempo de retenção do sinal, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra coluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc.) (CASS et al., 2001; FERRAZ, 2001).

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados para garantir a adequação do sistema de acordo com a USP 34,2011; NATA, 2006, ICH, 2005; são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de adequação do sistema.

Parâmetros	NATA, 2006; ICH,2005; USP, 2011
Fator de retenção (K)	$1 < K < 10$
Nº. de pratos teóricos (N)	Em geral $N > 2000$
Resolução (R)	$R > 2$
Fator de cauda (TF)/ Assimetria	$TF < 2$
Repetitividade (DPR)	DPR < 1%, para $n > 5$

1.8 – VALIDAÇÃO

A validação é definida legalmente como o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros (BRASIL, 2001).

Na literatura, inúmeras definições são encontradas para o termo validação de métodos, sendo algumas:

- Validação de um método estabelece, por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e às normas estabelecidas por agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), *United States Pharmacopeia* (USP), *International Conference on Harmonisation's* (ICH), *International Standard Organization* (ISO), *American Society for Testing and Materials* (ASTM) (VALDERRAMA et al., 2009);
- Inclui a determinação dos parâmetros de desempenho de um método, estabelecendo quais influências podem alterá-los e demonstrando que o método é adequado para o uso (MAC NEIL, PATTERSON & MARTZ, 2000);
- É o processo de determinação de um requisito analítico e de confirmação de que o método possui capacidade de desempenho consistente com os requisitos de aplicação (EURACHEM, 1998);
- É o processo que confirma que um procedimento analítico empregado para um teste específico é adequado para seu propósito de uso (HUBER, 1998);
- Em análises físico-químicas, a validação tem por objetivo a produção de resultados confiáveis estando, o laboratório e o método escolhido ou desenvolvido, voltados para tal (LEITE, 2002).
- A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. O método deverá então atender a uma série de parâmetros, que variam de acordo com a sua finalidade, para ser considerado validado (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

Começaram na década de 1980 a tentativa de cooperação entre diversas organizações internacionais, com objetivo da harmonização de protocolos que contemplassem informações, características e desempenho de métodos de análise, pois já era compreendido que o objetivo de uma análise é gerar informações

confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra e garantir que o método analítico preencha estes requisitos.

A maioria dos países tem estabelecido seus próprios documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas na validação de métodos analíticos. Nesse processo, atributos são determinados e avaliados, sendo estes importantes partes de um programa de garantia de qualidade, tendo como objetivo principal assegurar que um método seja adequado aos fins para os quais tenha sido planejado. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Para a validação de um método, a avaliação de cada parâmetro vai depender de sua aplicabilidade. Estes termos são também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2008).

Mundialmente, uma metodologia analítica para validação de um novo método é dividida em quatro categorias, segundo a maioria dos órgãos reguladores, sendo estas:

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
- Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
- Categoria III – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
- Categoria IV – Testes de identificação (BRASIL, 2003).

A legislação atual é a resolução RE (resolução específica) 899 de 29 de maio de 2003 na qual se estabelece os parâmetros para a validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (BRASIL, 2003), não só para medicamentos, mas também para todos os produtos de âmbito sanitário.

A validação é um pré-requisito para atividades sujeitas à vigilância sanitária. Desde 1999, a Anvisa descreve grande importância à validação por normatizar, disciplinar e regulamentar critérios para registro de produtos, qualificando a validação de métodos analíticos como um dos pré-requisitos para o registro (ANVISA, 1999).

No Brasil, além da Anvisa, o Inmetro, disponibiliza um guia para o procedimento de validação de métodos analíticos, o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 (Revisão nº 03), de fev/2010 (RIBANI et al., 2004).

Para cada categoria de elaboração de métodos analíticos desenvolvidos, um conjunto de ensaios é exigido. Nas tabelas 6 e 7 são mostradas as exigências feitas pela Anvisa e Inmetro, respectivamente. Apesar das diferenças de nomenclatura, os parâmetros são muito semelhantes, com a exceção de ensaios limites que não são preconizados no documento do Inmetro.

Tabela 6: Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa

Parâmetros	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		A	B		
Exatidão	S	S	*	*	N
Limite de Detecção	N	N	S	*	N
Limite de Quantificação	N	S	N	*	N
Linearidade/ Faixa linear	S	S	N / *	*	N
Precisão / Repetibilidade	S	S	N	S	N
Precisão Intermediária	**	**	N	**	N
Robustez	S	S	*	*	N
Especificidade / Seletividade	S	S	S	*	S

A – Ensaio quantitativo

B – Ensaio limite

* dependendo da natureza do ensaio específico pode ser necessário

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da precisão intermediária

(Adaptado de BRASIL, 2003)

Tabela 7: Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro

Parâmetros	Ensaio qualitativo	Determinação do componente principal	Análise de traços	Propriedades físicas
Exatidão	N	S	S	S
Limite de Detecção	N	N	S	N
Limite de Quantificação	N	N	S	N
Linearidade/ Faixa linear	N	S	S	S
Precisão / Repetitividade	N	S	S	S
Precisão Intermediária	N	S	S	S
Robustez	S	S	S	S
Especificidade / Seletividade	S	S	S	S

(Adaptado de Inmetro, 2007).

A seguir serão discutidos os principais parâmetros avaliados em métodos para a determinação do constituinte principal.

1.8.1 – Especificidade (resolução) e seletividade (pureza do sinal)

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outras substâncias de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes, garantindo que o sinal de resposta seja exclusivamente da substância de Interesse (VESSMAN et al., 2001). A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método.

Os ensaios de especificidade requerem um conhecimento amplo de toda natureza do produto a ser estudado, como, por exemplo, excipientes e suas características, impurezas de síntese e degradação, onde muitas vezes faz-se necessário expor os produtos a condições de estresse para avaliar a formação das substâncias formadas por degradação acelerada (INMETRO, 2007; HIENE, 2009).

A seletividade pode ser assegurada de várias maneiras. Comparando os cromatogramas da matriz isenta do analito e da matriz adicionada do analito, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito. Deve-se observar que o analito incorporado à matriz precisa ser mantido da mesma forma ativa para ser garantida a seletividade.

A segunda maneira é através da avaliação com detectores com arranjo de diodos ou espectrômetro de massas, que permitem a comparação do espectro do composto separado com o do analito puro, utilizado como uma indicação da presença do composto puro. Estas técnicas são as mais utilizadas (RIBANI, 2008).

O método de adição de analito também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, quando não for possível obter uma matriz isenta do analito. Neste caso é construída uma curva analítica com adição do analito na matriz e outra sem a matriz.

Os resultados destas duas curvas e seus coeficientes são então representados em um mesmo gráfico em função da concentração do analito adicionado. Se as inclinações de regressão destas duas curvas não diferirem significativamente, pode-se garantir que não há interferência da matriz (RIBANI, 2008).

1.8.1.1 – *Efeito matriz*

Efeito matriz pode-se dizer que é o efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz, é calculado para verificar se há um aumento ou diminuição da resposta do detector de um analito presente na amostra, quando comparado ao mesmo analito presente no solvente, gerando desse modo, uma resposta errada (CARDOSO, 2008).

Testes de efeito de matriz consistem no preparo de curvas analíticas simples e curvas de materiais de referência ou de adição do analito. As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais (AGUIAR, 2007).

A gama de concentrações por adição de padrão deve ser a mesma que a da matriz de calibração para que ambos possam ser comparados com diferença significativa (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; NATA, 2009).

Segundo Thompson et al.(2002), é necessário avaliar se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas para o solvente e para matriz são significativamente diferentes através do teste t (Student). Para esse caso indica-se avaliar primeiramente se as variâncias residuais das duas curvas são significativamente diferentes, através do teste F para em seguida aplicar o teste t mais apropriado (SNEDECOR & COCHRAN, 1989; BRUCE et al., 1998; INMETRO, 2007).

1.8.2 – Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (SWARTZ & KRULL, 1998; ICH, 2005).

Além disso, a linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (ICH, 2005; INMETRO, 2010).

Souza & Junqueira, 2005, realizou esta avaliação através de uma planilha, que foi denominada de planilha de linearidade de curva analítica. Os parâmetros envolvidos na avaliação, além da linearidade pelo coeficiente de correlação são:

Homocedasticidade (Teste de Brown-Forsythe); Significância da regressão e o desvio de linearidade; Verificação da dispersão dos resíduos; Autocorrelação dos resíduos (Teste de Durbin-Watson); Normalidade dos resíduos (Teste de Ryan-Joiner); e limites de detecção e de quantificação.

A tabela 8 descreve os parâmetros envolvidos, a justificativa de sua utilização e avaliação. A exposição das considerações e cálculos envolvidos apresenta-se descritos no ANEXO A.

Tabela 8: Parâmetros da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica

Teste	Justificativa	Avaliação
<i>Significância da regressão</i>	Verificar se a regressão é significativa.	Na regressão: $p < 0,001$
<i>Desvio de linearidade</i>	Verificar a adequação do modelo estatístico	No ajuste: $p > 0,05$
<i>Coefficiente de correlação linear</i>	Verificar a correlação entre os resultados e a concentração do analito	$r > 0,90$ (Inmetro) $r > 0,99$ (Anvisa)
<i>Gráfico de resíduos</i>	Observar a dispersão de resíduos nos limites estabelecidos	Desejável que estejam o mais próximo possível da linha central
<i>Normalidade de resíduos</i>	Verificar a tendências dos resíduos obedecerem a distribuição normal	$R_{eq} > R_{crit}$
<i>Autocorrelação de resíduos</i>	Verificar a independência dos resíduos	Independentes: $d_{calc} > dU$ Dependentes: $d_{calc} < dL$ Inconclusivo: $dL < d_{calc} < dU$
<i>Homogeneidade</i>	Verificar a homogeneidade das variâncias dos resíduos	$p > 0,05$

Adaptado de (SOUZA e JUNQUEIRA, 2005; VALE, 2010)

1.8.2.1 – Faixa de trabalho

Para a análise quantitativa, a faixa de trabalho para um método é determinada pelo exame de amostras com diferentes concentrações de analito e determinação da faixa de concentrações, para qual a incerteza admissível possa ser alcançada. A faixa operacional é geralmente mais extensa do que as faixas lineares, que é determinada pela análise de um número de amostras de concentrações de analito. A concentração mais esperada da amostra deve se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações (INMETRO, 2010). Em geral, serão necessários vários pontos de calibração, de preferência mais que seis. O Inmetro recomenda 7(sete), 3(três) de valores inferiores e 3(três) valores superiores à concentração da amostra.

1.8.3 – Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e em um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos que podem ser utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, comparação de métodos, utilização de ensaios de recuperação e o método de adição de padrão (RIBANI et al., 2004).

O uso de Materiais de Referência Certificados (MRC), (quando disponíveis) são preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais, porém como nem sempre estão disponíveis acaba-se preferindo o uso de ensaio de recuperação.

Podemos dizer que a recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (CAUSON, 1997).

A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo, como por exemplo, perda da substância de baixa recuperação de extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros). A Anvisa recomenda que este parâmetro seja estimado como a razão destas duas concentrações, e estabelece que a exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata (RIBEIRO, 2008).

O guia ICH (1995 e 2005) recomenda que a exatidão deva ser estabelecida ao longo de toda a faixa de calibração especificada para o procedimento analítico somente após a precisão e a linearidade terem sido estimadas.

Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a fórmula:

$$\text{Rec\%} = \frac{(C1 - C2)}{C3} \cdot 100$$

Onde:

Rec %: Recuperação em percentual

C1 = concentração de analito na amostra adicionada de padrão

C2 = concentração de analito na amostra não adicionada de padrão

C3 = concentração de analito na solução padrão

Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Tais valores, sugeridos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* em HORWITZ, 1982, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Recuperação do analito em função de sua concentração na amostra

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito(%)
> 10	98 - 102
> 1	97 - 103
> 0,1	95 - 105
> 0,01	90 - 107
0,001 - > 0,00001	80 - 110
> 0,000001	60 - 115
> 0,0000001	40 - 120

(HORWITZ, 1982, INMETRO, 2010)

1.8.4 – Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. Também é expressa geralmente em função da concentração de analito, e esta dependência deve ser determinada e documentada. Pode ser expressa por meio de diferentes maneiras, dependendo das condições em que ela for calculada (BRASIL, 2004; ICH, 2005).

O termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, e seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo, ou DPR, para análises de amostras contendo a mesma quantidade das espécies de interesse. O DPR é ainda conhecido como CV (coeficiente de variação), ou ainda pela sigla RSD proveniente do inglês “relative standard deviation” (RIBANI, 2008).

A precisão pode ser estimada em três níveis: repetitividade (precisão intra-dia), precisão intermediária e reprodutibilidade.

1.8.4.1 – *Repetitividade*

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (condições de repetitividade), com o mesmo procedimento; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2010).

A repetitividade pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão de repetitividade (DPRr). A expressão a seguir é usada para o cálculo do DPRr (INMETRO, 2010).

$$\text{DPRr} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \cdot 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

O guia ICH, 2005 e BRASIL, 2003 recomendam que sejam realizadas nove determinações contemplando toda a faixa de calibração, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com amostras em triplicata, ou um mínimo de seis determinações em amostras contendo uma concentração equivalente à concentração média da faixa de calibração. O INMETRO, 2010 recomenda que sejam realizadas de sete a nove replicatas para o cálculo do DPR. Cabe ressaltar que o termo utilizado em inglês é “repeatability”, no Brasil, o Inmetro adota o termo repetitividade e a Anvisa adota o termo repetitividade, porém o objetivo de análise é o mesmo (RIBEIRO, 2008).

1.8.4.2 – *Precisão intermediária*

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Esta

medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável a usar (INMETRO, 2010).

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetua-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a mesma amostra, nas condições pré-definidas. É feita por meio de t valores de n ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermediária baseia-se na dispersão entre os ensaios. É recomendado que o valor “t (n-1)”, seja, pelo menos, igual a quinze (INMETRO, 2010). Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo, existem vários métodos para a determinação e controle desse parâmetro de qualidade, um destes métodos é usando a expressão abaixo (INMETRO, 2007).

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

Sendo:

Si () = desvio-padrão de precisão intermediária (onde os símbolos relativos as condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parênteses)

t = total de amostras ensaiadas

n = total de ensaios efetuados por amostra

j = número da amostra, j = 1, t

k = número do ensaio da amostra j, k = 1, n

Y_{jk} = valor do resultado k para amostra j

Y_j = representa a média aritmética dos resultados da amostra j

1.8.5 – Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010; USP 34,2011).

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem

ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (HEYDEN, 1994). Vale ressaltar, que para o desenvolvimento da validação, a verificação da adequação do sistema cromatográfico da análise deve ser realizado e utilizado como fatores de avaliação para o teste de robustez.

Para determinar a robustez de um método, o Inmetro recomenda o teste de Youden (INMETRO, 2007). Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, sem perder sua confiabilidade. Por este teste são realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e verifica-se qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividades aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (TEIXEIRA, 2008).

A robustez de um método pode ser estimada variando-se os parâmetros analíticos e comparando a precisão obtida em cada determinação. Segundo, USP 34, esses parâmetros podem variar de um determinado método para outro.

A tabela 10 demonstra alguns exemplos de parâmetros de podem ser variados e o quanto podem ser variados em análises por CLAE.

Tabela 10: Fatores permitidos à variação para o teste de robustez, segundo a USP, 34.

Fatores a serem variados	Valores permitidos
Variação do pH da fase móvel	+/- 0,2 unidades
Variação da composição da fase móvel (orgânica)	+/- 10%
Fluxo da fase móvel	+/- 50%
Concentração de sais no tampão da fase móvel	+/- 10% da concentração, considerando a variação permitida para o pH final da fase
Comprimento da coluna cromatográfica	+/- 70%
Diâmetro interno da coluna	+/- 50%, se velocidade linear é mantida constante
Tamanho da partícula interna da coluna	Não pode ser aumentado, se diminuído, até 50%
Diferentes lotes ou fabricantes de coluna	-
Temperatura (°C)	+/- 10°
Volume de injeção (µL)	Não pode ser aumentado, se diminuído, levar em consideração LD (limite de detecção)

Para determinação da robustez, denominam-se os fatores nominais por letras maiúsculas, de A a G e a variação dos sete diferentes fatores, por letras minúsculas. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória (INMETRO, 2007).

1.9. – RELEVÂNCIA DO ESTUDO PARA A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Laboratórios oficiais do Brasil têm como missão auxiliar nas ações de vigilância sanitária, avaliando produtos, emitindo resultados de ensaios analíticos exatos e confiáveis, o que é essencial para a confiabilidade no trabalho.

Vale ressaltar que, o INCQS além de ser o laboratório de referência para os LACENS, no que se refere à implantação de metodologias e aprimoramento da capacidade analítica, é também o único Laboratório que analisa bolsas de coleta de sangue na sua totalidade de ensaios, o que confere a esta instituição a exclusividade, preconizado em legislação (BRASIL, 1998), de análise prévia ao registro deste produto.

A determinação do teor de adenina por CLAE, demanda a validação analítica, pois as modificações são significativas.

Validar a metodologia proposta confere ao INCQS a possibilidade de propor alterações no Regulamento técnico deste produto e, portanto, alteração da legislação vigente, pelo Coordenador do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA.

2 – OBJETIVO

2.1 – OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar novo método analítico para a determinação de adenina em solução de bolsa de sangue por CLAE- UV.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver novo método analítico para a determinação de adenina em solução de bolsa de sangue;

Avaliar o novo método desenvolvido quanto aos passos iniciais para um plano mestre de validação;

Realizar validação analítica para o método desenvolvido de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação vigente.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Equipamentos

Para os experimentos de cromatografia líquida foram utilizados três sistemas de CLAE, instalados no Departamento de Química do INCQS. As características específicas de cada um são descritas abaixo.

- Sistema 1 (Shimadzu): detector ultravioleta SPD – M 10A, bomba LC -20AT, forno CTO-10A, injetor automático SIL-20 A, usando para aquisição de dados o Software: LC-20 Solution. A maior parte dos experimentos foi realizada nesse sistema, que é mostrado na figura 3.
- Sistema 2 (Shimadzu): detector ultravioleta (espectrofotométrico) por arranjo de diodos SPD-M10A, bomba LC-10AD, forno CTO-20A e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp.
- Sistema 3 (DIONEX) detector ultravioleta; Compartimento de coluna: TCC – 30000, bomba: LPG 3400A e injetor automático : WPS – 3000. Programa usado na aquisição dos dados Chromeleon: Versão: 6.80 SR6.



Figura 3- Cromatógrafo líquido, com detector ultravioleta-visível (Shimadzu) completo usado em todos os requisitos da validação.

3.1.2 – Reagentes

Os reagentes utilizados foram fornecidos pela Sigma e Merck, sais grau P.A e solventes grau HPLC . A água grau CLAE foi obtida passando água destilada por um sistema de purificação Millipore A-10.

A substância química de referência utilizada foi o padrão de adenina da USP, lote corrente durante a realização dos experimentos (J2E294). O padrão foi seco em estufa a 110°C por 3 horas, conforme orientação do fabricante.

3.1.3 – Colunas cromatográficas

As seguintes colunas foram utilizadas para a realização do trabalho.

- Coluna Nucleosil - 100 C-18 (de tamanho de partícula 5,0 μm ; dimensões de 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento (5 μm – 250 x 4 mm), fabricante Macherey- Nagel. Lote: 1204
- Coluna Symmetry® de fase reversa de sílica recoberta com octilsilano (C₈) de partícula 5,0 μm , dimensões de 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento (5 μm – 250 x 4,6 mm), fabricante Waters lote: W13311.
- Coluna Lichrospher® de fase reversa de sílica recoberta com octilsilano (C₁₈) de tamanho de partícula 5,0 μm ; dimensões de 4 mm de diâmetro interno e 125 mm de comprimento (5 μm – 125 x 4mm), fabricante Merck lote L 448333
- Coluna Novapack® de fase reversa de sílica recoberta com octilsilano (C₈) de tamanho de partícula 5,0 μm ; de 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento (5 μm – 250 x 4,6mm), fabricante Shimadzu lote PN 228-17874-92

3.1.4 – Amostras

A amostra escolhida para este estudo foi a que continha solução do tipo CPDA, por tratar-se da solução de maior complexidade e, portanto, de maior criticidade quanto ao número de substâncias diferentes em uma mesma solução.

A marca escolhida foi a de um detentor de registro com maior índice de envio de amostras para análise prévia, segundo o Sistema Gerenciamento de Amostras/INCQS.

Em paralelo foi preparada solução placebo, com concentração das substâncias existentes na solução conservadora, excetuando a substância a ser investigada, a adenina.

A solução que simulou a solução conservadora sem a adenina foi preparada pela pesada direta de fosfato diácido de sódio monoidratado (2,22 gramas), glicose anidra (29,0 gramas), citrato de sódio diidratado (26,295 gramas), cloreto de sódio (6,535 gramas), e ácido cítrico anidro (3,0 gramas) diluídos em água tipo I para 1000,0 mL.

3.2 – MÉTODOS

No caso do desenvolvimento de nova proposta de metodologia analítica para a dosagem de adenina em bolsas de sangue foi imprescindível avaliar dados anteriores e perceber a relevância e o impacto dos ensaios envolvidos neste produto de alto risco, conforme Resolução RDC 185 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) e de grande impacto na saúde pública.

3.2.1 – Otimização do método cromatográfico

Para a otimização do método cromatográfico foram testadas diferentes colunas, composição da fase móvel quanto a concentração de pareador iônico e de modificador orgânico (ACN), a partir do método descrito por FUST, 2009. Na tabela 11, encontram-se as especificações do método a ser validado, após modificações.

Tabela 11: Parâmetros da metodologia analítica desenvolvida

Parâmetro cromatográfico	Especificação
Coluna cromatográfica	Coluna SYMMETRY® C ₈ (5,0µm, 4,6 x 250 mm d.i.) – Part nº WAT 054270 -
Forno	Temperatura: 40°C
Detector de UV	Comprimento de onda 262 nm
Detector de DAD	Faixa de 200-380nm
Fase móvel	2,5% (v/v) de AcOH + 200 mg AcONH ₄ + 50mg HSS + 5% ACN (v/v)
Fluxo	Fluxo: 0,6 mL/min ; Isocrático
Volume de injeção	20 µL

3.2.2 – Validação do método

3.2.2.1 – Adequação do sistema

Para a determinação dos parâmetros de adequação do sistema, as soluções de padrão de adenina USP (0,0264 mg/mL) diluídas em fase móvel com auxílio do ultrasson, durante 5 minutos, foram injetadas 20 μ l no cromatógrafo – Sistema 1 – Shimadzu com detector de absorção molecular na região do ultravioleta-visível.

3.2.2.2 – Estabilidade da solução estoque padrão e da amostra de adenina

Foi pesada cerca de 30,0 mg de padrão de adenina. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolveu-se com 5,0 mL de solução 1:1 ácido acético P.A., com auxílio do ultrasson durante 5 minutos e completou-se o volume com água. Retirou-se uma alíquota 3,1 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL, o volume foi completado com o diluente (fase móvel). Concentração final de 0,0372 mg/mL

A solução de amostra da solução conservadora de bolsa de sangue tipo CPDA, foi preparada retirando uma alíquota de 7,0 mL da solução conservadora e diluindo com fase móvel em balão volumétrico de 50,0 mL. Ambas foram filtradas em membrana 0,45 μ m. Concentração final aproximadamente 0,0385 mg/mL. Em seguida as soluções foram injetadas automaticamente por um período de 24 horas.

A avaliação foi realizada através da comparação das áreas obtidas a partir de injeções dessa solução. A comparação foi realizada a partir do cálculo de ANOVA, utilizando a distribuição F, onde a hipótese nula é de que não há diferença estatisticamente significativa entre as áreas.

3.2.2.3 – Avaliação da seletividade

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade, uma vez que o método deve ser capaz de identificar a adenina inequivocamente na presença dos demais componentes da solução da bolsa.

Para avaliar a seletividade foram injetados 20 μ L das soluções padrão de adenina (0,033 mg/mL), placebo e a solução da bolsa, no Sistema cromatográfico 3.

Para avaliar se o tratamento térmico que as bolsas são submetidas no processo de esterilização gera algum interferente na análise cromatográfica, as três soluções foram condicionadas em autoclave sob temperatura de 121°C e pressão de 2 atm por 20 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, 20 µL de cada solução foram injetadas no sistema cromatográfico.

A pureza espectral do sinal também foi avaliada através da leitura na faixa de 200 a 400 nm, tanto dos padrões, placebo e amostra, avaliando a pureza espectral de todos os compostos a fim de confirmar a seletividade do método na separação da adenina frente aos interferentes do extrato. Foram feitas comparações dos espectros antes e depois da condição de stress.

3.2.2.3.1 – *Verificação do efeito matriz*

O procedimento para avaliação do efeito da matriz foi o realizado através do preparo de uma curva analítica em solvente e uma curva de adição do analito, com soluções padrão com 3 níveis de concentração, no início, meio e fim da concentração, igualmente espaçados.

A avaliação do efeito da matriz incluiu a análise de dados e os testes de premissas conforme Anexo C (delineamento experimental da linearidade). Após a análise da linearidade, o efeito da matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções determinadas para as curvas de adição do analito.

A curva de adição padrão foi realizada nas concentrações dos pontos extremos e no ponto central da concentração da curva analítica, e também a análise e comparação das inclinações com os mesmos pontos da curva analítica,

A estatística utilizada para avaliar esse efeito através da comparação dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas está apresentada em tabelas que se encontram nos Anexos B e C, e também como proceder a suas determinações.

3.2.2.4 – *Avaliação da linearidade*

A linearidade do método foi estudada através do preparo de 3 curvas analíticas em sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível, sendo que as soluções foram injetadas em ordem aleatória (SOUZA, 2007).

Os resultados obtidos foram avaliados inicialmente segundo BRASIL, 2003, para aceitabilidade segundo o coeficiente de correlação (r).

As concentrações de adenina em cada solução são mostradas na tabela 12.

Na segunda etapa de avaliação da linearidade foram plotadas as médias correspondentes a cada nível de concentração, conforme tabela desenvolvida por SOUZA & JUNQUEIRA para as seguintes avaliações: i) aplicação do MMQO, incluindo estimativa dos parâmetros da regressão e tratamento dos valores extremos; ii) estimativa da inclinação, interseção, resíduos da regressão, respectivas variâncias e R^2 e r ; iii) construção e inspeção visual do gráfico x-y das respostas versus a concentração do analito; iv) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2007).

A terceira etapa consistiu na validação do uso do MMQO por meio da verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; iii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; e iv) verificação da significância da regressão e do ajuste ao modelo linear por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007).

Tabela 12 - Concentrações das soluções de trabalho da adenina.

Padrões/ Solução	Concentração final (mg/mL)
A	0,0264
B	0,0300
C	0,0336
D	0,0372
E	0,0408
F	0,0444
G	0,0480

3.2.2.4.1 – Faixa linear de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores de propriedades no qual o método pode ser aplicado.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com a concentração do analito ou valor de propriedade (INMETRO, 2007). Para a avaliação de linearidade foram preparadas curvas na seguinte faixa de concentração de adenina: de 0,0264 a 0,0480 mg/mL.

3.2.2.5 – Avaliação da exatidão

Foi preparada uma curva analítica com (sete níveis) com adição-padrão em soluções originadas de um fabricante de bolsa de sangue do tipo CPDA, cujo teor de adenina foi previamente determinado, pelo teste de precisão intermediária.

Essa solução foi diluída até a concentração de 0,0264 mg/mL. A essa solução foram adicionadas alíquotas de solução padrão de adenina, até as concentrações finais mostradas na Tabela 13.

A Exatidão foi comprovada pelo o cálculo da recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão.

Tabela 13 - Concentrações finais de Adenina nas soluções para estudo de recuperação

Amostra	1,045 mL (0,0264 mg)						
Total (mg/mL)	0,0264	0,0300	0,0336	0,0372	0,0408	0,0444	0,0480

A faixa de concentração da adenina na bolsa de sangue tipo CPDA é de 0,0275% (275mg/Kg), ou seja, o índice de recuperação deverá estar entre 90-107%, conforme tabela 9.

3.2.2.6 – Avaliação da precisão

3.2.2.6.1 – Repetitividade

Neste estudo um analista trabalhou com dez alíquotas da amostra da solução de bolsa de sangue CPDA, que foram injetados no mesmo equipamento em um dia, injetando 3 repetições de cada alíquota. Determinaram-se o teor de adenina no lote analisado, sendo determinados o desvio padrão(s) e o desvio padrão relativo percentual de repetitividade (DPRr) dos teores encontrados e estes foram comparados com os limites estabelecidos em função da concentração de analito.

A concentração média teórica de cada balão contendo amostra era de 0,0385 mg/mL. Foram preparadas dez alíquotas de amostra na concentração aproximada do ponto médio da curva analítica da adenina.

3.2.2.6.2 – Precisão intermediária

Foram feitas determinações analíticas do teor da adenina em dez alíquotas da amostra em teste por 3 analistas em dias e equipamentos diferentes.

Para cada lote analisado determinou-se o desvio-padrão DPRr e o (Si), estes foram comparados com limites estabelecidos em função da concentração de analito.

3.2.2.7 – Determinação da robustez

Foram realizadas injeções em triplicatas da solução de adequação do sistema do padrão de adenina (preparadas conforme item 3.2.2.1), sob oito combinações de ensaios diferentes.

A Tabela 14 mostra as variações nos fatores escolhidos para esse estudo. O grau da variação para os fatores do método em estudo foi utilizado, segundo suplemento USP 34 (2011), no item sobre “Ajustes em métodos por CLAE”.

Tabela 14: Variações nos fatores para a determinação da robustez

Fatores Variados	Nominal	Letra	Varição	Letra
1 . Estabilidade das soluções	1 dia preparo	A	2 dias preparo	a
2. Diferente fabricante de coluna	Waters	B	Shimadzu	b
3. Composição da fase móvel	5 % orgânico	C	+/- 1% orgânico	c
3. Fluxo da fase móvel	0,60 mL/min	D	+/- 0,05 mL/min	d
5. Temperatura da coluna	40 °C	E	+/-2 °C	e
6. pH da fase móvel	2,8	F	0,1	f
7. Tempo de dissolução da adenina no ultra som	5 minutos	G	+/- 3 minutos	g

Depois de ensaiadas as oito combinações, os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema conforme Tabela 5 (resolução, assimetria, pratos teóricos e repetitividade das áreas). Em INMETRO, 2007, encontra-se um modelo de preparação de uma tabela formada por

uma matriz de fatores para determinação da robustez do método. A Tabela 15 representa esta matriz.

Tabela 15: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and St Wasterwater, 21 Edition, 2005

Quando a combinação 1 foi ensaiada, o resultado foi denominado “s”. No ensaio de combinação 2 o resultado foi “ t ” e assim sucessivamente, até que todas as oito combinações foram ensaiadas.

Para determinar a variação de um fator, devem-se encontrar os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e as quatro minúsculas e comparar as médias dos dois grupos.

$$R(C) = \frac{s + u + w + y}{4} \quad \text{e} \quad R(c) = \frac{t + v + x + z}{4}$$

Sendo:

R(C) = alteração para C (média)

R(c) = alteração para c (média)

s,u,w,y = resultados quando são feitos os ensaios conforme as combinações 1,3,5 e 7 respectivamente

t,v,x,z = resultados quando são feitos os ensaios conforme as combinações 2,4,6 e 8 respectivamente

Por exemplo, ao calcular as alterações de C para c (conforme a Tabela 15, que se refere ao fator 3, o efeito (E3) da variação da composição da fase móvel de

5% orgânico para 4 ou 6% orgânico. O cálculo do efeito da variação do fator C para c é dado pela expressão abaixo

$$E3(C/c) = R(C) - R(c)$$

Sendo:

$E3(C)$ = efeito três (E3) no resultado da variação de C para c

Cada um dos sete efeitos será calculado para obter as sete diferenças (E1 a E7), que foram ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado (INMETRO,2007).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Na otimização de métodos de análise por cromatografia, uma das metas é o equilíbrio entre o menor tempo de análise e uma adequada resolução dos sinais analíticos. De acordo com Jorge (2010), o primeiro objetivo de um processo de separação é obter uma resolução adequada dos componentes. A resolução pode ser melhorada variando o fator de separação (α), o número de pratos teóricos (N) ou o fator de capacidade (k). Sabe-se que um aumento do fator de separação resulta no deslocamento do centro do sinal de uma substância, logo, a um aumento rápido da resolução. E ainda, no caso deste estudo um aumento no número de pratos teóricos resulta em sinais mais estreitos e mais altos. Verifica-se, no entanto, que a alteração que provoca um efeito mais acentuado na separação é a alteração do fator de capacidade. Quando este se encontra entre $0,5 < k < 2$, um aumento do seu valor pode provocar um aumento muito significativo na resolução. Entretanto, vale ressaltar que, o aumento do fator de capacidade pode diminuir a altura dos sinais e o tempo de separação pode ser aumentado. O valor de k deve estar entre 1 e 10 e pode receber influência do solvente utilizado. Assim foi direcionado este estudo, implementando modificações que permitissem adequar os parâmetros cromatográficos, modificações e testes realizados na coluna cromatográfica e composição da fase móvel.

As primeiras condições cromatográficas para a otimização da análise de adenina, diferente do que era determinado em compêndios oficiais, utilizava a coluna C₁₈, fase móvel com substância modificadora, neste caso o AcONH₄, além do HSS como pareador da adenina (FUST, 2009).

A curva analítica preparada nessas condições se mostrou linear, contudo, a avaliação de parâmetros importantes para a adequação do sistema, como o fator de assimetria, o fator cauda e o N (número de pratos teóricos), não estavam dentro dos valores recomendados em compêndios oficiais (USP, 34, BRASIL, 2003 e INMETRO, 2010), remetendo o estudo a uma nova avaliação das condições para que a validação da metodologia fosse realizada.

Neste contexto, as medidas utilizadas com o objetivo de melhorar o método deveriam sanar esses dois problemas (SNYDER, 1997).

A primeira modificação foi a utilização de uma coluna Nucleosil-100 C-8, fase estacionária de natureza polimérica, possibilitando a utilização de fases móveis muito alcalinas. Nessa faixa de pH(10 a 13), a adenina muito pouco se ioniza($pK_a = 9,8$), preponderando em solução a espécie não ionizada. Esperava-se dessa forma uma melhoria do fator cauda e da assimetria do sinal, pois haveria apenas uma espécie em solução. No entanto, a análise não foi satisfatória, observando que, nem todos os parâmetros de adequação de sistema haviam sido atingidos, um indicativo de dificuldades na reprodutibilidade da análise.

Neste contexto, ficou evidente a necessidade de verificar o aparato (colunas e fase móvel) utilizado, quanto a sua aplicabilidade na metodologia sugerida.

Os cromatogramas obtidos das análises para determinação da adenina, em coluna Nucleosil e diferentes composições de fase móvel com AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS e ACN utilizando detector de UV a 262 nm e com fluxo de 0,6 mL/min, podem ser observadas na Figura 4.

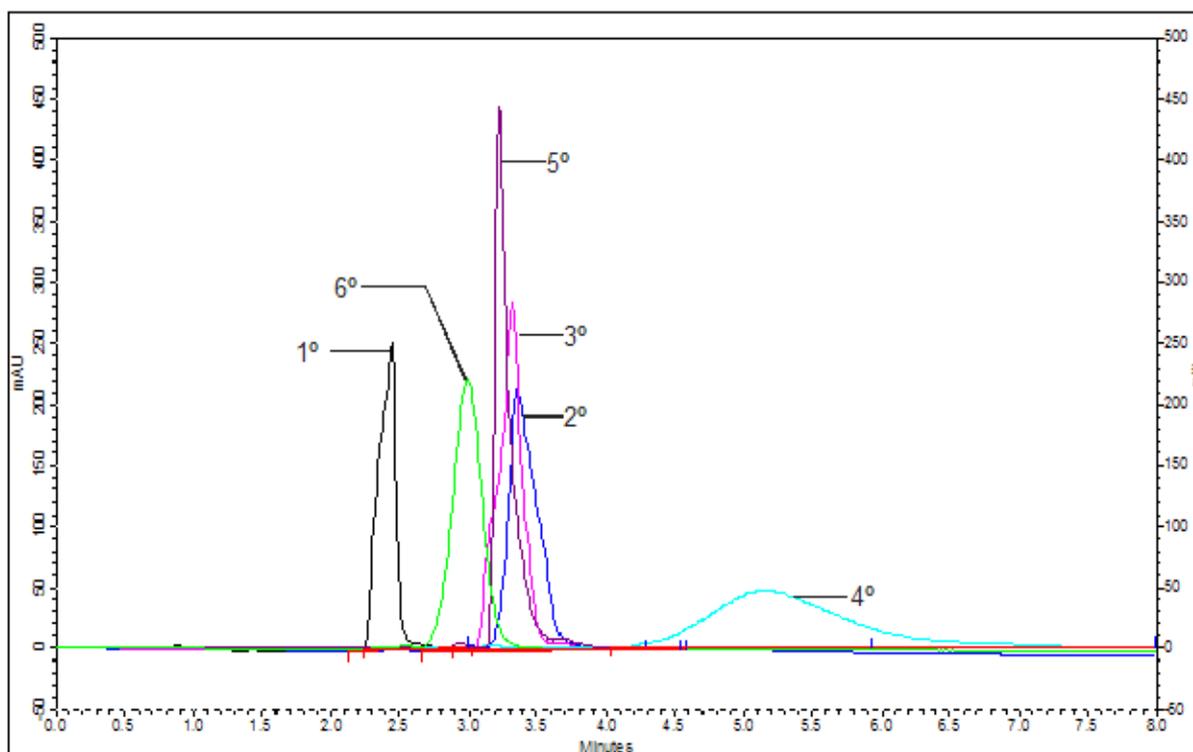


Figura 4: Representação das sobreposições dos cromatogramas obtidos nas condições proporcionais testadas na tabela 16, quanto ao pH e a concentração de substâncias da fase móvel.

Os valores referentes à adequação do sistema obtidos em cada sinal cromatográfico resultantes das variações realizadas no desenvolvimento do método estão descritos na Tabela 16, os quais não correspondiam aos parâmetros recomendados pelos compêndios oficiais, conforme descrito na tabela 5.

Tabela 16: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema com a coluna Nucleosil

	pH	T(C°)	ACN (%)	k (capacidade)	Ass	PT
1º	10,7		-	0,83	0,73	1176
2º	11,0	30	-	1,50	1,42	617
3º	11,4		5%	1,47	0,94	762
4º	11,0		-	2,84	1,44	132
5º	11,4	30	5%	1,23	2,62	3510
6º	13,0		-	1,05	1,0	628

Com isso, a importância de estudos preliminares é sublinhada, principalmente sobre estudos com a fase móvel, antecedendo pontos descritos na legislação vigente para validação de metodologias, assim como descrito por HIENE, 2009 na otimização e validação de metodologia analítica de seu trabalho conforme BRASIL, 2003.

A estratégia de trabalho com a adenina não ionizada, e uma composição de fase móvel simples não funcionou. Por esse motivo utilizamos a estratégia semelhante às anteriormente descritas (Tabela 4), com colunas de fase reversa baseadas em matriz de sílica e adição de um pareador iônico na fase móvel.

A protonação da adenina resulta em espécie iônica estabilizada por efeitos indutivos e ressonantes, que pode formar sal estável com pareadores ácidos, como HSS. Segundo Jorge (2010), a estratégia para desenhar uma separação com sucesso deve ser iniciada pela seleção da coluna mais adequada, de acordo com o método de separação escolhido. Por exemplo, na CLAE em fase reversa, utilizam-se geralmente colunas C₈ ou C₁₈, que tem uma boa interação com o pareador HSS.

Os cromatogramas obtidos com colunas de composição C₁₈ e C₈ Symmetry e diferentes composições da fase móvel, utilizando AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS e ACN, com leitura a 262 nm e fluxo de 0,6 mL/min, podem ser observados nas Figura 5.

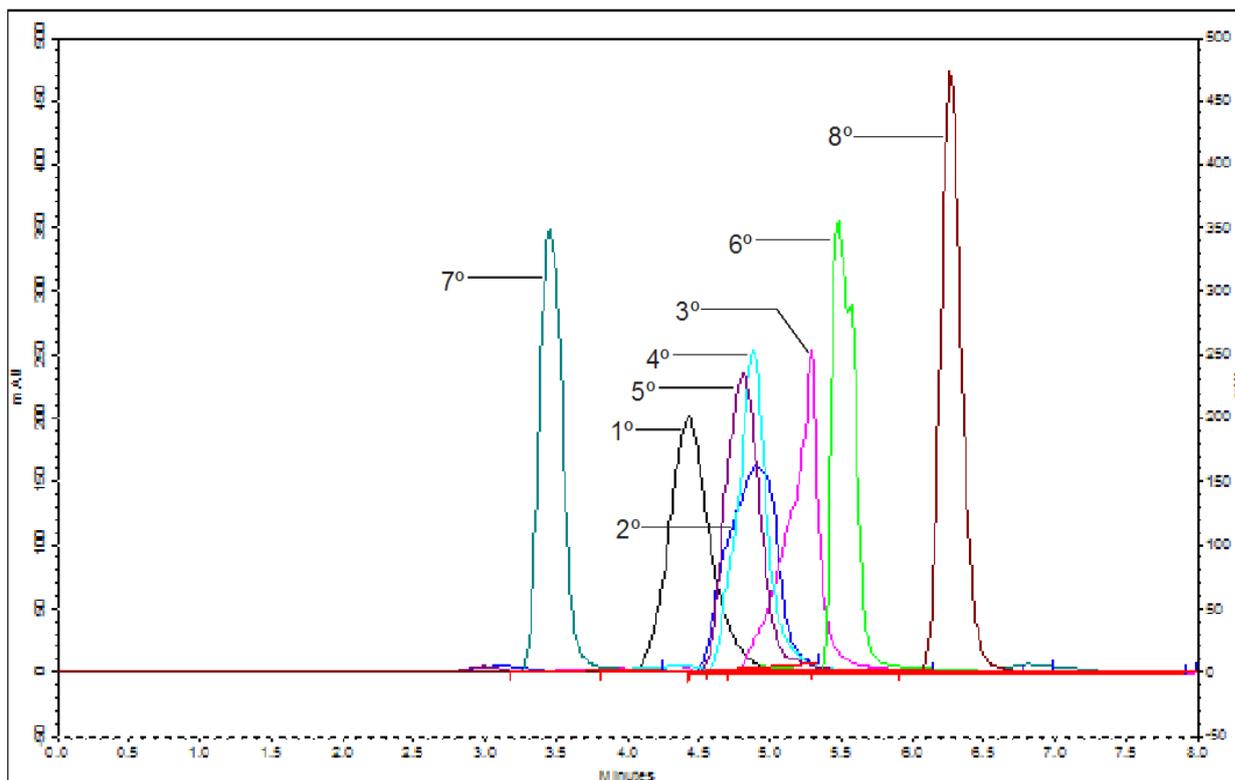


Figura 5: Representação da sobreposição dos cromatogramas obtidos nas condições proporcionais testadas na tabela 17, quanto ao pH, concentração de substâncias e temperatura do forno.

Os valores referentes à adequação do sistema obtidos em cada sinal cromatográfico resultantes das variações realizadas no desenvolvimento do método estão descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Resultados dos parâmetros de adequação do sistema com coluna C₁₈ e C₈ Symmetry

	Coluna symmetry	pH	Metanol (%)	ACN (%)	Temp(°C)	k	Ass	PT(n°)
1°	C ₁₈	3,0	-	5%	30	1,96	1,17	1040
2°	C ₈	4,0	10%	-	45	2,65	0,92	874
3°	C ₈	3,0	-	10%	40	2,94	0,74	1135
4°	C ₈	3,6	-	10%	40	2,64	1,11	1665
5°	C ₈	3,0	-	10%	45	2,58	1,13	1706
6°	C ₈	4,6	-	5%	45	3,08	1,75	6240
7°	C ₈	3,0	-	5%	30	1,57	1,16	1561
8°	C ₈	2,8	-	5%	40	2,91	1,22	7768

Podemos verificar os resultados dos parâmetros do sinal cromatográfico fora das especificações, (conforme descrito na tabela 5), em quase todas as combinações realizadas. No caso da última condição testada obtivemos a melhor

relação k' / Ass., pois utilizamos uma coluna hidrofóbica no caso C_8 adicionando um modificador forte (ACN) sendo obtido assim melhor resultado.

A escolha da fase móvel (água, AcOH, ACN, AcONH₄), com ajuste para pH 2,8 foi determinante para diminuição do fator cauda do sinal cromatográfico, como se pode observar na Figura 6. A temperatura de escolha é a de 40° C, fluxo de 0,6 mL/minuto com volume de injeção de 20 µL. Depois de estabelecer as condições quanto à fase estacionária e a composição da fase móvel, foi realizada, no cromatógrafo líquido, uma varredura na região do ultra-violeta que confirmou o comprimento de onda de 262 nm.

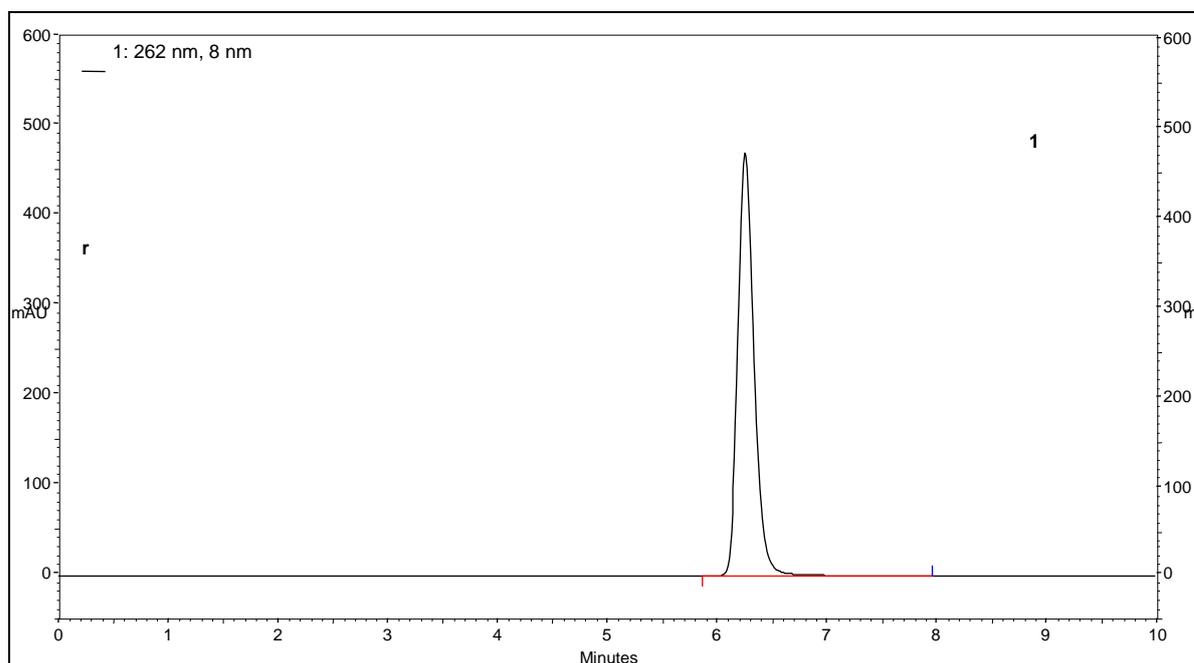


Figura 6. Cromatograma obtido por CLAE com coluna C_8 symmetry (4,6 x 250 mm - 5,0 µm d.i), concentração de adenina 0,0246 mg/mL, fase móvel: AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS e ACN 5% v/v (pH 2,8) temperatura de 40° C, fluxo 0,6mL/min, volume de injeção de 20 µL, detecção a 262 nm.

O tempo de retenção obtido foi em torno de 6,2 minutos, caracterizando um tempo de corrida pequeno que permite a análise de um grande número de amostras em curto período de tempo, o que agrega a este estudo um caráter prático, econômico e viabilidade para aplicação institucional.

Conclui-se que a otimização originou um novo método, com parâmetros viáveis à validação segundo legislação vigente, BRASIL, 2003; INMETRO, 2010 e USP 34,2011.

4.2 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

4.2.1 - Adequação do sistema

A primeira avaliação feita para validação do método foi averiguar as variações dos parâmetros de adequação do sistema analítico.

Realizou-se então 6 replicatas da corrida cromatográfica para então fazer uma média dos valores de adequação do sistema. Na Tabela 18 estão indicados os valores médios e seus respectivos coeficientes, fatores de cauda e de retenção, o número de pratos teóricos e a repetitividade das áreas.

Tabela 18: Valores de adequação do sistema do sinal cromatográfico

Parâmetro cromatográfico	Padrão adenina (cv)	Amostra adenina (cv)
Números de pratos teóricos	7797 (1,7%)	7317(1,8%)
Fator de capacidade/ retenção	2,9 (0,3%)	2,9 (0,26%)
Assimetria	1,2 (1,7%)	1,2 (1,9%)
Repetitividade das áreas	0,1%	0,95%

CV- coeficiente de variação de 6 replicatas

A resolução não pôde ser considerada, pois não há outro sinal para fazer comparação entre eles. Os fatores de cauda menores que 2 demonstram a simetria dos sinais. Os fatores de retenção encontram-se dentro da faixa de 1 a 10, demonstrando a força eluente adequada da fase móvel. O número de pratos teóricos está acima do valor recomendado de 2000. A repetitividade está satisfatória, situando-se abaixo do valor preconizado de 2 %.

4.2.2 - Avaliação da estabilidade da solução padrão e da amostra de adenina

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras e os padrões usados devem ser estáveis por um período razoável (por ex. um dia, uma semana, um mês, dependendo da necessidade) (SHABIR, 2003). A estabilidade das amostras e dos padrões é importante, logo se uma solução não for estável em temperaturas ambientes, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões. Com relação ao tempo, estabilidade de dias ou meses é mais desejável, entretanto, em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que for realizada a análise (SNYDER et al, 1997).

As soluções recém-preparadas foram injetadas e as áreas do padrão e da amostra de adenina foram relacionadas ao tempo decorrido. As figuras 7 e 8 representam as áreas obtidas do padrão e da amostra, respectivamente.

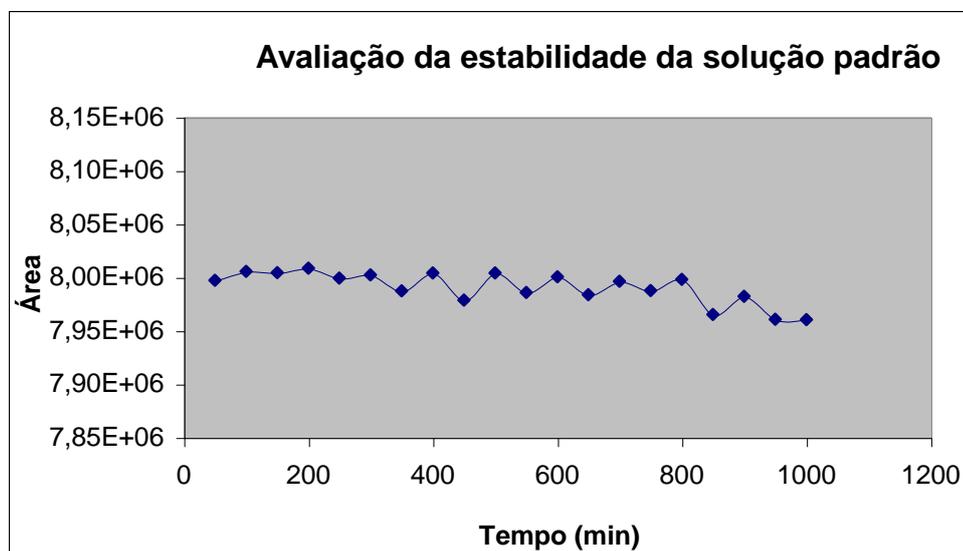


Figura 7 – Gráfico de áreas obtidas de várias injeções do padrão de adenina nas condições cromatográficas: fase móvel: AcOH 2,5%v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5%v/v; coluna C₈(5 μ m 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 μ L, comprimento de onda 262 nm

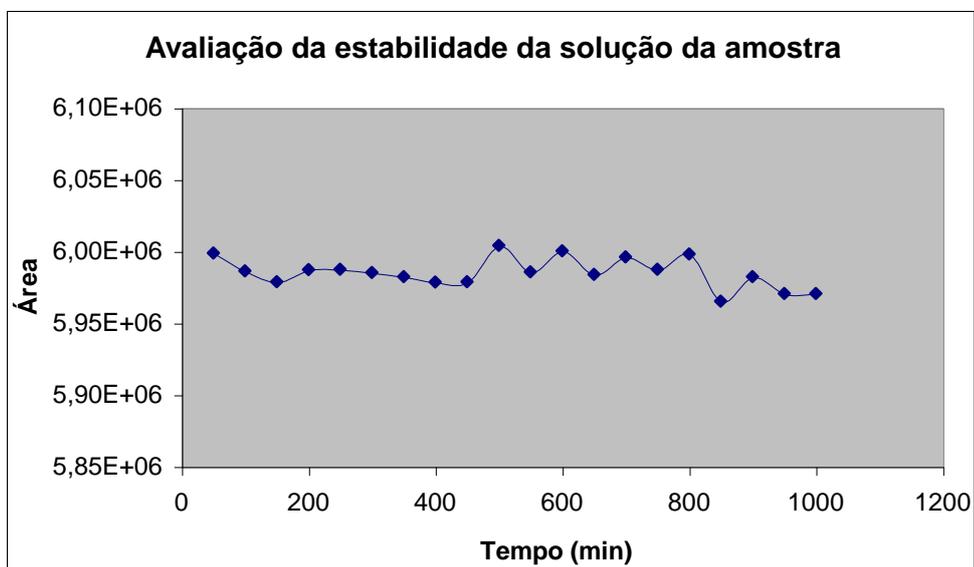


Figura 8 – Gráfico das áreas de várias injeções da amostra de adenina nas condições cromatográficas: fase móvel: AcOH 2,5%v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5 μ m 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 μ L, comprimento de onda 262 nm

Verifica-se uma tendência linear na estabilidade do padrão de adenina e da amostra contendo adenina, portanto, pode-se assegurar a confiabilidade dos resultados analíticos em soluções preparadas em até 24 horas antes da utilização.

4.2.3 – Avaliação da seletividade

A avaliação da seletividade do novo método foi feita utilizando o detector de arranjos de Fotodiodos, conhecido pela sigla derivada do inglês *Photo Diode Array* (PDA). Todos os testes do desenvolvimento do método foram feitos com branco (placebo), padrão de adenina e amostra, sendo importante avaliar se outro componente da bolsa poderia influenciar no método.

O monitoramento da pureza dos sinais cromatográficos foi avaliado em relação à concentração inicial e à recuperada após exposição da solução a condições de stress por um período de 20 min, temperatura de 121 °C e pressão 2 atm. Os espectros da amostra se sobrepuseram às respectivas substâncias puras (padrão), demonstrando a pureza e a seletividade dos sinais. Foram traçados os espectros de absorção molecular no ultravioleta no início, no meio e no fim do sinal cromatográfico. O espectro obtido no meio do sinal se sobrepôs à respectiva substância pura (padrão), demonstrando a seletividade através da pureza e a identificação dos sinais.

A primeira avaliação foi a injeção do padrão de adenina, conforme figura 9, observamos a pureza do sinal, através dos espectros de absorção no ultravioleta em 3D obtido com auxílio do detector DAD.

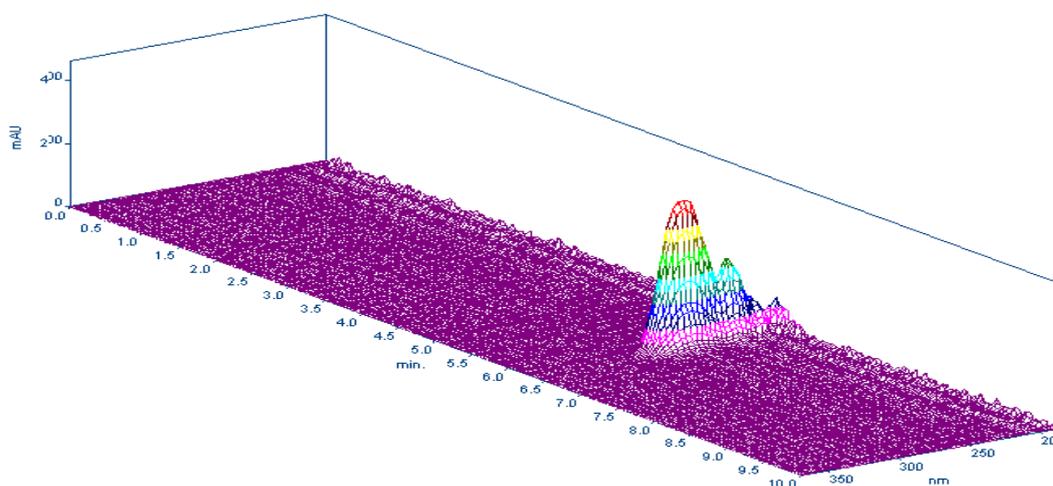


Figura 9- Cromatograma em 3D de absorção molecular na região ultra-violeta referente ao cromatograma do padrão de adenina sem autoclavar fase móvel : AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

Em seguida foi injetada a amostra, conforme mostra figura 10. Observamos a pureza do sinal através dos espectros de absorção no ultravioleta em 3D, obtido com auxílio do detector DAD.

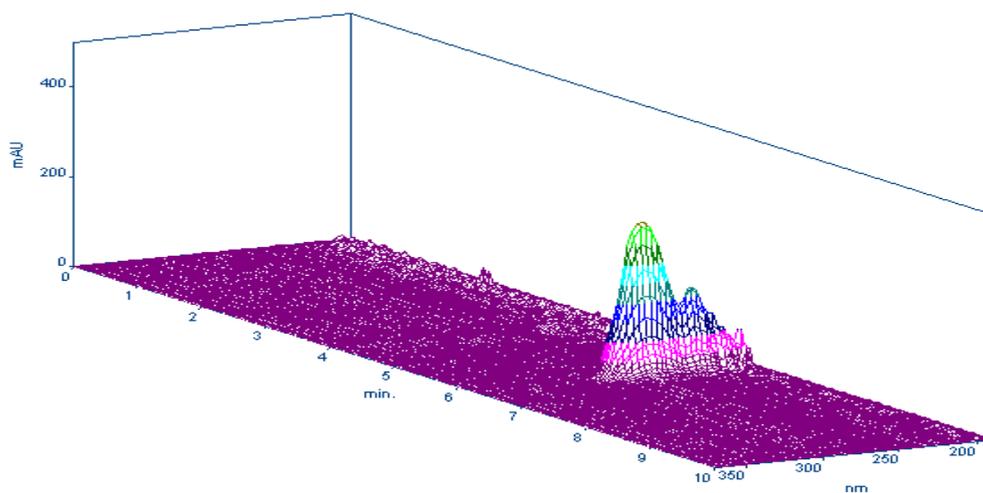


Figura 10 – Cromatograma em 3D de absorção molecular na região ultra-violeta referente ao cromatograma de solução da amostra de adenina sem autoclavar nas condições cromatográficas: fase móvel : AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5μm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 μL, comprimento de onda 262 nm

A adenina foi identificada na amostra através da comparação dos espectros de absorção molecular no ultravioleta com o sinal principal no cromatograma do padrão (Figura 11). Nesses espectros foi observada a absorção no mesmo λ máx. em 262 nm. O sinal da amostra de adenina apresentou um espectro semelhante ao do padrão, evidenciando sua pureza.

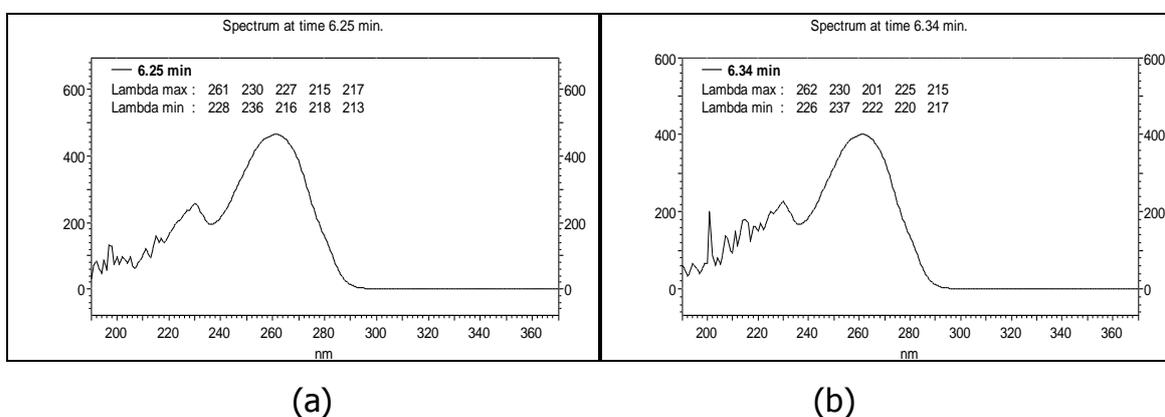


Figura 11 – Comparação dos espectros de absorção molecular no ultravioleta obtidos do sinal no cromatograma do padrão de adenina 30,0mg/mL (a) com o do sinal do cromatograma da amostra (b) com auxílio do detector PDA.

Na Figura 12 são apresentados os cromatogramas do placebo antes e após autoclavação. Não foi observada nenhuma variação a 262 nm após o tratamento térmico do placebo evidenciando mais uma vez que o sinal neste comprimento de onda, refere-se a adenina

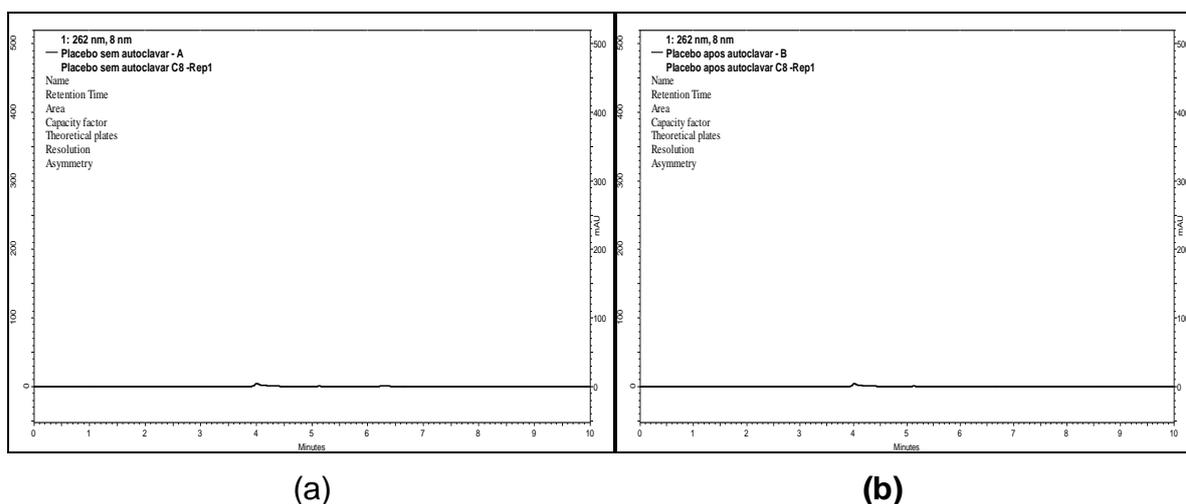


Figura 12: Cromatogramas do placebo antes (a) e após autoclavação (b). Nas condições cromatográficas: fase móvel AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

A próxima etapa foi submeter o padrão ao tratamento térmico, conforme figura 13. São apresentados os espectros de absorção no ultravioleta do padrão de adenina antes e após autoclavação.

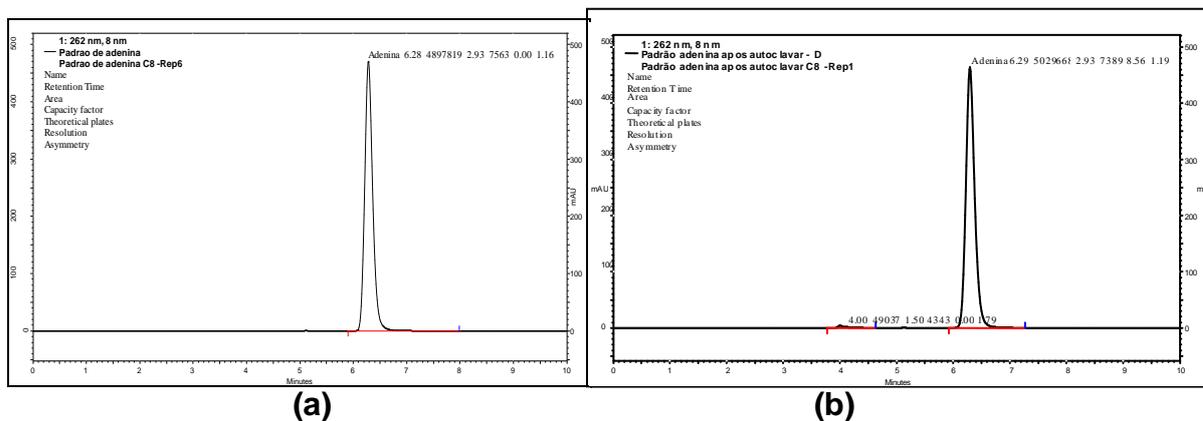


Figura 13: Cromatogramas do padrão de adenina antes (a) e após autoclavação (b). Nas condições cromatográficas: fase móvel: AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

Na Figura 14 são apresentados os cromatogramas de absorção no ultravioleta da amostra de adenina, antes e após autoclavação. Foram observados sinais em torno de 4 min, que corresponde a outros componentes da solução.

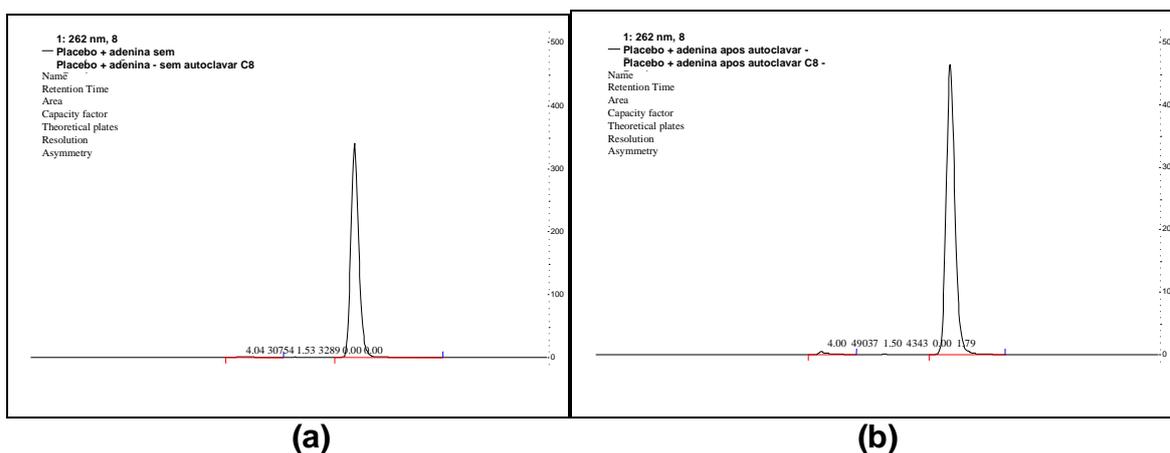


Figura 14: Cromatogramas da amostra de adenina, antes (a) e após autoclavação(b): fase móvel AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v, coluna C₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

Na Figura 15 é apresentado o monitoramento através dos espectros de absorção no ultravioleta da amostra após autoclavação com auxílio do DAD.

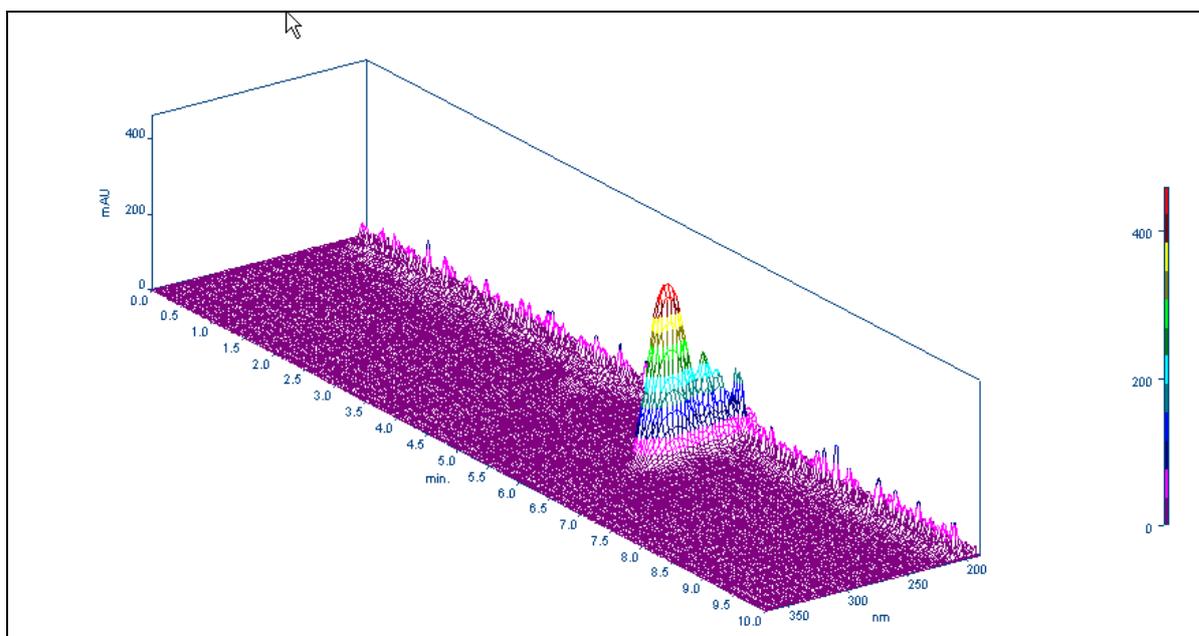


Figura 15 - Cromatograma em 3D da amostra após autoclavar, fase móvel: AcOH 2,5% v/v, AcONH₄, HSS, ACN 5% v/v; coluna C₈ (5µm 4,6x250 mm) Symmetry Waters ; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

A pureza espectral do sinal de adenina também foi avaliada na condição do teste de stress. Podemos afirmar que não há interferência de produtos de degradação no sinal da adenina conforme figura 15.

Podemos concluir que o método é seletivo, não sofrendo a interferência de outros componentes da amostra.

4.2.3.1– Verificação do efeito matriz

A avaliação da linearidade da curva matriz pelo MMQO foi realizada através de uma planilha eletrônica (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005), apresentada no Anexo D, onde se encontram valores diretamente calculados. É possível observar na planilha a análise do gráfico x-y, o gráfico dos resíduos da regressão, as variâncias dos resíduos, a significância da regressão e se há falta no ajuste da linearidade. Os resultados obtidos permitem as seguintes afirmações:

- as premissas de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner, obteve-se $R_{req}(0,96) > R_{crit}(0,91)$;
- a variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados demonstrou homoscedasticidade, a estatística t de Levene apresentou t_L calculado(1,20) inferior ao t_l tabelado (2,36) ;
- a independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson; que apresentou $d_{calc}(1,56) > d_U$ (limite superior 1,32); e
- a avaliação pela ANOVA, os resultados permitiram concluir que houve significância da regressão pela obtenção de $p < 0,001$ ($4,49 \times 10^{-16}$) e desvio da linearidade não significativo pelo $p > 0,05$ ($1,08 \times 10^{-1}$).

Foi feita a verificação da linearidade com a utilização da planilha de Souza & Junqueira, 2005, permitindo assim a avaliação da curva de adição padrão pela mesma tabela.

Na Figura 19, podemos observar e comparar os gráficos da curva de adição padrão (esquerda) e a curva analítica da adenina (direita).

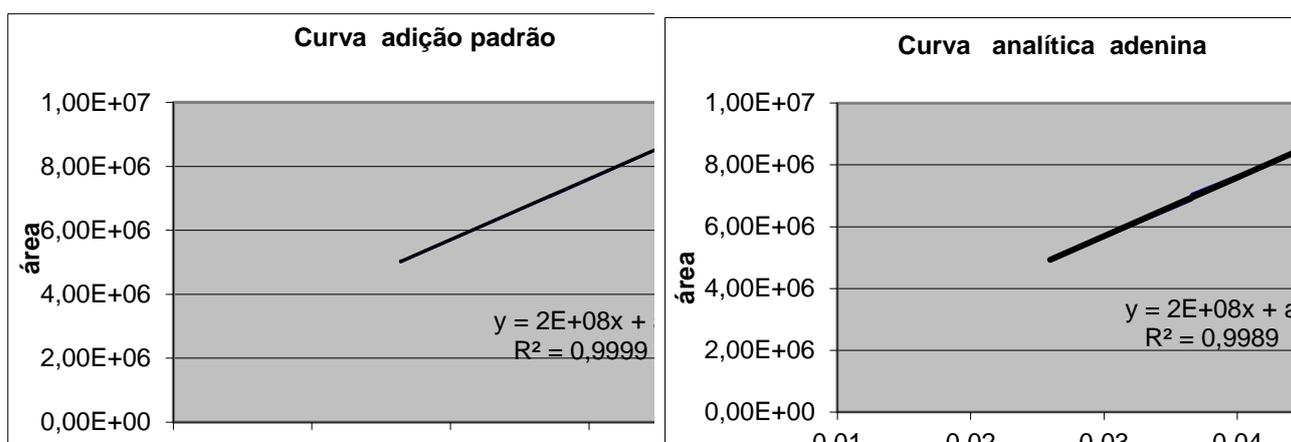


Figura 19 – Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão da adenina (esquerda) e a curva analítica (direita). Condições: fase móvel: AcOH 20%, AcONH₄, HSS, ACN 5%; coluna C₈ (5µm 4,6 x 250 mm) Symmetry Waters; temperatura da coluna 40 °C; fluxo 0,6 mL/min, vol. Inj 20 µL, comprimento de onda 262 nm

Os dados obtidos indicam que não ocorreu efeito da matriz, evidenciado pelas comparações das inclinações e interseções calculadas para a curva de adição padrão com a da curva analítica ($t_{cal.} < t_{tab.}$), sendo estes:

- equação da curva analítica (Ca) $y = 2,0 \times 10^8 x + 15400$
- equação da curva de adição padrão 1 (Cap 1) $y = 2,0 \times 10^8 x + 8032$
- t calculado entre Ca e Cap 1: 0,1553

y: coeficiente angular

Ca: curva analítica

Cap: curva adição padrão

4.2.4 – Avaliação de linearidade da curva analítica da adenina

Com a especificidade e a seletividade do método demonstrada, iniciou-se o desenvolvimento da parte quantitativa do método, avaliando-se inicialmente a curva analítica. As áreas e os desvios padrões dos sete pontos da curva analítica são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho da adenina

	conc(mg/mL)	Área (média)	DP	cv %
Nível 1	0,02596	4921145,0	31047,3	0,63
Nível 2	0,02950	5523502,0	16009,5	0,30
Nível 3	0,03304	6230158,0	7020,5	0,11
Nível 4	0,03658	6865896,7	6414,1	0,09
Nível 5	0,04012	7592311,3	6950,7	0,09
Nível 6	0,04366	8299177,7	636,3	0,01
Nível 7	0,04720	8897993,0	7281,9	0,08

DP: Desvio Padrão e cv. coeficiente de variação

A linearidade da curva analítica da adenina na faixa de concentração estudada foi confirmada, através da avaliação dos valores de R^2 , critério utilizado pela RDC 899/03 da Anvisa, conforme figuras 16,17 e 18.

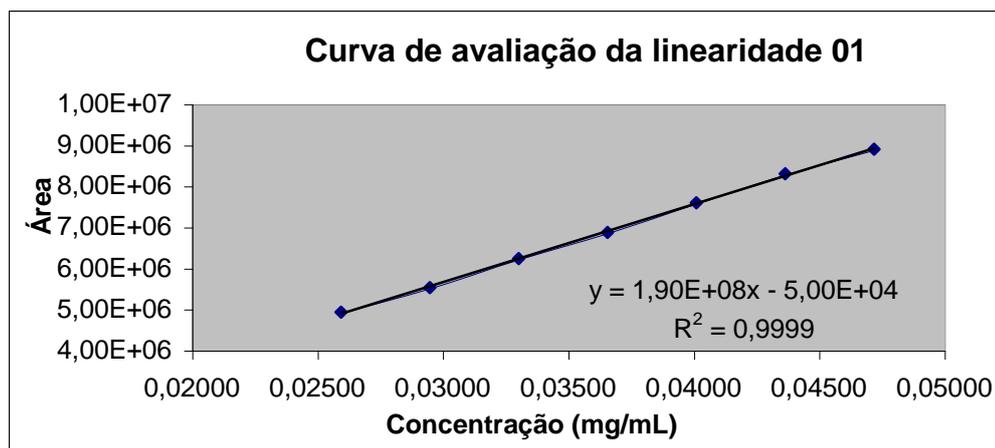


Figura 16 - Gráfico da 1ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.

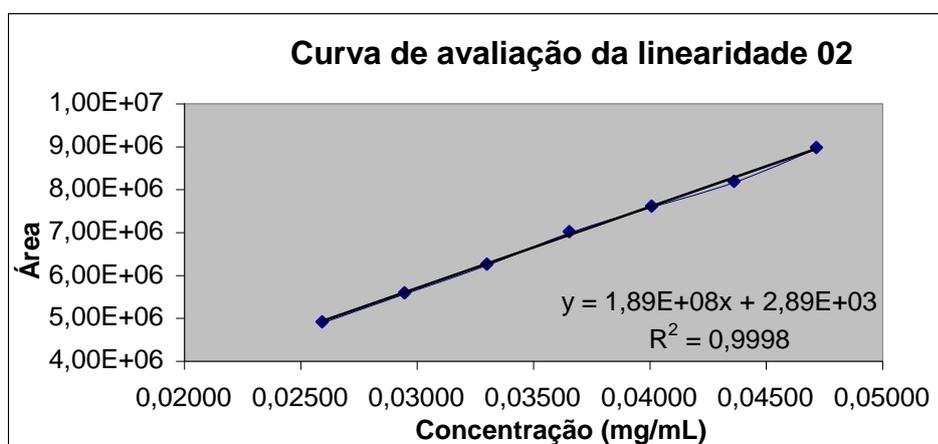


Figura 17 - Gráfico da 2ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.

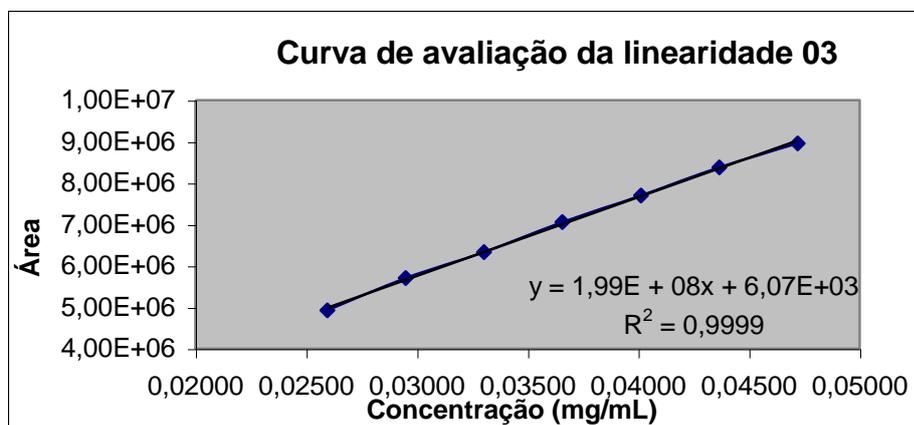


Figura 18 - Gráfico da 3ª curva analítica da adenina nas concentrações 0,02596 a 0,04720 mg/mL.

De acordo com Cardoso, 2010, o coeficiente de determinação (R^2) corresponde ao quadrado do coeficiente de correlação (r). A RDC 899/03 da Anvisa determina que a curva analítica deve apresentar coeficiente de correlação superior a 0,98. Nas curvas analíticas obtidas, foram encontrados coeficiente de determinação 0,999, e coeficiente de correlação de 0,999. Além disso, foram calculados os resíduos dos ajustes da curva analítica de acordo com as premissas da tabela

desenvolvida por SOUZA & JUNQUEIRA, 2005. Foram plotadas as médias correspondentes a cada nível de concentração, na mesma tabela, para as seguintes avaliações:

- as premissas de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner, obteve-se $R_{req} (0,98) > R_{crit} (0,95)$;
- a variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados demonstrou homoscedasticidade, a estatística t de Levene apresentou t_L calculado(0,182) inferior ao t_L tabelado (2,09) ;
- a independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson; que apresentou $d_{calc} (2,68) > d_U$ (limite superior 1,42); e
- a avaliação pela ANOVA, os resultados permitiram concluir que houve significância da regressão pela obtenção de $p < 0,001 (5,43 \times 10^{-27})$ e desvio da linearidade não significativo pelo $p > 0,05 (9,59 \times 10^{-1})$ (INMETRO, 2010)

O resumo das premissas para a curva analítica da adenina encontra-se em planilha adaptada de SOUZA & JUNQUEIRA, 2005 no Anexo C.

4.2.5 – Determinação da exatidão

A constatação da linearidade do método iniciou-se a avaliação da sua exatidão. Para isso, foram realizadas injeções das soluções de trabalho empregadas na elaboração da curva de adição padrão da adenina.

Na Tabela 20 são mostradas as áreas do sinal cromatográfico correspondentes a cada nível e o cv entre as injeções.

Tabela 20: Resultados obtidos da curva de adição padrão da adenina

	mg/mL	Área (média)	cv (%)	Recuperação (%)
Nível 1	0,0264427	534179	0,09	-
Nível 2	0,0300547	1066738	0,15	106
Nível 3	0,0336667	1836652	0,05	106
Nível 4	0,0372787	2638692	0,04	107
Nível 5	0,0408907	3347116	0,02	105
Nível 6	0,0445027	4086878	0,03	105
Nível 7	0,0481147	4803928	0,05	104

Verifica-se, conforme a Tabela 20, que a recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão da adenina, ficou entre os limites estabelecidos de 90% a 107%, para o nível de concentração de analito do estudo (HORWITZ, 1982,

INMETRO, 2010), comprovando assim adequada exatidão do método para esta substância.

4.2.6 – Determinação da precisão: repetitividade e precisão intermediária

Com as evidências de que o método é linear e exato, começamos a estudar a sua precisão, avaliando inicialmente a Repetitividade.

4.2.6.1 – Repetitividade

Os resultados das repetitividades das análises efetuadas estão indicados na Tabela 21. Os valores dos desvios padrão relativos de repetitividade (DPRr) encontrados, atestam a repetitividade do método. Segundo Horwitz (1982), os limites estabelecidos de DPRr em função da concentração do analito não podem ultrapassar 5,7 %, tendo por base a concentração da adenina na amostra, sendo que em todos os analistas os valores foram muito abaixo.

Tabela 21 – Cálculo de Repetitividade do método para a adenina

Adenina (mg/mL)	Adenina (mg/mL)	Adenina (mg/mL)
252,7	257,0	257,8
255,9	248,3	258,8
256,2	248,5	257,1
256,1	248,3	248,9
257,8	250,7	257,4
249,0	249,6	256,7
254,4	248,2	257,5
255,4	247,1	257,8
253,6	249,3	257,3
254,2	247,2	256,9
	Média= (253 ± 3)mg/mL	
	DPR _r = 1,6	

DPRr : Desvio Padrão Relativo de repetibilidade

4.2.6.2 – Precisão intermediária

O resultado das precisões intermediária das análises efetuadas na amostra CPDA, por 3 analistas, está indicado na Tabela 22.

Segundo HORWITZ (1982), os limites estabelecidos de DPR (Si), são calculados através do $cv(\%) = 2^{(1-0,5\log C)}$, em função da concentração do analito (INMETRO, 2010).

A faixa da concentração da adenina em solução de bolsa de sangue não pode ultrapassar 5,7 %.

Tabela 22: Cálculo da Precisão intermediária do método para adenina

1ºO - 1ºI (Y1-MdY1)²	2ºO - 2ºI (Y2-MdY2)²	3ºO - 3ºI (Y3-MdY3)²
4,8891	89,3381	1,3239
1,0207	27,5906	4,9316
1,6296	0,9366	0,2462
17,1665	0,5521	59,6666
14,8307	10,3320	0,6572
35,6013	4,3058	0,0034
0,2698	5,2371	0,7619
0,2377	0,1254	1,4405
1,8143	66,9457	0,4205
0,5250	0,1405	0,0710
S1 = 77,9845	S2 = 205,5040	S3 = 69,5228
Md: 253,0391	DPR: 1,43	Si(o,i) 3,615866583

DPR (ANVISA, 2003), (INMETRO, 2010)

4.2.7 – Determinação da robustez

Foram feitas injeções em triplicatas das soluções preparadas (item 3.2.2.1).

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema (Tabela 5 do item 1.7.1).

As Tabelas 23 e 24 mostram os resultados dos parâmetros obtidos repetitividade das áreas (DPR), pratos teóricos (PT), Fator de cauda (FC), Fator de retenção (K), nas variações inferiores e superiores às nominais.

Tabela 23– Resultados dos parâmetros com variações inferiores às nominais.

		Área	PT	FC	Ret(K'')
Cb 1	Média	5665458	10353	1,34	3,11
	cv(%)	0,06	0,29	0,46	0,2
Cb 2	Média	5970057	9506	1,43	5,09
	cv(%)	0,04	0,15	0,04	0,3
Cb 3	Média	5514370	9808	1,33	4,90
	cv(%)	0,06	0,88	0	0,04
Cb 4	Média	6144360	11537	1,47	5,52
	cv(%)	0,14	0,21	0,14	0,62
Cb 5	Média	5503588	8694	1,32	4,28
	cv(%)	0,03	0,55	0,44	0,41
Cb 6	Média	5514370	8939	1,32	4,52
	cv(%)	0,06	0,3	0	0,82
Cb 7	Média	6158396	10167	1,53	5,97
	cv(%)	0,26	0,64	0,07	0,15
Cb 8	Média	6163694	10174	1,53	5,80
	cv(%)	0,18	0,89	0,07	0,22

Cb: Combinação ensaiada

Tabela 24– Resultados dos parâmetros com variações superiores às nominais

		Área	PT	FC	Ret(K'')
Cb 1	Média	5665448	10353	1,34	3,11
	cv(%)	0,06	0,29	0,46	0,20
Cb 2	Média	5274593	8188	1,31	3,33
	cv(%)	0,03	0,14	0,04	0,92
Cb 3	Média	5212262	9754	1,49	4,87
	cv(%)	0,14	0,83	0,2	0,28
Cb 4	Média	5212781	9586	1,47	4,44
	cv(%)	0,22	0,39	0,08	0,49
Cb 5	Média	5459671	8271	1,31	4,26
	cv(%)	0,14	0,07	0,08	0,36
Cb 6	Média	4663992	8264	1,31	3,15
	cv(%)	0,01	0,18	0,04	0,58
Cb 7	Média	5233266	9768	1,39	3,27
	cv(%)	0,4	0,54	0,07	0,59
Cb 8	Média	5222861	9635	1,48	4,98
	cv(%)	0,01	0,41	0,20	0,27

Cb: Combinação ensaiada

Os valores dos desvios padrão relativos das áreas foram sempre inferiores a 2%, demonstrando assim satisfatória repetitividade entre as injeções.

Os fatores de cauda dos sinais foram sempre inferiores a 2, demonstrando um bom formato dos sinais. Visto que as variações testadas não influenciaram significativamente no DPR das áreas e no fator de cauda dos sinais, ou seja, essas modificações não alteraram a forma do sinal.

Os fatores de retenção foram sempre superiores a um e inferiores a dez, demonstrando uma boa diferenciação do volume morto da coluna. Porém foi observada influência da fase móvel, coluna e temperatura. Mesmo assim pode-se

dizer que o método é robusto nesse fator, porque o tempo de retenção do sinal muda, mas não altera o seu formato.

O número de pratos teóricos apresentou-se superiores ao recomendado ($N > 2000$), este fato se justifica pela utilização de uma coluna nova no processo de validação.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o método é robusto, em relação a pequenas alterações no pH da fase móvel ($2,8 \rightarrow \pm 0,1$), composição da fase móvel ($5\% \rightarrow \pm 1\%$ de orgânico), temperatura da coluna ($40^\circ \rightarrow \pm 2^\circ\text{C}$), fluxo da fase móvel ($0,6 \rightarrow \pm 0,05$ mL/min), diferentes fabricantes de coluna (Waters \rightarrow Shimadzu) e tempo de extração no ultra-son ($5 \rightarrow \pm 3$ min).

A robustez do método em relação a analistas, equipamentos e dias diferentes foi avaliada na determinação da precisão intermediária e foi considerada satisfatória conforme Tabelas 21 e 22, nas páginas 68 e 69 respectivamente.

Foram calculados todos os setes efeitos (E1 a E7). As Tabelas 25 e 26 mostram respectivamente os efeitos determinados para cada variação de fator na determinação da adenina de acordo com o item 2.4.10 (robustez - cálculo do efeito).

Tabela 25: Cálculo dos efeitos para cada variação inferior de fator na determinação da adenina

Fatores	Área (DPR)	PT	FC	Ret (K')
1 - Dia de análise mesmo dia preparo	- 0,06	800	- 0,04	- 0,5
2 - Diferente coluna Waters \rightarrow Shimadzu	- 0,11	-1075	- 0,11	- 1,3
3 - Comp.fase móvel 5% org. \rightarrow 4%	- 0,01	- 284	- 0,06	- 0,7
4- Fluxo (mL/min) 0,60 \rightarrow 0,55	0,06	325	0,1	0,2
5- Temperatura ($^\circ\text{C}$) 40 \rightarrow 38	- 0,03	175	- 0,06	- 0,7
6- pH 2,82 \rightarrow 2,72	- 0,003	600	0,01	- 0,4
7- Dissolução*(min) 5 \rightarrow 2	0,05	650	0,02	- 0,3

Tabela 26: Cálculo dos efeitos para cada variação superior de fator na determinação da adenina

Fatores	Área	PT	FC	Ret (K')
1 - Dia de análise Um dia após o preparo	-0,03	450	0,03	0
2 - Diferente coluna Waters → Shimadzu	-0,13	-900	-0,13	-1,05
3 - Comp.fase móvel 5% org. → 6%	0,11	600	-0,01	-0,05
4- Fluxo (mL/min) 0,6 → 0,65	-0,003	525	-0,02	-0,5
5- Temperatura (°C) 40 → 42	-0,14	500	-0,04	0,18
6- pH 2,82 → 2,92	-0,004	450	0,03	0,55
7- Dissolução*(min) 5 → 8	0,09	550	-0,02	-0,90

Os efeitos foram avaliados com a finalidade de revelar aqueles efeitos mais significantes nos resultados dos parâmetros da adequação do sistema para a adenina, tanto inferior, como superior.

No desvio padrão relativo das áreas, não houve efeito capaz de causar variações significativas, todos os valores foram próximo do zero.

Na resolução dos sinais, o efeito da variação inferior da composição orgânica da fase móvel foi o segundo mais significativo, porém o efeito da variação alterada para cima (superior) não foi tão significativo, percebe-se então trabalhar que pode se trabalhar com a composição de 5% ou 6% orgânico na fase móvel. A diferença de composição da coluna é o efeito mais significativo na resolução dos sinais, tanto na variação inferior, como superior.

Nos fatores de retenção, os efeitos de variação da composição da fase móvel, fluxo, temperatura, diferente tipo de coluna e pH, foram significativos, sugere-se trabalhar com as faixas determinadas na validação.

No fator de cauda dos sinais, não houve efeito capaz de causar variações significativas, todos os valores foram próximo do zero.

No fator de número de pratos teóricos, o efeito mais significativo foi a diferenciação da coluna, devido ao fato da primeira utilizada já estar mais desgastada que a segunda.

5 – CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método para a determinação de adenina em solução preservadora de bolsa de sangue. Realizou-se a avaliação dos parâmetros de adequação do sistema limitados pelos principais compêndios oficiais para validação. Os parâmetros cromatográficos de análise estabelecidos para este método foram: coluna cromatográfica de fase reversa Symmetry® C₈ (250 x 4,6 mm; 5,0µm) da Waters e fase móvel constituída de uma mistura de 2,5% (v/v) de AcOH + 200 mg AcONH₄ + 50mg HSS + 5% ACN . O fluxo empregado foi de 0,6 mL/min e detecção UV/VIS a 262 nm. A nova metodologia foi avaliada e se mostrou apta à validação.

O método demonstrou ser seletivo para a quantificação de adenina em solução preservadora de bolsa de coleta de sangue do tipo CPDA. A estabilidade das soluções padrão e da amostra demonstrou que ambas podem ser utilizadas num período de 24 horas.

O método apresentou-se linear no intervalo de concentração de 0,0264 a 0,0480 mg/mL . A estatística t de Levene não foi significativa ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson. A significância da regressão foi alta ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$), a média dos coeficientes de correlação obtida foi ($r \approx 0,999$), de acordo com o estabelecido pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA e INMETRO, 2010.

Demonstrou ainda, compondo o estudo de validação, ser específico, obtendo precisão satisfatória ao apresentar desvio padrão relativo percentual inferior a 2% e ao não exibir diferença estatística entre os resultados apresentados por analistas diferentes em dias diferentes. Apresentou exatidão adequada ao fornecer taxas de recuperação entre 104% e 107%.

A verificação da homocedasticidade das curvas, tanto da amostra como do padrão, através do teste F e a comparação entre as inclinações das duas curvas pelo teste t, revelou que a metodologia não sofre efeito de matriz. O método exibiu robustez ao não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os resultados gerados a partir de pequenas e deliberadas variações nos diferentes parâmetros das condições cromatográficas.

A degradação da adenina não foi significativa quando submetida a calor e umidade em autoclavação.

Segundo o tratamento estatístico realizado, a metodologia proposta pode ser empregada em laboratórios para o controle da qualidade por ser capaz de gerar resultados confiáveis, conforme demonstrado através do estudo de validação.

Comparando-se com a metodologia de melhor desempenho descrita na literatura, a metodologia proposta apresenta vantagem em utilizar reagentes menos agressivos a vida útil da coluna e coluna de mais fácil acesso aos laboratórios.

Em virtude da inexistência de monografias, descritas em compêndios oficiais reconhecidos pela Anvisa, para o controle da qualidade da adenina em solução preservadora em bolsa de coleta de sangue, a metodologia descrita pode ser sugerida para inclusão na Farmacopéia Brasileira, e ainda, no regulamento técnico específico da Anvisa. Para isso, está sendo preparado Memorando interno para GT/AIS, aguardando aprovação desta banca examinadora, enquanto trabalho científico, que através de ofício irá propor tanto à Farmacopéia Brasileira, quanto à Anvisa implementação e alteração da metodologia.

Podemos ao final deste trabalho, contribuir para as atividades de monitoramento do controle da qualidade de produtos de bolsa de sangue utilizando metodologia analítica confiável e reprodutível quanto aos parâmetros de Validação Analítica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. L. N. **Validação interlaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

ANTICOAGULANT Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution. In: UNITED States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

ANVISA Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2 jun 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **AOAC Official methods of analysis**. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

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.

BARROS N. B., Recomendações para calibração em química analítica. **Quím. Nova**. São Paulo, 25, n. 5, 2002.

BADOUARD, M., NISHINO, C., FAVIER, R. Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. **Journal of Chromatography B**, v. 827, p. 26-31, 2005.

BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 1980. 292 p.

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

_____. 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

_____. 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.

_____. 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.

_____. 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.

_____. 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.

_____. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "Guia para a Qualidade em Química Analítica". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de março de 2004.

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.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 69, p. 364-367, 1974.

CARDOSO, M. H. W. M., NOBREGA, A. W., ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates, **Revista Analytica**. Maio 2008. n.34

CARDOSO, M. H. W. M., NOBREGA, A. W., ABRANTES, S. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, Supl.1, p. 63-72, maio 2010

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

COLLINS, C.H; BRAGA, G.L.; BONATO, P.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 279 p.

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

COSTA JÚNIOR, J. et. al.. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 378-383, mar-abr, 2008.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, p. 374, 2001.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley. 1998. 706 p.

DEGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, São Paulo, n.7, p.21-25. 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**: a Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. London: Teddington, 1998.

FERRAZ, V. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 32 p.

FUST, A. M. B. S. **Avaliação e desenvolvimento de metodologia analítica para adenina em solução preservadora de bolsa plástica de sangue**. 2008. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária)– Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

GAO, J.L. et al. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC-DAD-MS. **Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis**, v. 44, p. 807-811, 2007.

HARMENING, D.M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue**. São Paulo, Revinter, 2011.

HASHIMOTO, M.C.T. **Estudos de preservação de hemácias em diferentes bolsas de coleta com Di-octil-ftalato e anticoagulante citrato-fosfato-dextrose – adenina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)– Faculdade de Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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

HIENE, M. A. C. **Análise químico-farmacêutica de azumoleno sódico**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)– Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

HINES, HB; BRUEGGEMANN EB AND HALE, ML. High-performance liquid chromatography-mass selective detection from a synthetic RNA substrate by ricin A chain. **Analytical Biochemistry**, v. 330, n. 1, p. 119-122, July 2004.

- HEYDEN- VANDER, Y. et al. Determination of system suitability limits with a robustness test. **Journal of Chromatography A**, v. 845, p. 145-154, 1999.
- HÖGMAN, C. F. et al. Red cell suspensions in SAGM médium. **Vox Sang.** Basel, v. 45. p. 217-223. 1983a.
- HÖGMAN, C.F. 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.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies. **Pure Appl. Chem.**, v.67, p. 331-343, 1995.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Int.**, p. 96-105, 1998.
- INMETRO. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2007
- INMETRO. **DOQ-CGCRE-008 (Rev.03)**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2010.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Q2(R1)**: Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; validation of analytical procedures: text and methodology. 2005.
- ISO. **ISO 5725-3:1994**. Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results: Part 3 - Intermediate Measures of Precision of a Standard Measurement Method, 2001
- JORGE, F.S., **Métodos de Taguchi Aplicados à Análise Cromatográfica na Identificação de Isocianatos** . Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2010.
- KIEßLING, P. et al. **Development and validation of a high-performance liquid chromatography assay and a capillary electrophoresis assay for the analysis of adenosine and the degradation product adenine in infusions**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, volume 36, issue 3, 15 november 2004, 535-539
- LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4. ed., Ed. Átomo: Campinas, 2002.
- LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I. et al. (Ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford: University Press, 1960. p. 278-292.
- LIMA, L.F.M. et al. **Vigilância sanitária de medicamentos e correlatos**. Rio de Janeiro, Qualitymark, 1993.
- MAC NEIL, J.D; PATTERSON, J.; MARTZ, V. Validation of analytical methods: providing your method is " fit for purpose" . In: FAJGELJ, A., AMBRUS, A. (Ed.)

Principles and practices of method validation. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2000. p.100-107.

MORAL,P.G. et al Simultaneous determination of adenine and guanine in ruminant bacterial pellets by ion-pair HPLC. **Journal of Chromatography B**, v. 826, p. 257-(2005) 257-260.

MS/FIOCRUZ/Instituto Nacional de Controle de Qualidade - INCQS. Disponível em: http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=65&Itemid=62 Acesso em 29/10/2010.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (Austrália). **Technical note 17**: Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sidney: NATA, 1997. 8 p. Issued: August 2004 Amended and reissued: December 2006, April 2009

RAZOUK, F.H.; REICHE, E.M.V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 26, n. 2, 2004. p. 126-134.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M. **Obtenção e aplicação de isoflavonas de soja**. 133 f. 2008. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008

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

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. Pennsylvania: The State College, Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

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.

SHABIR, G. A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SNYDER,L.R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15

SNEDECOR,S. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, Sixth edition, 1989. 503p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Belo Horizonte. 2007.

SWARTZ M.R., & KRULL I. S. Validação de Métodos Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology Brasil**. v. 2, n. 1, p. 12-20, 1998

TEIXEIRA, A. S. **Adequação e apresentação de parâmetros de validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de aflatoxinas em Castanha-do-Brasil (Bertholletia Excelsa Bonpl.) através de cromatografia líquida de alta eficiência**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

THE UNITED States Pharmacopéia. USP 30 ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

THE UNITED States Pharmacopéia. USP 34 ed.- NF 29 Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

VALDERRAMA, P. et al. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quim. Nova**, v 32, n 5, p. 1278-1287, 2009

VALE, R. de F. D **Avaliação das metodologias preconizadas no controle de qualidade físico-químico de bolsas de sangue** Trabalho de conclusão do Curso (Especialização em Vigilância Sanitária)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2010.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry. **Pure Appl. Chem**, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

VICENTE, C. S. **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 em Engenharia Mecânica/Gestão da Qualidade Total)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

WEISBERG, S. **Applied linear regression**. New York: Wiley, 1985. 324 p.

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 A

Descrição da planilha de avaliação de linearidade de curva analítica desenvolvida por Souza & Junqueira, 2005.

- Elaborada por Souza & Junqueira, esta planilha consiste em ferramenta para a verificação da linearidade de uma curva analítica. A avaliação é realizada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). E seu ajuste se baseia nas hipóteses:

- Os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida;

- Os resíduos são variáveis normalmente distribuídas;

- Os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X;

- Os resíduos não são correlacionados e independentes; e A relação entre X_i e Y_i é linear.

TESTES:

1) Teste de Jack-Knife

Objetivo: Verificar valores extremos (população diferente) ou erros de medição.

Avaliação: $J < t_{crit}$

Características: O cálculo do resíduo padronizado J emprega uma estimativa da variância dos resíduos da regressão independente do ponto sob suspeita. Apresenta valor diferenciado para cada ponto da curva de calibração e segue a distribuição de Student t. Apesar das excelentes características do o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), este método tem o inconveniente de ser muito sensível à presença de pontos de influência como valores extremos (outliers) ou pontos de alavanca (leverages).

Observações: Podem ser removidos em percentual máximo de 22,2 % do número total de replicatas. Não podendo ser retirado todos os resultados de um mesmo nível e após cada remoção novos cálculos são realizados.

2) Teste da significância da regressão e do desvio da linearidade

Objetivo: Significância da regressão linear - Testar a hipótese de que a regressão linear seja ou não significativa.

Avaliação: Regressão linear significativa – $F_{\text{estimado}} > F_{\text{crítico}}$ ou na planilha $p < 0,001$.

Objetivo: Desvio da linearidade – Testar se o modelo linear apresenta desvio de linearidade

Avaliação: Não há desvio de linearidade – $F_{\text{estimado}} < F_{\text{crítico}}$ ou na planilha $p > 0,05$.

Características: Para realizar o teste da significância da regressão e do desvio da linearidade, a variabilidade total das respostas é decomposta na soma dos quadrados dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e na soma dos quadrados devido à regressão. A soma dos quadrados dos resíduos da regressão é então separada em soma dos quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e soma dos quadrados do erro puro. A soma dos quadrados dos resíduos pode ser obtida pela diferença entre a soma dos quadrados total e a soma dos quadrados devida à regressão. A soma dos quadrados do erro puro é obtida pela diferença entre a soma do quadrado total e a soma do quadrados entre níveis. A estatística deste teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição F com os graus de liberdade correspondentes.

Observações: Um desvio da linearidade significativo indica que o modelo é inadequado sendo necessário encontrar a inadequação. Desvio da linearidade não significativo indica adequação do modelo e para ambos, soma dos quadrados do erro puro e do desvio da linearidade, podem ser utilizados como estimativas de σ^2 .

3) Teste de Ryan-Joiner

Objetivo: Verificar a normalidade dos resíduos da regressão

Avaliação: Os resíduos seguem a distribuição normal: $R_{\text{req}} > R_{\text{crit}}$

Características: A estatística deste teste se baseia no coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal ou coeficiente de correlação de Ryan-Joiner R.

4) Teste de Durbin-Watson

Objetivo: Verificar a autocorrelação dos resíduos da regressão

Avaliação: Os resíduo são independentes $d_{calc} > d_U$

Os resíduo são dependentes $d_{calc} < d_L$

Resultado inconclusivo: $d_L < d_{calc} < d_U$

Características: A estatística deste teste se baseia na estatística de Durbin-Watson d . Para cada conjunto de dados, há dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior).

5) Teste de Levene

Objetivo: Avaliar homocedasticidade

Avaliação: Homocedasticidade – $t_{calc} < t_{crit}$

Características: A estatística deste teste se baseia no F de Levene F_L , mas no caso específico de dois grupos, ou seja, para um grau de liberdade de tratamentos, em que $t = \sqrt{F}$, pode ser usada a estatística t de Levene t_L .

(SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; VALE, 2010).

ANEXO B

Tabela da Avaliação da linearidade da curva analítica da Adenina

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	 INCCS
---	---

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Curva adenina rep ind		
Data de Confeção da Curva:	7/8/2010	Curva N°:	37623
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Shimadzu sala 10 subsolo	Responsável:	Ana

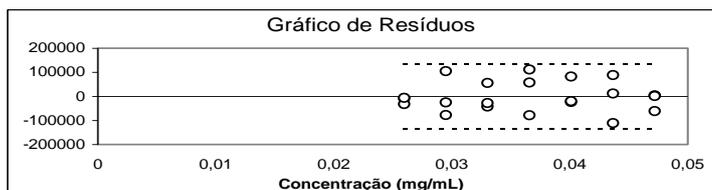
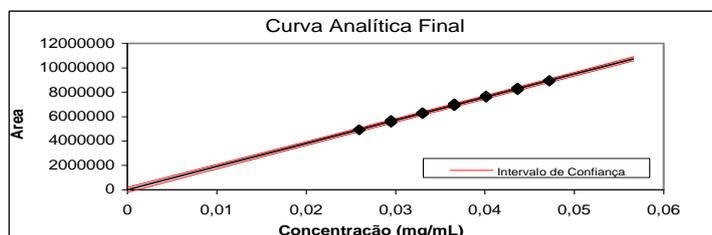
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Area
1	01	0,02596	4921145
1	02	0,02596	4897090
1	03	0,02596	4923101
2	04	0,0295	5523502
2	05	0,0295	5575813
2	06	0,0295	5705860
3	07	0,03304	6230158
3	08	0,03304	6244993
3	09	0,03304	6328669
4	10	0,03658	6865896
4	11	0,03658	7001620
4	12	0,03658	7056038
5	13	0,04012	7592311
5	14	0,04012	7595722
5	15	0,04012	7698231
6	16	0,04366	8299177
6	17	0,04366	8176382
6	18	0,04366	8375447
7	19	0,0472	8897993
7	20	0,0472	8962693
7	21	0,0472	8960794

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

**Normalidade dos Resíduos**

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,98
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,68
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coeficiente Angular (b):	1,90E+08	Coeficiente Linear (a):	4,53E+03
r	0,9990	R ²	0,9979
N	21	Graus de Liberdade	19

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	4,35E+09
t _i calculado	1,82E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	8,57E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,08E-03	Limite de Quantificação	3,20E-03
--------------------	----------	-------------------------	----------

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,79E+13	3,79E+13	9,21E+03	5,43E-27
resíduos	19	7,81E+10	4,11E+09		
Ajuste	5	5,13E+09	1,03E+09	1,97E-01	9,59E-01
erro puro	14	7,30E+10	5,21E+09		
total	20	3,80E+13			

Observações

--

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Pág.:1/1

Fonte: Adaptado planilha de SOUZA & J UNQUEIRA,2005

ANEXO C

Tabela de avaliação estatística do efeito matriz

Avaliação	Estatística
	<p>*teste F, $F = \frac{s_{res_1}^2}{s_{res_2}^2}$ (Equação 1)</p> <p>Onde $s_{res_1}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 1; $s_{res_2}^2$ = estimativa do desvio padrão residual da curva 2. $F_{cal} < F_{tab}$ não há diferença significativa, variâncias semelhantes $F_{cal} > F_{tab}$ há diferença significativa, variâncias diferentes</p>
Variância residual	<p>Se $F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow t_{cal} = \frac{ b_{1_1} - b_{1_2} }{S_{res_a} \sqrt{\frac{1}{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}}}$; (Equação 2)</p> <p>Onde b_{1_1} = coeficiente angular da curva 1 (curva em solvente); b_{1_2} = coeficiente angular da curva 1 (curva na matriz); x_1 = áreas da curva em solvente e x_2 = áreas da curva na matriz; \bar{x}_1 = média dos valores de x_1 e \bar{x}_2 = média dos valores de x_2; S_{res_a} = estimativa do desvio padrão residual agregado das duas curvas.</p> $S_{res_a} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_{res_1}^2 + (n_2 - 2)S_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}}$ (Equação 3)
Comparação dos coeficientes angulares	<p>Onde S_{res_1} = estimativa do desvio padrão residual da curva 1; S_{res_2} = estimativa do desvio padrão residual da curva 2; n_1 = número de medidas da curva 1 e n_2 = número de medidas da curva 2.</p> <p>** Se $t_{cal} > t_{tab}$ o efeito matriz significativo</p>
	<p>Se $F_{cal} > F_{tab} \Rightarrow t_{cal} = \frac{ b_{1_1} - b_{1_2} }{\sqrt{s_{b_{1_1}}^2 + s_{b_{1_2}}^2}}$ (Equação 4)</p> <p>Onde b_{1_1} = coeficiente angular da curva 1 e b_{1_2} = coeficiente angular da curva 2; $s_{b_{1_1}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 1; $s_{b_{1_2}}$ = estimativa do erro padrão do coeficiente angular da curva 2.</p> $S_{b_{1_1}}^2 = \frac{(S_{res_1})^2}{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2}$ (Equação 5) e $S_{b_{1_2}}^2 = \frac{(S_{res_2})^2}{\sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}$ (Equação 6)
	<p>Onde $S_{b_{1_1}}$ e $S_{b_{1_2}}$ são as estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares das curvas 1 e 2, respectivamente.</p> <p>Se $t_{cal} > t'$ o efeito matriz significativo</p> $t' = \frac{t_1 S_{b_{1_1}}^2 + t_2 S_{b_{1_2}}^2}{S_{b_{1_1}}^2 + S_{b_{1_2}}^2}$ (Equação 7)
	<p>Onde $***t_1$ = valor teórico de t para curva 1 e $***t_2$ = valor teórico de t para curva 2.</p> <p>* teste F, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁-1) e (n₂-1) graus de liberdade para o numerador e o denominador.</p> <p>** teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁ + n₂ - 4).</p> <p>***teste t, bilateral, para 95% de confiança (P=0,05) e (n₁ - 2) e (n₂ - 2) graus de liberdade para o numerador e o denominador.</p>

Se o valor de F calculado for menor que o valor de F tabelado (Equação 1), pode se considerar que não há diferença significativa entre as variâncias residuais e que as mesmas são iguais. Neste caso a matriz não tem efeito sobre a precisão do método na faixa de estudo avaliada.

O teste t (Equação 2) será aplicado após cálculo do desvio padrão agrupado (Equação 3). O valor de t calculado menor que o valor de t tabelado indica que a matriz não afeta o ensaio. Entretanto, se o valor de F calculado for maior que o valor de F tabelado (Equação 1) as variâncias não serão consideradas iguais demonstrando que a matriz tem efeito sobre a precisão do método e uma abordagem diferente é considerada.

O valor de t calculado segue a Equação 4, utilizando os valores das estimativas dos erros padrão dos coeficientes angulares obtidos através das Equações 5 e 6. Se o valor de t calculado for maior que o valor de t' (Equação 7), a diferença é significativa demonstrando que o efeito matriz afeta o ensaio (CARDOSO, 2008).

ANEXO E

Tabela de dados de cálculo efeito matriz em curva adição padrão e analítica

Conc. (mg/L) (X_1)	Área (Y_1)	Y_{1est}	$Y_1 - Y_{1est}$	$(X_1 - X_{1med})^2$	X_1^2
0,0264	5046058	5029652,067	16406,2333	0,00011664	0,000697
0,0264	5045668	5029652,067	16015,9333	0,00011664	0,000697
0,0264	5013822	5029652,067	-15829,7667	0,00011664	0,000697
0,0372	7066308	7080936,8	-14628,5	4,81482E -35	0,0013838
0,0372	7081933	7080936,8	996,5	4,81482E -35	0,0013838
0,0372	7061384	7080936,8	-19552,8	4,81482E -35	0,0013838
0,048	9136822	9132221,533	4600,16667	0,00011664	0,002304
0,048	9140864	9132221,533	8642,76667	0,00011664	0,002304
0,048	9135571	9132221,533	3349,46667	0,00011664	0,002304

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S^2 res Solv	185079001,7
S^2 res Matriz	3349972062
GL $(n_1 + n_2) - 4$	14
$F_{(1-\alpha/2; GL)}$	2,084
Teste F	0,055247924

Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	189933771,6
Interceção	15400,4963
S_{xx_1}	0,00069984
$s^2_{res_1}$	185079001,7
n_1	9
ΣX_1^2	0,0131544
X_{1med}	0,0372

Conc. (mg/L) (X_2)	Área (Y_2)	Y_{2est}	$Y_2 - Y_{2est}$	$(X_2 - X_{2med})^2$	X_2^2
0,02596	4921145	4929572,667	-8427,66667	0,000112784	0,0006739
0,02596	4897090	4929572,667	-32482,6667	0,000112784	0,0006739
0,02596	4923101	4929572,667	-6471,66667	0,000112784	0,0006739
0,03658	6865896	6942930	-77034	0	0,0013381
0,03658	7001620	6942930	58690	0	0,0013381
0,03658	7056038	6942930	113108	0	0,0013381
0,0472	8897993	8956287,333	-58294,3333	0,000112784	0,0022278
0,0472	8962693	8956287,333	6405,66667	0,000112784	0,0022278
0,0472	8960794	8956287,333	4506,66667	0,000112784	0,0022278

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	189581669,8
Interceção	8032,518519
S_{xx_2}	0,000676706
$s^2_{res_2}$	3349972062
n_2	9
ΣX_2^2	0,012719574
X_{2med}	0,03658

Avaliação	
s^2_p	1767525532
t_b	0,155342214
t_a	0,085750286
GL $(n_1 + n_2) - 4$	14
$t_{(1-\alpha/2; GL)}$	2,14

Fonte: Adaptado Basílio, Fábio, LABALIME, 2007