

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

**Renata de Freitas Dalavia Vale**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
GLICOSE, FRUTOSE E MANITOL EM BOLSAS DE SANGUE  
POR CROMATOGRÁFIA EM FASE LÍQUIDA**

**Rio de Janeiro**

**2012**

Renata de Freitas Dalavia Vale

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
GLICOSE, FRUTOSE E MANITOL EM BOLSAS DE SANGUE  
POR CROMATOGRÁFIA EM FASE LÍQUIDA

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

Orientadora: Kátia Christina Leandro

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Vale, Renata de Freitas Dalavia

Otimização e validação da determinação do teor de glicose, frutose e manitol em bolsas de sangue por cromatografia em fase líquida / Renata de Freitas Dalavia Vale. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

161 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Kátia Cristina Leandro

1. Glicose. 2. Frutose. 3. Manitol. 4. Bolsa de Sangue. 5. Vigilância Sanitária. 6. Cromatografia Líquida. 7. Validação Analítica I. Título.

Optimization and validation of the determination of glucose, fructose and mannitol in blood bags for liquid chromatography

**Renata de Freitas Dalavia Vale**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE  
GLICOSE, FRUTOSE E MANITOL EM BOLSAS DE SANGUE  
POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra Silvana do Couto Jacob  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dr Leonardo Lucchetti Caetano da Silva  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra Glaucia Barbosa Candido Alves Slana  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dra. Kátia Christina Leandro - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

À minha família e ao meu esposo Nelson,  
por me incentivarem a percorrer este caminho  
e por serem os alicerces da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças, coragem e determinação para realizar este trabalho;  
À minha família e ao meu esposo Nelson, imensamente, pela paciência, pelo amor, e principalmente pelo apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar desafios;

A Direção do INCQS, por permitir a minha participação;

A minha orientadora Kátia Christina por confiar em mim, pelo carinho e paciência e competência com que me orientou neste estudo;

Ao Chefe do Departamento de Química, Filipe e à Chefe de Laboratório de Artigos e Insumos para Saúde, Sinéa por permitirem e apoiarem meu desenvolvimento profissional;

A minha chefe e amiga Michele Feitoza, em especial, por me encorajar, incentivar e contribuir constantemente para meu crescimento e amadurecimento profissional;

Ao Nilo Dória (*in memoriam*) por idealizar o Programa de Bolsa de Sangue;

Aos funcionários da Pós-graduação pela colaboração durante todo o meu período de estudo;

Aos membros da Banca por contribuírem para o enriquecimento deste estudo;

Ao amigo Wilson Camargo pela constante contribuição na minha formação profissional;

Ao amigo José Luís pela disponibilidade, pelo aprendizado e pela motivação nos momentos difíceis;

A amiga Anna Fust pela ajuda no laboratório e neste estudo, pelo carinho, pelos conselhos e incentivos;

Ao Renan D'Ávila e a Mariana Berendonk pelo carinho e pela grande ajuda no setor, sem os quais este estudo não poderia ser realizado;

Aos amigos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, em especial Lilian Venâncio pela ajuda, torcida e incentivo;

Aos colegas André Mazzei, Ozéias e às amigas do SQR pela ajuda para o desenvolvimento deste estudo;

Aos amigos do curso de Mestrado que compartilharam comigo esses momentos de aprendizado;

Ao amigo Sérgio Alves pelos esclarecimentos e pelas fotografias;

Aos colegas do Setor de Alimentos e Contaminantes, em especial Fábio, da Biblioteca, Alexandre e Vinícius, e todos os amigos do Setor de Esterilização pela atenção e colaboração;

A Vanessa, Christine e a direção do LAFIQ de Biomanguinhos por permitirem o uso de seu equipamento, sem qualquer restrição e interrompendo suas atividades;

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para este estudo.

“ Ninguém ignora tudo.  
Ninguém sabe tudo.  
Todos nós sabemos alguma coisa.  
Todos nós ignoramos alguma coisa.  
Por isso aprendemos sempre. ”

Paulo Freire



## RESUMO

A glicose, a frutose e o manitol são carboidratos que, nas soluções anticoagulantes e preservadoras, possuem grande importância na manutenção da viabilidade do sangue coletado. A determinação quantitativa destas substâncias deve se apresentar segura e eficaz devido sua elevada criticidade no controle da qualidade das bolsas de sangue. Esta, classificada como produto para saúde de risco III segundo o Ministério da Saúde, possui regulamentação específica utilizada pelo Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde nas análises de controle e prévias ao registro. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi otimizar e validar o método de determinação do teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol em soluções anticoagulantes e preservadoras de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detecção por índice de refração sendo, para tal, dividido em três etapas. Após a seleção das amostras de trabalho baseada na avaliação retrospectiva das amostras analisadas pelo INCQS entre 2006 e 2010 e o banco de dados da Anvisa, foi realizado o planejamento da validação analítica, compreendendo a otimização do método. Esta avaliou o fluxo de fase móvel e a temperatura do forno permitindo a redução do tempo de análise e o custo operacional com eficiência de separação comprovada pelos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico. A validação analítica, terceira etapa do estudo, foi realizada através de padrão analítico secundário qualificado e os parâmetros avaliados foram recomendados pela Anvisa, na Resolução nº 899 de 2003, e pelo Inmetro, no manual orientativo DOQ-CGCRE-008 de 2010. Nesta etapa, a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e quantificação, a precisão, a exatidão e a robustez apresentaram resultados satisfatórios que comprovaram a confiabilidade do método.

Palavras-chave: Carboidratos. Bolsa de sangue. Vigilância Sanitária. Validação Analítica.

## ABSTRACT

Dextrose, fructose and mannitol are the carbohydrates, that the solutions anticoagulants and conservationists have great importance in maintaining the viability of the blood collected. The quantification of these components should provide safe and effective due to its high critical quality control of blood bags. This is classified as a health risk to III according to the Ministry of Health has specific rules used by the National Institute of Quality Control in Health in the analysis prior to the registration and control of this product. In this context, the objective of this study was to optimize and validate the method of determination of glucose and fructose and mannitol solutions monoidratadas anticoagulants and preservers of blood bags by high performance liquid chromatography using detection by refractive index and to this end divided into three steps. After the selection of work samples based on retrospective evaluation of the samples analyzed by INCQS between 2006 and 2010 and the database of ANVISA was performed analytical validation of planning, including the optimization of the method. This assessed the flow of mobile phase and the temperature of the oven allowing the reduction of analysis time and operating costs and separation efficiency demonstrated by the parameters of adequacy of the chromatographic system. The analytical validation, the third stage of the study was performed using standard analytical qualified secondary and secondary parameters evaluated were recommended by Anvisa, in Resolution No. 899/2003, and Inmetro, the guide CGCRE DOQ-008-2010. In this step, selectivity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness had satisfactory results that proved the confiability of the method.

Keywords: Carbohydrate. Blood bag. Health Surveillance. Analytical validation.

## LISTA DE ABREVIações

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas Técnicas
<b>ACD</b>	<i>Citrate, Citric Acid, Dextrose</i> - Citrato, Ácido cítrico, Dextrose
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOAC</b>	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> – Associação Oficial de Química Analítica
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BA</b>	Bahia
<b>BPF</b>	Boas Práticas de Fabricação
<b>BPL</b>	Boas Práticas de Laboratório
<b>CEME</b>	Central de Medicamentos
<b>CENPES</b>	Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello
<b>CMD</b>	Concentração Média Determinada
<b>CPD</b>	<i>Citrate, Phosphate, Dextrose</i> - Citrato, Fosfato, Dextrose
<b>CPDA</b>	<i>Citrate, Phosphate, Dextrose, Adenine</i> - Citrato, Fosfato, Dextrose, Adenina
<b>CV</b>	Coeficiente de Variação
<b>DFT</b>	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
<b>DM</b>	Departamento de Microbiologia
<b>DNSP</b>	Departamento Nacional de Saúde Pública
<b>DOQ</b>	Documento
<b>DOU</b>	Diário Oficial da União
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DPG</b>	Difosfoglicerato
<b>DPR</b>	Desvio Padrão Relativo
<b>DPRr</b>	Desvio Padrão Relativo de Repetitividade
<b>DQ</b>	Departamento de Química
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i> – Organização de Agricultura e Alimentos
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural

<b>HORRAT</b>	Horwitz Rate
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation's</i> – Conferência Internacional de Harmonização
<b>IEC</b>	<i>International Electrotechnical Commission</i> – Comissão Internacional Eletrotécnica
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<b>IR</b>	Índice de Refração
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> – Organização Internacional de Padronização
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> – União Internacional de Química Pura Aplicada
<b>K</b>	Fator de retenção
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>MMQO</b>	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
<b>MRC</b>	Material de Referência Certificado
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>N</b>	Número de pratos teóricos
<b>NBR</b>	Norma Brasileira
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>RE</b>	Resolução Específica
<b>RID</b>	<i>Refractive Index Detector</i> - Detector de Índice de Refração
<b>Rs</b>	Resolução
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Derivation</i> – Desvio Padrão Relativo
<b>SAGM</b>	<i>Adenine, Dextrose, Manitol</i> - Adenina, Dextrose, Manitol
<b>SGA</b>	Sistema de Gerenciamento de Amostra
<b>SM</b>	Solução Mãe

<b>SNFM</b>	Serviço Nacional de Fiscalização de Medicamentos
<b>SNVS</b>	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>Tf</b>	Fator de assimetria
<b>Tr</b>	Tempo de retenção
<b>USP</b>	<i>United States Pharmacopoeia</i> - Farmacopéia Americana
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIGIPÓS</b>	Vigilância Pós-comercialização

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01 – Determinação do número de pratos teóricos para um analito. ....	48
Equação 02 – Determinação do número de pratos teóricos para dois analitos. ....	48
Equação 03 – Determinação da resolução cromatográfica. ....	49
Equação 04 – Determinação do fator de retenção. ....	49
Equação 05 – Determinação do fator de separação. ....	49
Equação 06 – Determinação do fator de cauda. ....	50
Equação 07 – Determinação da repetitividade. ....	50
Equação 08 – Determinação de teor do padrão secundário. ....	75
Equação 09 – Determinação do desvio padrão relativo da repetitividade. ....	82
Equação 10 – Determinação do desvio padrão de reprodutibilidade interna. ....	83
Equação 11 – Determinação do desvio padrão de reprodutibilidade. ....	83
Equação 12 – Determinação da recuperação. ....	84
Equação 13 – Determinação do efeito normal. ....	86
Equação 14 – Determinação do efeito da variação. ....	86
Equação 15 – Determinação do efeito. ....	86
Equação 16 – Determinação do valor de $F_{\text{crítico}}$ . ....	133
Equação 17 – Determinação do valor de $F_{\text{calculado}}$ . ....	133
Equação 18 – Determinação do valor de $t_{\text{crítico}}$ para variâncias homogêneas. ....	133
Equação 19 – Determinação do valor de $t_{\text{linear}}$ para variâncias homogêneas. ....	134
Equação 20 – Determinação do valor de $t_{\text{angular}}$ para variâncias homogêneas. ....	134
Equação 21 – Determinação do desvio padrão residual agregado para variâncias homogêneas. ....	134
Equação 22 – Determinação do desvio padrão das curvas solvente e matriz. ....	134
Equação 23 – Determinação do valor de $t_{\text{crítico}}$ para variâncias heterogêneas. ....	134
Equação 24 – Determinação do valor de $t_{\text{linear}}$ para variâncias heterogêneas. ....	134
Equação 25 – Determinação do valor de $t_{\text{angular}}$ para variâncias heterogêneas. ....	134
Equação 26 – Determinação do desvio padrão residual agregado para variâncias heterogêneas. ....	134

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Notificação de interdição cautelar de bolsa de sangue por desvio de qualidade.....	24
Figura 02 - Notificação de desvio de qualidade em bolsa de sangue caracterizado por vazamento de solução anticoagulante. ....	24
Figura 03 - Informativo de inutilização de bolsa de sangue por falha na estocagem. ....	24
Figura 04 – Fotografia da bolsa de sangue múltipla.....	30
Figura 05 - Estruturas acíclicas da glicose, da frutose e do manitol.....	36
Figura 06 - Estrutura cíclica da glicose. ....	36
Figura 07 - Estrutura cíclica da frutose.....	36
Figura 08 - Isomerização da glicose para formação de frutose.....	37
Figura 09 - Representação esquemática da glicólise anaeróbica, do ciclo das pentoses e do ciclo de Luebering-Rapoport. ....	40
Figura 10 - Fotografia do cromatógrafo do fabricante Shimadzu. ....	44
Figura 11 - Cromatograma referente a solução-padrão de glicose a 2,7 mg/mL, frutose a 0,2 mg/mL e manitol a 0,75 mg/mL na avaliação da adequação do sistema cromatográfico.....	88
Figura 12 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de glicose. ....	91
Figura 13 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de frutose. ....	92
Figura 14 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de manitol.....	93
Figura 15 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito glicose em função do tempo. ....	99
Figura 16 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito frutose em função do tempo. ....	99
Figura 17 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito manitol em função do tempo.....	100
Figura 18 - Avaliação da seletividade do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	102

Figura 19 - Comparação da matriz simulada com os analitos e a amostra comercial na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	103
Figura 21 - Comparação da matriz isenta dos analitos antes e após autoclavação na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	104
Figura 22 - Comparação da matriz com os analitos antes e após autoclavação na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	105
Figura 23: Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose.....	115
Figura 24 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de frutose.....	116
Figura 25 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de manitol. ....	117



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Composição e tempo de armazenamento máximo permitido pelos tipos de soluções anticoagulantes e soluções preservadoras. ....	32
Tabela 02 - Ensaios físicos, físico-químicos e biológicos preconizados pela Portaria nº 950 de 1998 para bolsas de sangue. ....	34
Tabela 03 - Teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol nas soluções anticoagulantes e preservadoras preconizado pela Portaria nº 950 de 1998.....	38
Tabela 04 - Critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica segundo a Farmacopéia Americana .....	51
Tabela 05 - Categorias dos ensaios analíticos de acordo com sua finalidade segundo a Anvisa e a Farmacopeia Americana.....	54
Tabela 06 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa. ....	54
Tabela 07 - Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro. ....	55
Tabela 08 - Comparação dos parâmetros de validação recomendados pela Anvisa e pelo Inmetro para os ensaios analíticos. ....	56
Tabela 09 – Intervalo de recuperação do analito em função de sua concentração na amostra. ....	61
Tabela 10 - Coeficientes de variação em função da razão de concentração do analito na amostra. ....	63
Tabela 11 – Limitações de variações permitidas nos métodos analíticos segundo a Farmacopéia Americana. ....	65
Tabela 12 - Identificação dos padrões analíticos Sigma Aldrich de glicose, frutose e manitol.....	69
Tabela 13 - Identificação dos padrões USP de glicose, frutose e manitol.....	69
Tabela 14 - Condições cromatográficas para verificação da adequação do sistema utilizando o cromatógrafo Shimadzu. ....	71
Tabela 15 - Massas aproximadas de glicose e manitol e alíquotas da solução mãe de frutose utilizadas na verificação da faixa linear. ....	72
Tabela 16 - Níveis de concentração utilizados na avaliação do fluxo da fase móvel. ....	73
Tabela 17 - Níveis de concentração utilizados na avaliação da temperatura do forno. ....	74

Tabela 18 - Níveis de concentração aproximados de glicose, frutose e manitol da curva analítica para adequação do padrão secundário.....	75
Tabela 19 - Amostras simuladas para avaliação da seletividade na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.....	77
Tabela 20 - Níveis de concentração de glicose, frutose e manitol da curva analítica. ....	78
Tabela 21 - Curva analítica da avaliação do efeito matriz na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.....	79
Tabela 22 – Grupos de replicatas da avaliação da repetitividade na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.....	82
Tabela 23 - Parâmetros de avaliação da robustez na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.....	85
Tabela 24 - Combinações de variações segundo a adaptação do teste de Youden para avaliação da robutez. ....	86
Tabela 25 - Identificação dos maiores detentores de registros de produtos contendo as soluções avaliadas .....	87
Tabela 26 - Resultados obtidos na adequação do sistema cromatográfico para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol utilizando coluna Shodex SC1011 lote 708082.....	89
Tabela 27 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de glicose. ....	90
Tabela 28 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de frutose. ....	91
Tabela 29 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de manitol.....	92
Tabela 30 - Resultados da separação cromatográfica obtida na avaliação do fluxo da fase móvel para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	94
Tabela 31 - Resultado da separação cromatográfica na avaliação da temperatura do forno para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	95
Tabela 32 - Resultados da qualificação do padrão secundário para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol. ....	97
Tabela 33 - Resultados da verificação da resposta de separação cromatográfica para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol utilizando a coluna cromatográfica Shodex SC1011 lote 011009.....	98

Tabela 34 - Resultados da avaliação da homogeneidade das variâncias do efeito matriz na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	107
Tabela 35 - Resultados da avaliação das inclinações e interseções das curvas do efeito matriz na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	107
Tabela 36 - Resultados obtidos na avaliação da linearidade na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	109
Tabela 37 - Resultados obtidos na avaliação da repetitividade na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	110
Tabela 38 - Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	111
Tabela 39 - Resultados obtidos na avaliação da recuperação na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	112
Tabela 40 - Variabilidade dos resultados dos parâmetros de adequação da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.	113
Tabela 41 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose.	114
Tabela 42 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de frutose.	115
Tabela 43 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de manitol.	116

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	23
1.1 - SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	25
1.1.1 - Histórico da vigilância sanitária .....	25
1.1.2 - O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e a importância do controle sanitário.....	28
1.1.3 - A segurança sanitária da bolsa de sangue .....	29
1.2 - BOLSA DE SANGUE .....	30
1.2.1 - Identificação do produto .....	30
1.2.2 - Controle de qualidade do produto bolsa de sangue .....	33
1.3 – DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, FRUTOSE E MANITOL .....	35
1.3.1 – Identificação dos analitos glicose, frutose e manitol.....	35
1.3.2 – Aplicabilidade dos analitos na conservação dos constituintes sanguíneos	38
1.3.3 – Revisão bibliográfica de métodos analíticos para determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol .....	42
1.3.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência .....	43
1.4 - PROGRAMA DE GARANTIA DA QUALIDADE .....	46
1.4.1 - Sistema de Gestão da Qualidade .....	46
1.4.2 – Otimização da separação cromatográfica .....	47
1.4.3 – Validação analítica .....	51
1.4.4 – Parâmetros de validação analítica .....	56
1.5. – A IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE MONOIDRATADAS E MANITOL NO CONTEXTO SANITÁRIO .....	65
2 - OBJETIVOS .....	67
2.1 - OBJETIVO GERAL .....	67
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	67
3 - METODOLOGIA .....	68
3.1 – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS .....	70
3.2 – PLANEJAMENTO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	70
3.2.1 – Adequação do sistema cromatográfico .....	71
3.2.2 – Verificação preliminar da resposta linear.....	72
3.2.3 – Otimização dos parâmetros analíticos.....	73

3.2.3.1. – Avaliação do fluxo da fase móvel.....	73
3.2.3.2. – Avaliação da temperatura do forno.....	73
3.2.4 – Qualificação do padrão secundário .....	74
3.2.5. – Verificação da resposta de separação da coluna cromatográfica .....	76
3.2.6 – Estudo da estabilidade das soluções dos analitos .....	76
3.3 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	76
3.3.1 – Avaliação da seletividade.....	76
3.3.2 – Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção .....	80
3.3.3 – Avaliação da precisão .....	81
3.3.4 – Avaliação da exatidão .....	84
3.3.5 – Avaliação da robustez .....	84
4 - RESULTADOS.....	87
4.1. – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS .....	87
4.2. – PLANEJAMENTO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	88
4.2.1. – Adequação do sistema cromatográfico .....	88
4.2.2. - Verificação preliminar da resposta linear .....	90
4.2.3 – Otimização dos parâmetros analíticos.....	94
4.2.3.1 – Avaliação do fluxo da fase móvel.....	94
4.2.3.2 – Avaliação da temperatura do forno.....	95
4.2.4 - Qualificação do padrão secundário .....	96
4.2.5 - Verificação da resposta de separação da coluna cromatográfica .....	97
4.2.6 - Estudo da estabilidade das soluções dos analitos .....	98
4.3 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	100
4.3.1 – Avaliação da seletividade.....	100
4.3.2 – Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção ...	108
4.3.3 – Avaliação da precisão .....	109
4.3.4 – Avaliação da exatidão .....	112
4.3.5 – Avaliação da robustez .....	113
5 - CONCLUSÃO .....	119
6 - REFERÊNCIAS.....	121
APÊNDICE A - DESCRIÇÃO DA PLANILHA DE AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ .....	132
APÊNDICE B - DESCRIÇÃO DA PLANILHA DE AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE	136

APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DO MATERIAL CALIBRADO UTILIZADO NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	139
APÊNDICE D – RESULTADOS DA QUALIFICAÇÃO DO PADRÃO SECUNDÁRIO SIGMA- ALDRICH UTILIZADO NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	141
APÊNDICE E – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ DAS SOLUÇÕES ANTICOAGULANTES CPDA, CPD, ACD-A E DA SOLUÇÃO PRESERVADORA SAG-M1 NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	143
APÊNDICE F – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	152
APÊNDICE G – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA REPETITIVIDADE NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	155
APÊNDICE H – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	156
APÊNDICE I – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	158
APÊNDICE J – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	159

## 1 - INTRODUÇÃO

*“ A **saúde** é direito de todos e dever do estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem a **redução do risco de doença e de outros agravos** e ao acesso universal e igualitário às **ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação** (BRASIL, 1988).”*

A Constituição Federal do Brasil de 1988 em seu artigo nº 196 reconhece a saúde como direito fundamental do ser humano estando vinculada às políticas sociais e econômicas nesta finalidade.

Neste contexto o sistema de vigilância sanitária surge fundamentado em valores orientados pelo direito social à saúde. Conceitualmente, a vigilância sanitária é entendida como um conjunto de ações legais, técnicas, informativas e fiscalizadoras que exercem o controle sanitário de atividades e serviços visando a promoção e a proteção da saúde da população (BRASIL, 1990).

A disponibilidade de insumos e produtos de saúde que cumpram requisitos de garantia de qualidade e reduzam os riscos à saúde e ao meio ambiente são asseguradas pelas ações de vigilância sanitária (BRASIL, 1990).

Entre suas atividades, temos o registro de produtos, a inspeção sanitária e certificação (quando se aplica), a fiscalização e a vigilância a eventos adversos e queixas técnicas.

Além disso, a vigilância sanitária, através da vigilância pós-comercialização (Vigipós), deve apresentar-se sensível para detectar precocemente problemas relacionados a produtos e tecnologias para originar as medidas pertinentes a redução e interrupção do risco envolvido, como no caso da bolsa de sangue (BRASIL, 2010).

Este produto, de elevada criticidade, apresenta uma regulamentação específica para o gerenciamento dos riscos sanitários envolvidos de modo a disponibilizar um produto com qualidade comprovada à população.

Neste objetivo está um dos grandes desafios da vigilância sanitária, a observação e a avaliação do risco exemplificado nas situações descritas nas figuras 01, 02 e 03 e que desencadearam ações de precaução e prevenção assumidas como prioridades pelo sistema de saúde (BRASIL, 2010).

**Figura 01 - Notificação de interdição cautelar de bolsa de sangue por desvio de qualidade.**

*Anvisa determinou a interdição cautelar, em todo o país, do lote nº E05B113 do produto Bolsa de Sangue Tripla CPDA 1, com data de validade até 11/8/2007, fabricado pela empresa Baxter Hospitalar Ltda., de São Paulo (SP). O produto apresentou resultado insatisfatório no ensaio de aspecto, segundo laudo emitido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).*

*Fonte: Anvisa*

*Data: 05/06/2006*

(Adaptado de ANVISA, 2010d)

**Figura 02 - Notificação de desvio de qualidade em bolsa de sangue caracterizado por vazamento de solução anticoagulante.**

Alertas de Tecnovigilância  
ALERTA 964

Produto: BOLSA DUPLA CPDA-1 com coletor de amostra - (Registro Anvisa: 10154450076) - Lote afetado: 71CD15AA; BOLSA TRIPLA CPDA-1, plaquetas 5 dias, com coletor de amostras - (Registro Anvisa: 10154450085) - Lotes afetados: 71CD14AB, 71CD14AC, 71CD14AD, 71CD17AB, 71CD17AC, 71CD17AD, 71CD17AE, 71CD17AF, 71CD18AA; BOLSA QUADRUPLA CPDA-1, plaquetas 5 dias, com coletor de amostra - (Registro Anvisa: 10154450085) - Lote afetado: 71CD17AA; BOLSA TRIPLA CPD/SAG-M, plaquetas 5 dias, com coletor de amostras - (Registro Anvisa: 10154450072) - Lotes afetados: 71CD16AA, 71CD16AB, 71CD16AC, 71CD16AD, 71CD16AE, 71CD16AF

Problema: Perfuração na parede das bolsas de sangue com consequente extravasamento de anticoagulante ou material biológico.

Ação: Recomenda-se aos usuários as seguintes ações: (1) Verifique no estoque a existência de produtos sob risco, citados no campo Descrição do produto deste alerta; (2) Segregue e identifique os produtos sob risco localizados; (3) Faça contato com o fornecedor/detentor do registro do produto. De acordo com informações do detentor do registro do produto, já foi iniciada a retirada de mercado dos lotes afetados do produto por meio de Carta de Comunicação aos clientes

Data da Ocorrência: 06/07/2009

(Adaptado de ANVISA, 2009)

**Figura 03 - Informativo de inutilização de bolsa de sangue por falha na estocagem.**

***Brasil inutiliza 260 mil bolsas de sangue por falha em estocagem***

*Publicidade da Folha de S.Paulo, em Brasília*

*O Brasil inutilizou parcialmente 260 mil bolsas de sangue armazenadas em hemocentros em São Paulo e Minas Gerais. Auditoria concluída em julho pela empresa francesa LFB, contratada pelo Ministério da Saúde para processar o plasma do sangue recolhido, apontou que não foi feita verificação adequada da temperatura do material, além de falhas na limpeza, poeira e fungos.*

(Adaptado de FOLHA ON LINE, 2010)



## 1.1 - SISTEMA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

### 1.1.1 - Histórico da vigilância sanitária

A Vigilância Sanitária apresenta sua estrutura como resultado de um longo processo político, administrativo e econômico. Consiste na observação contínua da distribuição e tendência de doenças mediante a coleta sistemática e a avaliação de dados de morbidade e mortalidade além da disseminação dessas informações (BUENO, 2005).

Historicamente, a vigilância sanitária procura reconstruir sua identidade devido ao rápido desenvolvimento e incorporação de tecnologias no setor da saúde privilegiando ações de cura ao longo dos anos (OMS, 2010).

O reconhecimento social da importância das ações sanitárias na solução de problemas utilizando as leis como instrumento repressor na imposição de medidas de controle sempre foi verificado e sua intensificação se deu com o avanço das forças produtivas e o incremento da função regulatória, que acompanhou a ampliação da produção de bens e serviços de interesse da saúde (COSTA, 2003).

A Idade Média registrou um período de mudança de pensamento pelo surgimento de preocupações com o estado de saúde das populações, uma vez que a doutrina mercantilista via a população como o recurso para garantir o aumento de poder e riqueza nacional. Nesse contexto, surgiu o conceito de política nacional de saúde, sendo chamado primeiramente de política médica de um Estado (COSTA & ROZENFELD, 2010).

No entanto, alguns historiadores destacam como marco histórico da vigilância sanitária o conceito de salubridade surgido no século XVIII na França, pois este desencadeou as ações sanitárias que foram estruturadas por políticas-científicas estabelecidas no século XX pela criação de órgãos nacionais de controle (COSTA & ROZENFELD, 2010).

No Brasil, o marco inicial consistiu no ato da abertura dos portos por D. João VI registrado na data de 28 de janeiro de 1808 em Salvador (BA), capital brasileira da época. As primeiras ações sanitárias consistiram não apenas no controle do porto, mas também no controle sanitário dos passageiros que aqui desembarcavam (BUENO, 2005).

Durante o império, pequenos avanços foram registrados e apenas com a proclamação da República os serviços básicos de saúde pública evoluíram pela organização administrativa sanitária e pela constituição do órgão de Vigilância Sanitária nas Unidades da Federação onde a União era responsável pelos estudos e ações de caráter sanitário (COSTA & ROZENFELD, 2010).

Os avanços nos campos bacteriológico e terapêutico do final do século XIX e início do século XX promoveram a reestruturação da vigilância sanitária principalmente durante a I e II grandes guerras (ANVISA, 2010b). Um dos importantes destaques deste período refere-se ao sanitarista Oswaldo Cruz que, pelo controle do agente etiológico dos vetores, e apesar de todas as críticas de opinião pública e do incidente da Revolta da Vacina em 1904, implementou um novo Regulamento dos Serviços Sanitários da União e a elaboração do Código Sanitário (COSTA & ROZENFELD, 2010).

Com o crescimento econômico acelerado, as atribuições da vigilância sanitária foram ampliadas de forma a acompanharem a construção da base produtiva do país (ANVISA, 2010b). Alguns dos progressos documentados foram:

- Criação do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) em 1920;
- Criação do Serviço Nacional de Fiscalização de Medicamentos (SNFM), Instituto Oswaldo Cruz, comissão de revisão da Farmacopéia, comissão de biofarmácia e a primeira Conferência Nacional de Saúde na era Vargas em 1930;
- Criação de normas de controle de produtos, disposições sobre psicotrópicos e entorpecentes em 1946;
- Segunda Conferência Nacional de Saúde e obrigatoriedade de fiscalização prévia de produtos de origem animal em 1950;
- Regulamentação da obrigatoriedade da iodação do sal de cozinha e transformação do Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP) em Ministério da Saúde (MS) em 1953;
- Realização da terceira Conferência Nacional de Saúde em 1963;
- Ampliação do campo de atuação da vigilância sanitária sendo incorporado o controle de produtos e serviços de interesse sanitário em 1964;

- Incremento nas ações preventivas de portos e fronteiras e controle de medicamentos, alimentos e drogas pela Reforma Administrativa Federal de 1967;
- Criação da Secretaria de Saúde Pública em 1970; e
- Criação da Central de Medicamentos (CEME) em 1971 (COSTA & ROZENFELD, 2010).

No entanto, a consagração da vigilância sanitária ocorreu com a Lei nº 6.360 de 1976, chamada Lei de Vigilância Sanitária, regulamentada pelo decreto nº 79.094 de 1977 e alterada posteriormente pelo decreto nº 3.961 de 2001 onde surgiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. No ano seguinte, a Lei nº 6.437 de 1977 dispôs sobre infrações à legislação sanitária federal e estabeleceu as devidas sanções. Este período propiciou uma reforma administrativa com ampla repercussão na área de vigilância sanitária marcada pela reestruturação do Ministério da Saúde (BRASIL, 1976; BRASIL, 1977a; BRASIL, 1977b; BRASIL, 2001a; BUENO, 2005).

A década de 80 foi fundamental para as mudanças ocorridas na saúde pública brasileira. O desenvolvimento da consciência democrática contribuiu para questionamentos em relação às ações do Estado concretizadas na Constituição Federal do Brasil de 1988 que reconheceu a saúde como direito de todos e dever do Estado e determinou os princípios básicos e fundamentos que orientam, ainda hoje, as ações de vigilância sanitária (BRASIL, 1988; COSTA & ROZENFELD, 2010).

A década de 90 apresentou grandes conquistas de impacto sanitário. A Lei Orgânica da Saúde nº 8.080 de 1990 influenciou diretamente sobre o Sistema Único de Saúde (SUS) criado em 1988 e redefiniu a atuação da vigilância sanitária (COSTA & ROZENFELD, 2010). Além disso, o Código de Defesa do Consumidor contribuiu para a reforma atribuindo responsabilidade aos produtores pela qualidade dos produtos e serviços fornecidos à população (BUENO, 2005).

Entretanto ainda no decorrer da década de 90, as falhas do sistema de vigilância sanitária geraram diversas críticas e a ausência de qualidade e confiabilidade na indústria farmacêutica resultaram na necessidade de reestruturação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Para esta finalidade foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) pela Lei nº 9782 de 1999 definindo o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) que ainda apresenta-se em vigor (BRASIL, 1999a; BUENO, 2005).

### 1.1.2 - O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e a importância do controle sanitário

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária em vigor compreende os componentes das três esferas de governo – federal, estadual e municipal. Na esfera federal atua a Anvisa estando submetida ao poder de tutela do Ministério da Saúde. Na esfera estadual predomina a forma organizacional de administração direta dependente dos níveis centrais das Secretarias Estaduais de Saúde. Na esfera municipal atuam organizações diversificadas com limitações sobre concepções e percepção da importância das ações sanitárias (COSTA, 2003).

Embora as três esferas apresentem competências distintas e definidas no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, a Anvisa é hoje a instituição federal responsável pela Vigilância Sanitária no Brasil promovendo a gestão dos serviços a nível federal, coordenando as ações de fiscalização e fornecendo apoio técnico para as vigilâncias estaduais e municipais no desenvolvimento um trabalho conjunto (COSTA & ROZENFELD, 2010).

A Anvisa é definida como uma autarquia sob regime especial, ou seja, uma agência reguladora caracterizada pela independência administrativa, estabilidade de seus dirigentes durante o período de mandato e autonomia financeira. Apresenta como finalidade promover a proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, sendo também responsável pelo controle de portos, aeroportos e fronteiras (ANVISA, 2010a).

Os laboratórios oficiais: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos estados (LACEN) também fazem parte do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária contribuindo com avaliações analíticas que fornecem subsídios às ações sanitárias da Anvisa e das visas estaduais e municipais (COSTA, 2003).

A natureza dessas ações é eminentemente preventiva promovendo a proteção, recuperação e reabilitação da saúde, além de atuar na identificação de fatores de riscos e danos à saúde e seus determinantes associados (COSTA, 2003). Neste contexto, o sistema de vigilância sanitária compreende entre outros os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de

higiene e saneantes estabelecendo normas que visam a obtenção de produtos com qualidade e a redução do risco sanitário à população (BRASIL, 1976).

### 1.1.3 - A segurança sanitária da bolsa de sangue

As bolsas de sangue são produtos submetidos ao sistema de vigilância e encontram-se na classe de produtos que inicialmente era denominada de correlatos, e atualmente designada como produtos para a saúde (ANVISA, 2010e). Conceitualmente os produtos para a saúde englobam todos aqueles que não se enquadram nas definições de insumo farmacêutico, medicamento ou droga (BRASIL, 1976).

De acordo com a RDC nº 185 de 2001, o produto bolsa de sangue está classificado devido à sua complexidade técnica como um produto de risco III, estando sob controle direto do Ministério da Saúde e sendo, em grande parte, importado e com pequena participação da indústria nacional (BRASIL, 2001b; ANVISA, 2010e).

Para a obtenção do registro de bolsas de sangue na Anvisa, estas devem obrigatoriamente, apresentar conformidade com a legislação vigente comprovada através da análise prévia em laudos técnicos emitidos pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde que atua como laboratório de referência nacional para o controle da qualidade de produtos e serviços vinculados à vigilância sanitária (BRASIL, 2010).

Para esta atividade, os departamentos de Farmacologia e Toxicologia (DFT), Microbiologia (DM) e Química (DQ) realizam além das análises prévias, análises fiscais e análises de orientação técnica na avaliação da qualidade e segurança sanitária do produto (INCQS, 2010a).

## 1.2 - BOLSA DE SANGUE

### 1.2.1 - Identificação do produto

Conceitualmente, as bolsas de sangue consistem em bolsas plásticas estéreis, completas com tubo de coleta, tubos de saída e agulha para coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e suas substâncias. Podem apresentar soluções anticoagulantes e soluções preservadoras, tubos de transferência e recipientes associados denominados de bolsas satélites, dependendo da aplicação (ABNT, 2003). A figura 04 apresenta uma fotografia da bolsa de sangue.

As bolsas de sangue são utilizadas para coleta e armazenamento do sangue, devem manter a qualidade do sangue e seus componentes, permitir a coleta, o armazenamento, o fracionamento e a transfusão de sangue eficiente e segura, possibilitando compatibilidade funcional com os equipos para transfusão de sangue e fornecendo resistência à ruptura e deterioração (ABNT, 2003).

Figura 04 – Fotografia da bolsa de sangue múltipla.



Como características gerais deve apresentar-se de forma transparente, incolor, flexível, estéril, apirogênica, isenta de toxicidade, resistente e compatível com o conteúdo sob condições normais de estocagem. Deve possuir estabilidade

biológica, química e física em relação ao seu conteúdo durante o período de validade, não permitindo a entrada de micro-organismos nem a liberação de qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante e preservadora, sangue ou componentes (BRASIL,1998).

As bolsas podem apresentar-se como simples (única bolsa) ou conter bolsas múltiplas (bolsas satélites), interligadas por tubos plásticos (BRASIL, 2010). Quanto à presença de solução anticoagulante e solução preservadora, podem ser classificadas pelo tipo de solução que apresentam e na ausência de solução são chamadas de bolsas secas.

Existem quatro tipos de soluções anticoagulantes e dois tipos de soluções preservadoras que diferem entre si quanto à sua composição, permitindo variações no tempo máximo de conservação do sangue. Por esta razão, a solução consiste numa característica importante da bolsa de sangue. Na tabela 01 estão descritos os tipos de soluções anticoagulantes e soluções preservadoras que existem, a variação de composição e o tempo de armazenamento máximo permitido. Cabe ressaltar que as soluções anticoagulantes ACD-A e ACD-B e as soluções preservadoras SAG-M1 e SAG-M2, respectivamente, apresentam as mesmas substâncias que variam em teores (concentrações) e por isso, na tabela constam apenas como um tipo de solução.

Tabela 01 - Composição e tempo de armazenamento máximo permitido pelos tipos de soluções anticoagulantes e soluções preservadoras.

<b>Tipo de Solução</b>	<b>Substância</b>	<b>Tempo de armazenamento</b>
Solução ACD	Ácido cítrico anidro	até 21 dias
	Citrato de sódio diidratado	
	Glicose monoidratada	
Solução CPD	Citrato de sódio diidratado	até 21 dias
	Ácido cítrico anidro	
	Fosfato diácido de sódio monoidratado	
	Glicose monoidratada	
Solução CPDA	Sódio	até 35 dias
	Citrato de sódio diidratado	
	Ácido cítrico anidro	
	Fosfato diácido de sódio monoidratado	
	Glicose monoidratada	
Solução SAG-M	Adenina	até 42 dias
	Sódio	
	Adenina	
	Glicose monoidratada	
Solução SAG-M	Manitol	até 42 dias
	Sódio	
	Sódio	

(Fonte: Adaptado de BRASIL, 1998)

Muitos estudos foram realizados quanto à questão do armazenamento do sangue e seus componentes. De acordo com a Farmacopéia Americana, o sangue e seus componentes podem ser utilizados logo após a coleta ou até o tempo máximo de armazenamento permitido pela solução anticoagulante ou preservadora utilizada quando conservada à temperatura de 1 a 6 °C (WHOLE, 2011).

A prevenção de alterações nos constituintes sanguíneos é permitida pelas inúmeras reações bioquímicas promovidas pelas substâncias da solução



anticoagulante e da solução preservadora e pelas condições de armazenamento do sangue.

Conforme descrito por Costa Junior (2006), a embalagem da bolsa favorece a permeabilidade do gás carbônico produzido no consumo de glicose, reduzindo a taxa de hemólise em relação às substâncias da solução. Segundo seu estudo, resumidamente, o citrato, o fosfato e o manitol contribuem para a estabilização da membrana celular, mantendo o controle do pH. Além disso, menciona que o citrato atua também na anticoagulação e a adenina e a glicose contribuem para a manutenção dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), fornecendo substrato e atuando como fonte de energia.

A legislação sanitária que descreve o controle da qualidade das bolsas de sangue é a Portaria nº 950 de 26 de novembro de 1998 que apresenta-se em processo de revisão. Esta legislação está relacionada com os principais compêndios oficiais e normas técnicas internacionais, e regulamenta as condições exigíveis de qualidade (BRASIL, 1998).

#### 1.2.2 - Controle de qualidade do produto bolsa de sangue

As análises de controle de qualidade são procedimentos ou ensaios realizados para a verificação da conformidade do produto em relação às informações declaradas. No Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, as análises contribuem para a avaliação da qualidade de insumos, produtos, ambientes ou mesmo serviços sujeitos à vigilância sanitária (INCQS, 2010b).

Considerando a complexidade do produto bolsa de sangue, as análises de controle de qualidade visam a verificação dos parâmetros estabelecidos na legislação vigente (aspectos gerais e específicos) através de ensaios físicos, físico-químicos e biológicos conforme descrito na tabela 02 (BRASIL, 1998).

Tabela 02 - Ensaio físicos, físico-químicos e biológicos preconizados pela Portaria nº 950 de 1998 para bolsas de sangue.

<b>Tipo de ensaio</b>	<b>Ensaio</b>
Ensaio Físicos	Esvaziamento sob pressão, tração nos tubos, fixação de agulha, permanência do rótulo, velocidade de coleta, transparência, pH, permeabilidade ao vapor d'água, resistência e deformação a vazamento, alça de suspensão, estabilidade térmica, volume de conteúdo, absorvância
Ensaio Físico-químicos	Teor de fosfato diácido de sódio, teor de glicose, frutose e manitol, teor de citrato de sódio, teor de sódio total, teor de adenina, teor de ácido cítrico, matéria oxidável, teor de cloreto, acidez/alcalinidade, resíduo por evaporação, absorção do extrato (UV), di (2- etil- hexil) ftalato extraível, teor de 5 - Hidroximetilfurfural, teor de amônia
Ensaio Biológicos	Citotoxicidade, toxicidade sistêmica aguda, esterilidade, pirogênio / endotoxinas bacterianas, hemólise

(Fonte: Adaptado de BRASIL, 1998)

O controle das soluções anticoagulantes e preservadoras apresenta destaque sendo realizado por meio de ensaios físicos e físico-químicos. Os ensaios físicos realizados são determinação de pH e determinação do volume médio e os físico-químicos realizados são na maioria ensaios de doseamento das substâncias, de contaminantes e de produtos de degradação resultantes do processo de autoclavação do produto (BRASIL, 1998).

Segundo o estudo desenvolvido por Vale (2010), a importância das soluções anticoagulantes e preservadoras na manutenção da vitalidade do sangue foi justificada pela verificação de que os ensaios físico-químicos corresponderam a 80,5% de todas as insatisfatoriedades encontradas nas análises de controle de qualidade do produto no período de 1999 a 2008.

Nesta avaliação verificou-se ainda que os ensaios considerados mais críticos foram os ensaios de determinação dos teores de glicose e frutose monoidratadas e manitol, isto devido a verificação dos percentuais de reprovações encontrados em relação a todos os ensaios físico-químicos (15,8% para o ensaio de determinação do teor de manitol e 12,8% para o ensaio de determinação do teor de glicose e frutose monoidratadas). Logo, a determinação quantitativa desses analitos apresenta grande relevância ressaltando a importância deste estudo no contexto sanitário (VALE, 2010).

### 1.3 – DETERMINAÇÃO DE GLICOSE, FRUTOSE E MANITOL

#### 1.3.1 – Identificação dos analitos glicose, frutose e manitol

A glicose, também denominada de glucose e dextrose, e a frutose, também chamada de levulose, são carboidratos identificados como os monossacarídeos mais abundantes na natureza. Já o manitol não se apresenta como um carboidrato muito abundante na natureza (FERREIRA, ROCHA, SILVA, 2009; LENINGER, 2011).

A glicose, a frutose e o manitol apresentam propriedades físicas semelhantes, são sólidos brancos, solúveis em água e insolúveis em solventes apolares e devido a estrutura molecular, divergem em outras propriedades como ponto de fusão e desvio da luz polarizada (LEHNINGER, 2011; FRUCTOSE, 2006; GLUCOSE, 2006; MANNITOL, 2006; FERREIRA, ROCHA, SILVA, 2009).

A glicose, a frutose e o manitol apresentam esqueleto carbônico na forma não ramificada, acíclica e, em soluções aquosas, a glicose e a frutose assumem estruturas cíclicas características da ciclização de monossacarídeos de 5 a 6 átomos de carbono buscando a configuração mais estável (LEHNINGER, 2011; JUNIOR, 2008).

As estruturas moleculares acíclicas da glicose, da frutose e do manitol apresentam-se na figura 05 e as estruturas cíclicas da glicose e da frutose nas figuras 06 e 07 respectivamente.

Figura 05 - Estruturas acíclicas da glicose, da frutose e do manitol.

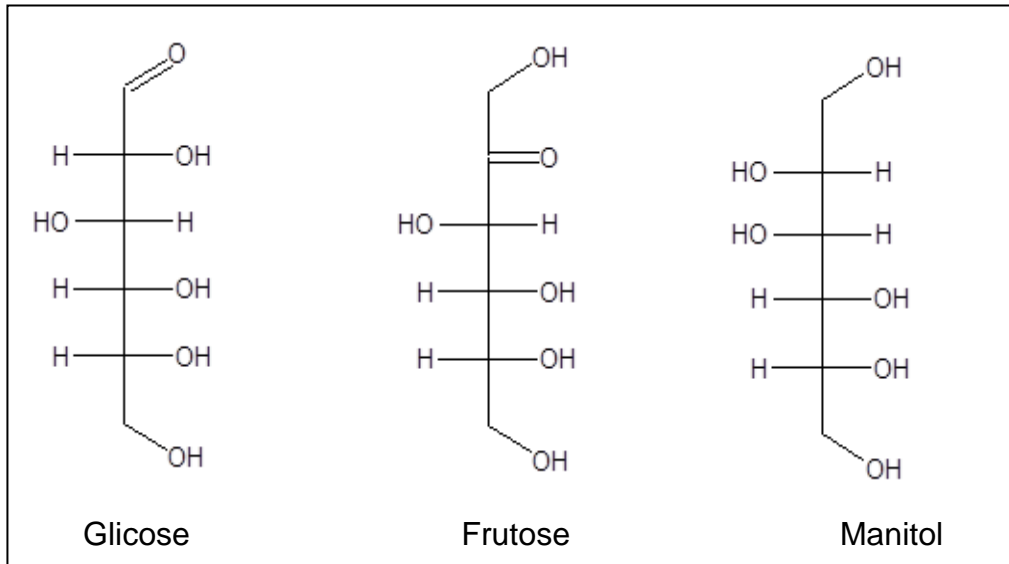


Figura 06 - Estrutura cíclica da glicose.

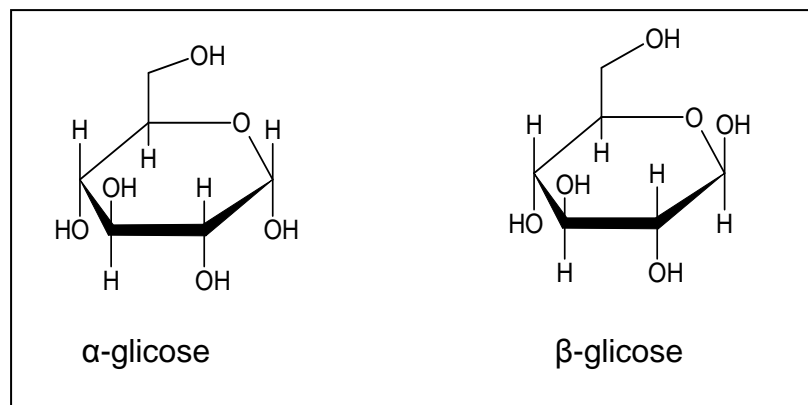
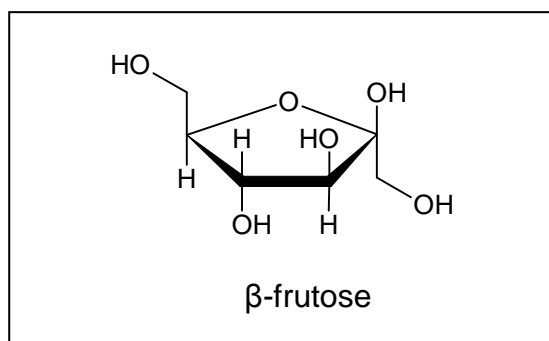


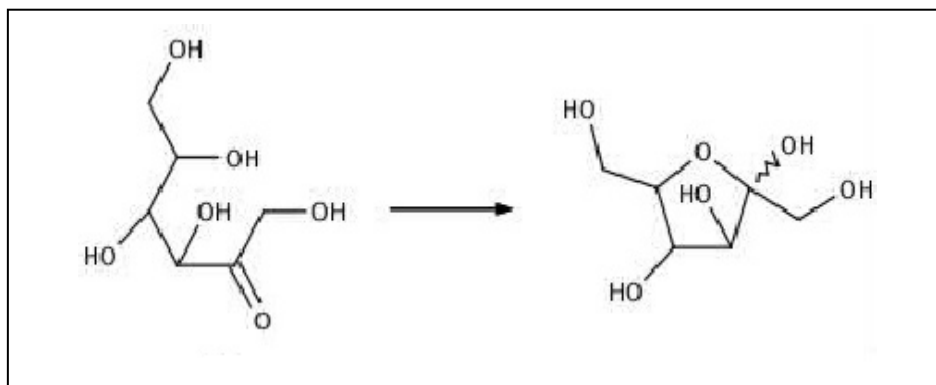
Figura 07 - Estrutura cíclica da frutose.



A presença do carbono assimétrico nos monossacarídeos confere a característica de forma isomérica opticamente ativa indicando a formação de dois grupos, isômeros D e isômeros L, baseados na configuração do gliceraldeído. Em solução aquosa, os derivados hemiacetais ou hemicetais<sup>1</sup> formados apresentam um carbono assimétrico adicional que origina duas formas de estereoisômeros designados  $\alpha$  e  $\beta$ . Neste caso, após o estabelecimento do equilíbrio, a glicose apresenta aproximadamente um terço de estruturas  $\alpha$  e dois terços de estrutura  $\beta$  e apenas pequenas formas lineares. Já a frutose, divergindo da glicose, assume como forma mais comum a configuração  $\beta$  (LEHNINGER, 2011).

Nas diferentes soluções anticoagulantes e preservadoras, a glicose se apresenta em níveis elevados de concentração em relação às demais substâncias devido a sua aplicabilidade. Possui como característica a formação de frutose por isomerização conforme apresentado na figura 08 (FEREIRA & ROCHA, 2009).

Figura 08 - Isomerização da glicose para formação de frutose.



Além disso, é verificada a formação do subproduto tóxico 5-hidroximetilfurfural devido ao efeito de elevadas temperaturas sobre a glicose e a frutose, decorrente da etapa de autoclavação e do armazenamento indevido (TEMPLETON, 2003; ANDRADE, 2009). Este subproduto apresenta, em soluções anticoagulantes, o teor máximo permitido correspondente a 3 ppm na solução ACD-B e 5 ppm para as

<sup>1</sup> Hemiacetais ou hemicetais - Derivados da formação de estrutura cíclica pela reação entre alcoóis e aldeídos ou cetonas (LEHNINGER, 2011).

demais soluções (BRASIL, 1998). Seu monitoramento apresenta-se também importante, pois acima dos limites estabelecidos este subproduto pode ocasionar febre e até mesmo óbito (ANDRADE, 2009).

O manitol apresenta-se somente em soluções aditivas denominadas soluções preservadoras SAGM sob duas variações. Essas soluções apresentam-se em bolsas satélites ligadas a bolsa principal que recebe o sangue coletado e possui a solução anticoagulante CPD (COSTA JUNIOR, 2006).

A tabela 03 descreve o teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol preconizado pela legislação vigente para as soluções anticoagulantes e preservadoras:

Tabela 03 - Teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol nas soluções anticoagulantes e preservadoras preconizado pela Portaria nº 950 de 1998.

<b>Tipo de Solução</b>	<b>Teor de glicose e frutose monoidratadas</b>	<b>Teor de manitol</b>
Solução ACD-A	entre 23,28 a 25,73g	ausente
Solução ACD-B	entre 13,96 a 15,44g	ausente
Solução CPD	entre 24,22 e 26,77g	ausente
Solução CPDA	entre 30,30 e 33,50g	ausente
Solução SAG-M1	entre 8,55 e 9,45g	entre 4,99 e 5,51g
Solução SAG-M2	entre 20,90 e 23,10g	entre 7,12 e 7,87g

(Adaptado de BRASIL, 1998)

### 1.3.2 – Aplicabilidade dos analitos na conservação dos constituintes sanguíneos

Conforme já descrito, as substâncias das soluções anticoagulante e preservadora apresentam finalidades distintas na conservação das características dos constituintes sanguíneos: plasma, hemácias (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas que, no organismo, possuem as funções:

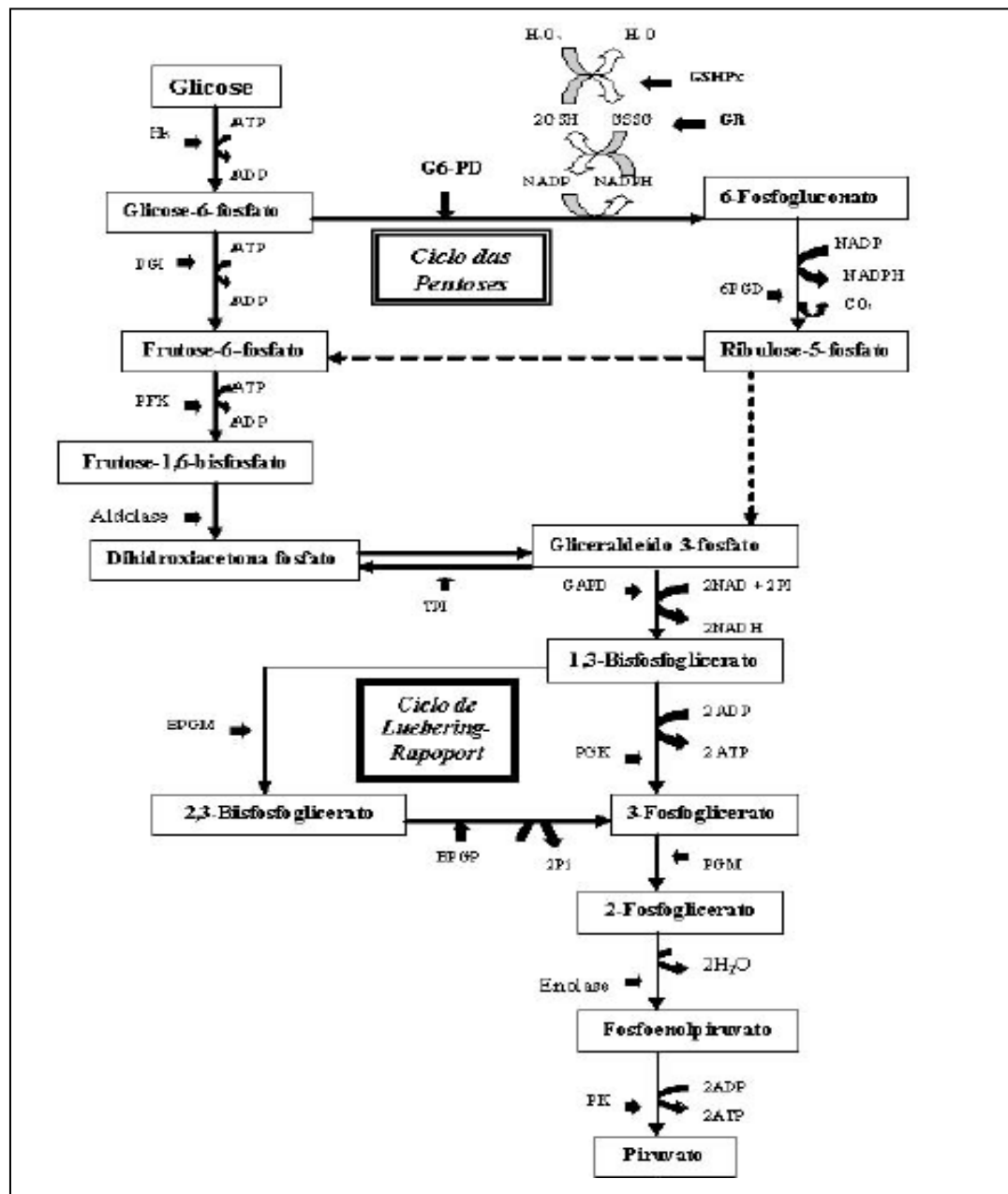
- Plasma: circulação de sais minerais, proteínas relacionadas com a coagulação do sangue (fatores da coagulação) e com a defesa contra infecções (imunoglobulinas), hormônios, enzimas e as células do sangue;
- Hemácias: transporte de oxigênio do pulmão a todas as partes do organismo e de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões através da proteína chamada hemoglobina;
- Leucócitos: linha de defesa do organismo para combate aos microorganismos que invadem o corpo; e
- Plaquetas: coagulação sanguínea pela interrupção de sangramento após um ferimento (FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO, 2010).

Neste contexto, a glicose e a frutose atuam recuperando a viabilidade das hemácias comprometidas na coleta e no armazenamento do sangue, fornecendo energia e contribuindo para os níveis de adenosina trifosfato (ATP).

Segundo Lehninger (2011), a glicose consiste na principal fonte de energia metabólica através da via de glicólise anaeróbica, também chamada de via de Embden-Meyerhof, e neste processo a frutose contribui através do produto obtido na sua fosforilação pela hexoquinase, que consiste na enzima reguladora desta via.

A via da glicólise anaeróbica consiste num equilíbrio que envolve a via das pentoses e a via de Rapoport-Luebering. Sendo a primeira, também chamada de via das hexoses monofosfato ou fosfogluconato produtora de NADH, importante co-fator na reação da metahemoglobina redutase, e a segunda reguladora do estoque intracelular de 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG). Em condições normais, o consumo de glicose é cerca de 90% pela via de glicose anaeróbica e 10% pela via das pentoses sendo esta última não produtora ATP (DAVID, 2010; apud LEE et al, 1999). A figura 09 descreve a via de glicólise anaeróbica, do ciclo das pentoses e via de Rapoport-Luebering.

Figura 09 - Representação esquemática da glicólise anaeróbica, do ciclo das pentoses e do ciclo de Luebering-Rapoport.



(Adaptado de LEE et al,1999; SANTOS, 2008 )

A hemácia apresenta sua capacidade de transportar oxigênio relacionada diretamente com o nível de 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG) responsável pela afinidade da hemoglobina ao oxigênio. Este componente se liga a uma fenda na hemoglobina,



denominada sub-unidade  $\beta$ , gerando a deoxihemoglobina que estabiliza a hemoglobina e promove uma baixa afinidade pelo oxigênio (COSTA JUNIOR, 2006; BERTOLETTI, 2009). Além desta função, o 2,3-DPG inibe a via das pentoses e o metabolismo dos nucleotídeos regulando a produção de ATP. O desvio da via da glicólise anaeróbica para a via de Rapoport-Luebering está relacionado com a regeneração do nível de 2,3-DPG promovida por elevações no pH intracelular e pelo efeito da hipóxia (redução da pressão de oxigênio) (DAVID, 2009).

A adenosina trifosfato (ATP) por sua vez é um nucleotídeo importante no controle do balanço eletrolítico da bomba de sódio e potássio, na manutenção da forma celular, no aumento da flexibilidade e na produção de energia para regeneração de compostos vitais à hemácia (COSTA JUNIOR, 2006). A redução dos seus níveis, associada a queda do pH, promove a hemólise das células resultando no extravasamento de potássio para o meio (BENETTI, 2011).

Na coleta do sangue, o metabolismo das células ocasiona uma redução de pH, pelo consumo de energia na metabolização da glicose pela via da glicólise anaeróbica, favorecendo a degradação de DPG. Neste sentido, o controle da temperatura visa evitar a degradação acelerada admitindo a relação existente entre o pH e a temperatura (HASHIMOTO, 1997; COSTA JUNIOR, 2006).

Durante o armazenamento do sangue, as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase são inativadas devido a queda do pH promovendo o crescimento do consumo de ATP como fonte de energia, sendo verificada a redução dos seus níveis, potencializada também pela redução de 2,3DPG (COSTA JUNIOR, 2006). O equilíbrio é estabelecido através da via de Rapoport-Luebering que aumenta o estoque intracelular de DPG e regenera o nível de ATP. Neste caso, outros substratos são utilizados como fonte de energia e a 2,3 DPG atua apenas como reguladora dos níveis de ATP (HASHIMOTO, 1997).

O estudo da atuação do manitol leva em consideração que as soluções aditivas em que este se apresenta entram em contato apenas com as hemácias após a separação do plasma. Segundo Tomczak (2011), essas soluções apresentam substâncias que atuam na manutenção da viabilidade e na funcionalidade evitando a hemólise.

Segundo Costa Junior (2006), o manitol possui a função de estabilizar a membrana celular, promovendo a impermeabilização, mantendo os níveis elevados de pH intracelular e reduzindo a taxa de hemólise. Entretanto, Sesshi (2010) relata

que o mecanismo envolvido na atuação do manitol ainda não está conhecido completamente. Segundo seu estudo, inicialmente acreditava-se que atuava no equilíbrio osmótico substituindo proteínas plasmáticas e impedindo a célula de ultrapassar seu volume hemolítico crítico. Porém, foi comprovado que o equilíbrio osmótico celular depende também de outros fatores, como depleção do 2,3DPG, parada da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  da membrana plasmática e redução da temperatura e do pH.

### 1.3.3 – Revisão bibliográfica de métodos analíticos para determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol

Caracterizada a sua importância no controle de qualidade das soluções anticoagulantes e preservadoras, para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol, na revisão bibliográfica observa-se a recomendação de diferentes métodos e técnicas pelos principais compêndios oficiais e pela legislação vigente – Farmacopéia Brasileira, Farmacopéia Americana, Farmacopéia Européia e Portaria nº 950/1998.

Cabe ressaltar ainda que a Farmacopéia Brasileira na sua 4ª edição (2005) descrevia as soluções anticoagulante CPD e ACD e seus respectivos controles, mas na sua 5ª edição (2011) não relaciona essas soluções (SOLUÇÃO, 2005a, 2005b).

Para a determinação de glicose, os compêndios recomendam métodos pelas técnicas de polarimetria, volumetria, gravimetria e cromatografia em fase líquida.

A técnica de polarimetria apresenta-se recomendada pela 4ª edição da Farmacopéia Brasileira e pela Farmacopéia Americana apenas para o doseamento de soluções anticoagulantes ACD permitindo a determinação de glicose anidra através do desvio da luz polarizada (SOLUÇÃO, 2005a; ANTICOAGULANT, 2011b).

A técnica de volumetria apresenta-se recomendada pela Farmacopéia Européia e consiste numa extração seguida de acidificação para titulação com tiosulfato de sódio utilizando amido como indicador. O resultado obtido corresponde somente ao teor de glicose anidra (ANTICOAGULANT, 2011a).

A técnica de gravimetria apresenta-se descrita na Farmacopéia Americana, na 4ª edição Farmacopéia Brasileira para determinações em soluções anticoagulantes CPD e CPDA e na legislação vigente. Consiste na reação com

tartarato cúprico alcalino seguido de secagem para a determinação de resíduo equivalente ao teor de glicose monoidratada (BRASIL, 1998; SOLUÇÃO, 2005b; ANTICOAGULANT, 2011c; ANTICOAGULANT, 2011d).

As determinações da quantificação de frutose e manitol não se apresentam descritas pelos compêndios oficiais, apresentando-se apenas recomendada pela legislação vigente através da técnica de cromatografia em fase líquida (BRASIL, 1998). Conforme estudo realizado por Vale (2010), este ensaio apresenta-se descrito sob condições de determinação bastante semelhantes na monografia específica para manitol da Farmacopéia Americana (MANITOL, 2011).

A cromatografia líquida é a única técnica que permite a quantificação conjunta de glicose e frutose monoidratadas e manitol e consiste no principal método de determinação segundo a legislação vigente. Neste método, o resultado é obtido pela comparação das áreas da amostra e do padrão em tempos de retenção diferenciados e expressos em termos de glicose e frutose monoidratadas pelo somatório dos resultados e de manitol (BRASIL, 1998).

A técnica por cromatografia em fase líquida apresenta-se relacionada em muitos trabalhos científicos com resultados favoráveis para a quantificação de glicose e frutose conforme observado por Aquino et al (2004) e Santos et al (2006) e quantificação de glicose, frutose e manitol por Leitão (2009) e Fontes (2009), sendo priorizada devido às desvantagens observadas na técnica de polarimetria, que não permite a visualização do quantitativo de glicose convertido em frutose em soluções anticoagulantes e nas técnicas de volumetria e gravimetria que determinam apenas o teor de glicose anidra (VALE, 2010).

#### 1.3.4 - Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de cromatografia em geral consiste na distribuição dos componentes da amostra entre duas fases, sendo uma delas fixa denominada de fase estacionária e a outra em movimento e por isso denominada de fase móvel. A fase móvel pode ser líquido, gás ou fluido supercrítico e a fase estacionária pode ser um sólido ou líquido fixo em uma superfície sólida ou gel (CHROMATOGRAPHY, 2011). Conforme descrito na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira (2005), a

identificação ou determinação quantitativa depende da associação com outras técnicas de detecção e medida (CROMATOGRAFIA, 2005).

Restringindo esta abordagem para a técnica cromatográfica envolvida neste estudo, temos a cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de troca iônica.

A cromatografia líquida de alta eficiência surgiu como uma alternativa para a cromatografia líquida tradicional, pois possibilitou a redução do tempo de análise através de colunas com micropartículas de propriedades controladas de pureza, área superficial, distribuição de tamanho e poro (CENPES, 1985; SKOOG et al., 2002). Consiste numa técnica de separação com base em uma fase sólida estacionária e uma fase líquida móvel que permite separações por partição, adsorção, ou processos de troca iônica, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (CHROMATOGRAPHY, 2011).

Os componentes do cromatógrafo consistem em sistema de bombeamento, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados (registrador) conforme apresentado na figura 10.

Figura 10 - Fotografia do cromatógrafo do fabricante Shimadzu.



O sistema de bombeamento apresenta a finalidade de promover a corrida de volumes programados de fase móvel presente nos reservatórios junto da amostra injetada manualmente ou por injeção automática através da coluna cromatográfica (CHROMATOGRAPHY, 2008; LIQUID, 2008).

A separação ocorre na coluna cromatográfica que, normalmente, é feita de aço inoxidável com dimensões variadas de comprimento e diâmetro interno, tendo sua durabilidade de aplicação aumentada através da utilização de pré-colunas específicas que removem materiais particulados e contaminantes (SKOOG et al., 2002).

O tipo de coluna cromatográfica empregado está relacionado com o mecanismo de separação envolvido na atuação da fase estacionária. Neste sentido, a coluna de troca iônica apresenta como fase estacionária uma resina trocadora de íons composta por grupos funcionais carregados ligados a uma única matriz polimérica com sílica ou copolímero do tipo poliestireno-divinilbenzeno. Neste processo, a fase móvel que também contém espécies iônicas promove uma competição com a fase estacionária pela distribuição das espécies presentes na amostra (CROMATOGRAFIA, 2011).

O detector emite sinal informativo a ser descrito pelo registrador, integrador, ou também chamado, sistema de aquisição de dados, e que também controla as condições cromatográficas (CHROMATOGRAPHY, 2008; CROMATOGRAFIA, 2011).

Segundo Almeida (2009), o detector ideal deve ser sensível a pequenas variações dos constituintes da amostra. Existem diferentes tipos de detectores com aplicações distintas em cromatografia líquida e são exemplos o detector de ultravioleta-visível, o detector de fluorescência, o detector de arranjo de diodos e o detector de índice de refração (VOGEL et al., 2002).

O detector de índice de refração (RID) responde às alterações das propriedades físicas promovidas pela amostra na fase móvel, ou seja, a diferença do índice de refração apenas da fase móvel pura e da fase móvel contendo o analito. Este detector é indicado para análises de compostos que não absorvem satisfatoriamente na região do ultravioleta-visível e apresenta elevada sensibilidade a pequenas alterações na composição do solvente, vazão e temperatura (CROMATOGRAFIA, 2011). E, por isso, adequadamente utilizado na cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de troca iônica que segundo a Farmacopéia

Americana é considerada uma técnica valiosa para analitos iônicos ou ionizáveis que apresentam pouca ou nenhuma absorção nesta região (ÍON, 2011).

A interpretação dos sinais cromatográficos obtidos pelo sistema de aquisição de dados deve considerar a avaliação de alguns parâmetros conforme critérios que assegurem um desempenho adequado do processo cromatográfico. Alguns dos parâmetros avaliados são: tempo de retenção, fator de retenção, fator de assimetria, resolução, número de pratos teóricos e altura equivalente de prato teórico (CHROMATOGRAPHY, 2011). Esses parâmetros serão descritos na etapa seguinte que contempla a garantia da qualidade dos resultados obtidos através da adequação do método e da validação analítica.

## 1.4 - PROGRAMA DE GARANTIA DA QUALIDADE

### 1.4.1 - Sistema de Gestão da Qualidade

A cromatografia em fase líquida de alta eficiência como técnica de separação se destaca na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas quando acoplada a um detector em amostras relacionadas com aspectos de saúde pública, monitoramento ambiental, comércio exterior e controle de qualidade de produção. Em virtude das possíveis consequências desastrosas e de prejuízos irreparáveis mediante resultados errôneos, são exigidas constantes demonstrações da comparabilidade e da rastreabilidade dos resultados analíticos obtidos (RIBANI, 2004b).

Para fornecer a garantia da qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos surge, então, o conceito de controle de qualidade estando este relacionado com todos os processos envolvidos (HIENE, 2009).

Neste contexto, a qualidade deve ser vista como um sistema com responsabilidade e autoridade definidas e demonstradas por meio de um Sistema de Gestão da Qualidade que apresenta a finalidade de aplicar o princípio da qualidade do ponto de vista sanitário, ou seja, segurança, eficácia e rastreabilidade (BRASIL, 2000).

Logo, para apresentar garantia da qualidade, não apenas o método analítico, mas também o laboratório, devem demonstrar sua competência técnica na produção de resultados e para este objetivo as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e as normas ISO, entre elas, a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 fornecem subsídios para a elaboração de um Sistema da Qualidade (ABNT, 2005; BRASIL, 1999b).

Esta norma relaciona os requisitos necessários para a realização de ensaios e/ou calibrações, incluindo amostragem, de métodos normalizados e métodos não normalizados (ABNT, 2005).

O Sistema da Qualidade para satisfazer a necessidade de seus clientes, das autoridades regulamentadoras ou das organizações que fornecem reconhecimento deve obedecer a parâmetros administrativos e técnicos estabelecidos pela norma.

Administrativamente, deve apresentar uma estrutura organizacional e gerencial que assegure a qualidade de seus resultados e deve possuir um sistema de gestão apropriado que estabeleça e mantenha procedimentos de controle de documentos, subcontratações ou aquisições, análise crítica, além de ações corretivas e preventivas buscando sempre a melhoria das atividades.

Tecnicamente, deve qualificar seus profissionais para o desenvolvimento das atividades, possuir acomodações adequadas e livres de possíveis interferências, utilizar métodos normalizados ou validados, possuir os equipamentos, materiais e padrões de referência adequados e necessários, disponibilizar documentação necessária para a amostragem adequada e para a comprovação da rastreabilidade visando sempre a garantia da qualidade de resultados de forma clara e precisa (ABNT, 2005).

Sendo o método em estudo utilizado no controle da qualidade do produto bolsa de sangue, esta necessita da comprovação da eficiência técnica na produção de resultados confiáveis permitidos através de um método que apresente uma separação cromatográfica otimizada e os parâmetros de validação estabelecidos para atender adequadamente ao Sistema de Vigilância Sanitária.

#### 1.4.2 – Otimização da separação cromatográfica

Uma separação cromatográfica pode ser otimizada pela variação das condições experimentais até que se obtenha a eficiência de separação sob

condições analíticas de mínimo consumo de fase móvel e menor tempo de análise (SKOOG et al., 2002). A determinação das condições analíticas ideais de reprodução permite a redução de tempo da análise, dos custos envolvidos e a obtenção de resultados confiáveis pela redução de sua variabilidade durante a etapa de validação analítica e na implementação do método na rotina (MILLER, 2005).

Este processo pode ser realizado por diferentes técnicas de planejamento experimental envolvendo diferentes análises estatísticas. A avaliação do efeito de cada variável isoladamente consiste numa dessas técnicas sendo realizada por testes consecutivos para determinação da influência da variável no processo buscando a eficiência da separação analítica (MILLER, 2005).

Os fatores fundamentais que determinam a eficiência da separação estão relacionados diretamente com as características da fase móvel e da fase estacionária e consistem em:

- Número de pratos teóricos (N): Determina a eficiência da coluna cromatográfica indicando que quanto maior for o número de pratos teóricos, maior a eficiência de separação. Este parâmetro apresenta-se relacionado com o analito e as condições cromatográficas podendo ser calculado por diferentes equações levando-se em conta o formato do sinal e, admitindo distribuição gaussiana, apresenta a equação 01 para seu cálculo na presença de apenas um analito e a equação 2 na presença de dois analitos (ALBERT, 2001; CHROMATOGRAPHY, 2011);

$$N = 16 * (t/W)^2$$

Equação 01 – Determinação do número de pratos teóricos para um analito.

$$N = (2 (t_2 - t_1)) / (W_2 - W_1)$$

Equação 02 – Determinação do número de pratos teóricos para dois analitos.

Sendo:

t = tempo de retenção do analito

W = largura do sinal na altura da linha de base.

- Resolução (Rs): Indica quantitativamente a capacidade de separação de dois ou mais analitos, sendo influenciada pela seletividade, retenção e eficiência



de separação conforme apresentado na equação 03 (CHROMATOGRAPHY, 2011; AGUIAR, 2008);

$$R = \frac{1}{4} ((\alpha - 1)/\alpha) * (\sqrt{N}) * (k_2/(1+k_2))$$

Equação 03 – Determinação da resolução cromatográfica.

Sendo:

$\alpha$  = fator de seletividade

N = Número de pratos teóricos

$k_2$  = fator de capacidade do analito 2

- Fator de retenção ou fator de capacidade (k): Determina a eficiência do processo de separação que ocorre na interface entre as duas fases, ou seja, o grau de afinidade entre as fases móvel e estacionária e o analito sendo numericamente definido pela equação 04 (VOGEL, 2002; AGUIAR, 2008);

$$k = (V_r - V_0) / V_0 \text{ ou } k = (t_r - t_0) / t_0$$

Equação 04 – Determinação do fator de retenção.

Sendo:

$V_r$  = volume do analito

$V_0$  = volume morto

$t_r$  = tempo de retenção do analito

$t_0$  = tempo morto ou tempo de permanência do analito na fase móvel

- Fator de separação ou de seletividade ( $\alpha$ ): Determina a relação de distribuição das espécies mais fortemente retidas na coluna e as menos fortemente retidas na coluna sendo obtida pela equação 05 (SKOOG et al., 2002);

$$\alpha = k_2 / k_1$$

Equação 05 – Determinação do fator de separação.

Sendo:

$k_1$  e  $k_2$  = fator de capacidade do analitos 1 e 2

- Fator de cauda ou fator de assimetria (Tf): Indica medida de assimetria do pico. A redução da assimetria de pico determina resultados menos confiáveis podendo ser calculado a 5% conforme a equação 06 ou também a 10% da altura do sinal (AGUIAR, 2008; CHROMATOGRAPHY, 2011); e

$$Tf = W_{0,05} / 2f$$

Equação 06 – Determinação do fator de cauda.

Sendo:

$W_{0,05}$  = largura do pico a 5% 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.

- Repetitividade (DPR): Indica a precisão das injeções de uma mesma amostra sendo expressa em termos de desvio padrão relativo (Relative Standard Derivation – RSD) e calculada pela equação 07 (AGUIAR, 2008; CHROMATOGRAPHY, 2011).

$$DPR(\%) = (DP / CMD) * 100$$

Equação 07 – Determinação da repetitividade.

Sendo:

DPR = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação

DP = desvio padrão das injeções

CMD = concentração média determinada

Precedendo a avaliação da resolução e da reprodutividade, a adequação do sistema cromatográfico, também chamada de System Suitability, é realizada para verificar se as características de desempenho do equipamento são compatíveis com o exigido pelo método (REIS, 2006). Além disso, a Farmacopéia Americana estabelece que esta resposta deve obedecer a um conjunto de testes que garantam que o equipamento está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (CHROMATOGRAPHY, 2011).

Para o sistema cromatográfico, os parâmetros de adequação desejáveis para iniciar o processo de validação analítica encontram-se apresentados na tabela 04.

Tabela 04 - Critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica segundo a Farmacopéia Americana

<b>Parâmetros de adequação</b>	<b>Critério de aceitabilidade</b>
Resolução (Rs)	Superior a 2
Fator de retenção (k)	Superior a 1 e inferior a 10
Fator de assimetria (Tf)	Inferior a 2
Nº. de pratos teóricos (N)	Superior a 2000
Repetitividade (DPR)	Inferior a 2% (para $n \geq 5$ )

(Adaptado de CHROMATOGRAPHY, 2011)

#### 1.4.3 – Validação analítica

Para garantir que um método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis, além da adequação do sistema cromatográfico e da otimização do método, este deve ser submetido a uma avaliação denominada validação analítica que, depois de documentada, deve oferecer evidências objetivas de que o método e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI, 2004b).

Segundo Hiene (2009), a validação analítica surgiu na década de 80 representando desde então uma grande cooperação entre diversas organizações internacionais, com objetivo da harmonização de protocolos de modo a contemplar informações, características e desempenho de métodos de análise. Entre as organizações podemos citar Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Organização Mundial de Saúde (OMS), International Standardization on Organization (ISO), International Conference on Harmonisation (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e Food and Agriculture Organization (FAO) (HIENE, 2009).

No Brasil, a validação analítica apresentou sua devida importância a partir da Resolução nº 391 de 09/08/1999 publicada pela Anvisa que regulamentava os critérios para registro de medicamentos qualificando a validação analítica como pré-requisito (LOWEN, 2003). Atualmente, a legislação em vigor no Brasil é a resolução RE nº 899 de 29/05/2003 da Anvisa que funciona como guia para procedimento de validação de métodos analíticos, existindo ainda, o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2010, elaborado pelo Inmetro e apresentado sob constantes atualizações (BRASIL, 2003; TEIXEIRA, 2008; INMETRO, 2010).

Considerando que a validação apresenta-se em constante evolução pela disponibilidade de diversas publicações que se assemelham no objetivo final proposto, algumas de suas definições são:

- Confirmação por testes e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005);
- Garantia através de estudos experimentais de que o método atende às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003); e
- Procedimento analítico no qual são estabelecidas as características de desempenho para satisfazer os requisitos necessários para sua aplicabilidade (VALIDATION, 2011).

Os métodos analíticos são identificados como normalizados e não normalizados. Os métodos não normalizados são os métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptados a partir de métodos normalizados e requerem a validação analítica (INMETRO, 2007). Os métodos normalizados apresentam-se descritos em compêndios devidamente reconhecidos ou recomendados em formulários oficiais e são considerados métodos validados (BARROS, 2002; BRASIL, 2003).

Entretanto, a adequação de métodos normalizados e sua aplicação sob condições reais de utilização devem ser verificadas e testadas para avaliar se as características de desempenho prescritas podem ser obtidas e, em algumas circunstâncias, sendo necessária a revalidação do método (BARROS, 2002).

As orientações sobre a revalidação estabelecem que alterações na síntese da substância ativa, na composição do produto acabado e no procedimento analítico,

neste caso extrapolando os limites permitidos, requerem nova validação (BRASIL, 2003; VALIDATION, 2011).

A validação pode apresentar-se como intralaboratorial e interlaboratorial. A validação intralaboratorial está relacionada com estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método para analisar a mesma amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado e a validação interlaboratorial envolve estudos em outros laboratórios estabelecendo a reprodutibilidade (BONFIM, ABRANTES & ZAMITH, 2010).

Segundo Reis (2006), a validação deve compreender quatro etapas: planejamento das análises, a realização das análises, a interpretação dos resultados e a documentação dos dados obtidos.

A etapa de planejamento é importante para que todos os materiais e equipamentos sejam calibrados e seja conhecida a estabilidade de amostras e padrões a serem avaliados (RIBANI, 2004b).

Além disso, a utilização de padrões secundários é avaliada pelo estabelecimento da identidade, qualidade, potência e pureza através de ensaios comparativos com os padrões primários conforme descrito em alguns estudos científicos (BRITO et al., 2003; SILVA, 2010; SOUZA, 2007; HIENE, 2009).

A avaliação da estabilidade é importante para geração de resultados confiáveis e reproduzíveis, estabelecendo uma relação conhecida com o tempo e a temperatura (TEIXEIRA, 2008). Pode ser determinada por análises múltiplas da amostra sob diferentes intervalos de tempo apresentando resultados da cinética de degradação da amostra (HUBER, 2010)

A realização das análises e a interpretação dos resultados obedecem aos parâmetros recomendados de acordo com o tipo de ensaio analítico envolvido e, embora os parâmetros sejam os mesmos, existem variações de indicações segundo a abordagem da Anvisa e do Inmetro (BRASIL, 2003; INMETRO 2010).

Conforme determinado pela Anvisa na Resolução nº 899 de 2003 e, também pela Farmacopéia Americana na monografia VALIDATION (2011), os ensaios são classificados nas categorias descritas na tabela 05.

Tabela 05 - Categorias dos ensaios analíticos de acordo com sua finalidade segundo a Anvisa e a Farmacopeia Americana.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do ensaio</b>
I	Ensaio quantitativo de determinação do princípio ativo
II	Ensaio quantitativo ou ensaio limite de determinação de impurezas e produtos de degradação
III	Ensaio de desempenho
IV	Ensaio de identificação

(Adaptado de BRASIL, 2003; VALIDATION, 2011)

Baseado na tabela acima, a Anvisa recomenda os parâmetros da validação analítica conforme a classificação descrita na tabela 06, onde S corresponde à indicação do parâmetro e N ausência desta indicação (BRASIL, 2003).

Tabela 06 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa.

<b>Parâmetros</b>	<b>Cat. I</b>	<b>Cat. II</b>		<b>Cat. III</b>	<b>Cat. IV</b>
	Anvisa	Anvisa <sup>1</sup>	Anvisa <sup>2</sup>	Anvisa	Anvisa
Especificidade	S	S	S	*	S
Intervalo	S	S	*	*	N
Linearidade	S	S	N	*	N
Limite de detecção	N	N	S	*	N
Lim. de quantificação	N	S	N	*	N
Exatidão	S	S	*	*	N
Repetitividade	S	S	N	S	N
Precisão Intermediária	**	**	N	**	N
Robustez	S	S	*	*	N

Anvisa<sup>1</sup> – Ensaio quantitativo

Anvisa<sup>2</sup> – Ensaio limite

S – Indicação do parâmetro

N – Ausência de indicação

\* dependente da natureza do ensaio

\*\* desconsiderado na reprodutividade

(Adaptado de BRASIL, 2003)

O Inmetro (2010), assim como a Anvisa (2003), recomenda parâmetros de validação de acordo com o tipo de ensaio analítico envolvido, classificando-os conforme descrito na tabela 07, onde S corresponde à indicação do parâmetro e N ausência desta indicação.

Tabela 07 - Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro.

<b>Parâmetros</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Seletividade	S	S	S	S
Linearidade/ Faixa linear	N	S	S	S
Limite de detecção	S	N	S	N
Limite de quantificação	N	N	S	N
Tendência / Recuperação	N	S	S	S
Precisão	N	S	S	N
Robustez	S	S	S	S

A – Ensaio qualitativo

B – Análise do componente principal

C – Análise de traços

D – Propriedades físicas

S – Indicação do parâmetro

N – Ausência de indicação

(Adaptado de INMETRO, 2010)

A necessidade da harmonização entre compêndios (Anvisa e Inmetro) é bastante evidente pela diferença de abordagens realizadas em seus guias orientativos. Os compêndios divergem principalmente na classificação de categorias dos ensaios analíticos, na recomendação dos parâmetros de validação a serem avaliados e nas suas respectivas metodologias. A tabela 08 apresenta uma comparação da identificação dos parâmetros de validação recomendados por ambos.

Tabela 08 - Comparação dos parâmetros de validação recomendados pela Anvisa e pelo Inmetro para os ensaios analíticos.

<b>ANVISA</b>	<b>INMETRO</b>
Especificidade	Seletividade
Intervalos da curva de calibração	Faixa linear de trabalho
Linearidade	Linearidade / Sensibilidade
Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação
Exatidão	Tendência / Recuperação
Precisão	Precisão
Robustez	Robustez

(Adaptado de RIBANI, 2004)

Na etapa posterior aos estudos de validação, a determinação da incerteza de medição permite produzir dados de desempenho do método importantes para a caracterização da rastreabilidade e da dispersão de valores atribuídos ao resultado contribuindo na documentação dos dados obtidos (INMETRO, 2002).

A rastreabilidade é garantida na finalização do processo através da documentação dos dados obtidos - protocolo de validação. Este deve compreender todas as etapas envolvidas descrevendo minuciosamente a avaliação dos parâmetros de desempenho e contribuindo para a elaboração de um procedimento operacional de forma que o método possa ser claramente implementado (INMETRO, 2010).

#### 1.4.4 – Parâmetros de validação analítica

Segundo a Anvisa e o Inmetro, os principais parâmetros de desempenho avaliados no processo de validação são: especificidade ou seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).



#### \* Especificidade e/ou Seletividade

Consiste na capacidade do método de determinar um componente na presença de outras espécies como outra substância ativa, excipiente, impureza, produto de degradação ou substância com propriedades semelhantes (BRASIL, 2003). Embora a seletividade e a especificidade estejam relacionadas com a detecção, podem ser diferenciadas conceitualmente: o método que produz resposta para uma única substância é denominado de específico e o método que produz resposta para várias substâncias com propriedades semelhantes mas que permite distinguir a resposta de um analito é denominado de seletivo (INMETRO, 2007).

Este parâmetro consiste no primeiro passo do desenvolvimento da validação analítica e apenas depois de avaliado, os demais parâmetros poderão ser avaliados (RIBANI, 2004b).

Na literatura existem diferentes métodos de avaliações da seletividade e/ou especificidade:

- Pela comparação da matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada da substância de interesse desde que nenhum interferente elua no mesmo tempo de retenção da substância de interesse (BRASIL, 2003);
- Pela comparação de espectros obtidos de amostras contaminadas com impurezas e amostras não contaminadas (BRASIL, 2003, INMETRO, 2010);
- Pela comparação da amostra com materiais de referência pelo método em estudo e/ou outros métodos validados utilizando, por exemplo, detectores de arranjo de diodos (INMETRO, 2010);

Conforme recomendado pela Anvisa (2003) e citado por Barbosa (2009), as comparações realizadas na matriz devem considerar amostras sob condições de estresse, como por exemplo calor, luz e umidade, na tentativa de promover a degradação do analito de interesse e a formação de interferentes.

Além das avaliações de seletividade e/ou especificidade apresentadas, o método de adição padrão também pode ser aplicado em situações de impossibilidade de obtenção da matriz isenta do analito de interesse. Esta avaliação, denominada de efeito matriz, apresenta-se relacionada com a atuação de reagentes, matriz da amostra ou outros interferentes. Neste procedimento são preparadas duas curvas analíticas que apresentam os mesmos níveis de concentração, sendo a

primeira preparada pela adição do analito na matriz e a segunda preparada na ausência da matriz (INMETRO, 2007; SOUZA, 2007; TEIXEIRA, 2008).

Na comparação das curvas são avaliadas as inclinações e interseções sendo inicialmente verificado se as curvas atendem às premissas de normalidade e a premissa de ajuste ao modelo linear. Na presença de modelos lineares é utilizado o teste F (Snedecor) para avaliar a homocedasticidade que indica o teste t (Student) a ser aplicado (variâncias combinadas ou variâncias amostrais). Na presença de modelos não lineares métodos complexos são aplicados na avaliação. A verificação de inclinações e interseções idênticas indica que o único efeito matriz presente é a interferência natural ocasionada pelo nível básico do analito (INMETRO, 2007; SOUZA, 2007). O APÊNDICE A descreve os cálculos envolvidos nesta avaliação.

#### \* Linearidade e faixa de trabalho ou intervalo da curva de calibração

A linearidade consiste na capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). Este parâmetro apresenta sua avaliação expressa graficamente através da construção de uma curva analítica que relaciona os resultados com os níveis de concentração dos analitos (BARBOSA, 2009). Segundo especificado pela Anvisa (2003) e pelo Inmetro (2010), esta curva deve ser construída para no mínimo 5 (cinco) níveis de concentração.

A faixa de trabalho ou intervalo consiste na faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado com precisão, exatidão e linearidade garantidas (BRASIL, 2003). Segundo o estudo desenvolvido por Souza (2007), a faixa de trabalho é originada dos estudos de linearidade e pode apresentar-se diferente da faixa linear para diferentes matrizes devido ao efeito de interferentes provenientes em cada matriz. O Inmetro menciona que dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear onde a resposta do sinal apresentará uma relação linear com o analito (INMETRO, 2010).

A escolha da faixa linear de trabalho varia de acordo com a aplicação do método podendo apresentar níveis de até 70 a 130% da concentração esperada segundo a Anvisa (2003) e, segundo o Inmetro (2010), deve cobrir a faixa de aplicação para qual o ensaio vai ser usado devendo apresentar, sempre que possível, a concentração esperada próxima a região central.

A Anvisa (2003) recomenda a avaliação da linearidade através da determinação do coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva analítica. Ribani (2004b) em seu estudo indica este coeficiente como parâmetro de estimativa de qualidade referindo-se que quanto mais próximo de 1 for este valor, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. São observadas diferentes orientações sobre o coeficiente de correlação e, segundo a Anvisa, deve ser superior a 0,99 e ao Inmetro, superior a 0,90 (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004a; TEIXEIRA, 2008). Entretanto, segundo Souza (2007), esta estatística não se apresenta adequada, indicando apenas um grau de ajuste dos dados à curva podendo corresponder apenas a pontos bem ajustados a um modelo não linear.

O método proposto por Souza & Junqueira (2005) e recomendado também pelo Inmetro consiste numa ferramenta estatística de avaliação da linearidade pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Esta avaliação verifica inicialmente a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, a normalidade e a autocorrelação de resíduos, indicando a regressão e o desvio de linearidade e fornecendo também o limite de detecção e o limite de quantificação (AGUIAR, 2008; INMETRO, 2010). O APÊNDICE B descreve as avaliações envolvidas.

#### \* Limite de Detecção

Consiste na menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado qualitativamente, porém não necessariamente quantificado, apenas sob as condições experimentais do método (BRASIL, 2003). Esta determinação é importante para métodos destinados à análise de traços (INMETRO, 2010).

Na literatura existem diferentes avaliações do limite de detecção:

- Pela avaliação visual através da comparação dos sinais obtidos de amostras de baixas concentrações do analito de interesse estabelecendo a concentração mínima detectada (BRASIL, 2003);
- Pela relação sinal/ruído, utilizando a estimativa da relação de 3 ou 2 vezes o ruído da linha base, também através da comparação dos sinais obtidos de

amostras de baixas concentrações do analito de interesse com as do branco (BRASIL, 2003; INMETRO 2010);

- Pelas avaliações estatísticas dos desvios padrões das respostas e da inclinação da curva analítica, sendo considerado por Hiene (2009) e Ribani (2004b) como estatisticamente mais confiável para o estabelecimento dos limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

#### \* Limite de Quantificação

Consiste na menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado quantitativamente com precisão e exatidão sob as condições experimentais do método (BRASIL, 2003).

Os mesmos critérios do limite de detecção podem ser adotados para o limite de quantificação, ou seja pode ser determinado pelo método visual, pela relação sinal/ruído admitindo a relação sinal/ruído de 10:1 ou através de avaliações estatísticas do desvio padrão resposta e da inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

#### \*Exatidão ou Tendência ou Recuperação

Consiste no grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método e o valor de referência considerado verdadeiro (BRASIL, 2003). Sua determinação é importante para a rastreabilidade dos resultados e apresenta-se dentro de um dado nível de confiança que pode ser estreito para concentrações elevadas e ou amplo para análise de traços (INMETRO, 2002; RIBANI, 2004a).

A exatidão pode ser estabelecida por diferentes métodos, dentre as quais podemos citar: a utilização de materiais de referência certificados, a comparação de métodos e os ensaios de recuperação ou adição padrão (BRASIL, 2003; RIBANI, 2008; BARBOSA, 2009; INMETRO, 2010).

Na avaliação através dos materiais de referência certificados, são comparados os resultados obtidos nas amostras com os valores certificados apresentando como desvantagem a disponibilidade e o alto custo desses materiais e a abrangência limitada de matrizes e analitos. A avaliação mediante comparação entre o método proposto e outro método validado permite estabelecer o nível de

confiança aceitável, mas apresenta como inconveniente a possibilidade da inexistência de um método de referência (BRITO et al., 2003).

O ensaio de recuperação consiste, segundo Brito e colaboradores (2003), no método mais utilizado para validação de processos analíticos e está relacionado com a determinação da quantidade de analito recuperado em relação à quantidade real presente na amostra. Segundo o Inmetro (2010), 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. Apresenta como limitação a apresentação dos analitos numa forma mais facilmente detectável não sendo necessariamente da mesma forma que na amostra.

Alguns trabalhos científicos e a Anvisa recomendam o quantitativo mínimo de 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear com 3 (três) concentrações – baixa, média e alta sob injeções em triplicata. A exatidão é expressa em termos percentuais pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, sendo determinada após o estabelecimento da linearidade (BRASIL, 2003; LOWEN, 2003; REIS, 2006; BARBOSA, 2009). Os critérios estabelecidos pela Association of Official Analytical Chemists (2002), baseados no estudo desenvolvido por Horwitz (1995), indicam o intervalo de recuperação aceitável relacionando com os níveis de concentração dos analitos conforme descrito na tabela 09 (BRITO et al., 2003).

Tabela 09 – Intervalo de recuperação do analito em função de sua concentração na amostra.

<b>Concentração do analito (%)</b>	<b>Intervalo de recuperação (%)</b>
≥ 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

(Adaptado de HORTMITZ, 1982; BRITO et al., 2003)

#### \* Precisão

Consiste na avaliação da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições específicas do método e apresenta-se expressa em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A repetitividade consiste na medida da dispersão dos resultados obtidos dentro de um curto período de tempo pelo mesmo analista e nas mesmas condições analíticas (INMETRO 2010). O termo utilizado em inglês para esta avaliação corresponde a “repeatability”. No Brasil, entretanto, observamos divergências na denominação, o Inmetro adota o termo repetitividade e a Anvisa o termo repetibilidade (RIBANI, 2004a; RIBEIRO, 2008). Neste estudo adotaremos a denominação de repetitividade.

A avaliação pode seguir as recomendações do Inmetro (2010) sendo realizada através de sete ou mais repetições ou pela ICH (2005) e Anvisa (2003) que sugerem a determinação pelo número mínimo de nove determinações com no mínimo três concentrações, em triplicata, cobrindo a faixa especificada ou o mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

A precisão intermediária consiste no grau de concordância entre os resultados de um mesmo laboratório em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Segundo alguns autores, esta etapa verifica se o mesmo laboratório oferece estatisticamente os mesmos resultados quando realizado sob as mesmas condições analíticas (RIBANI, 2008; BARBOSA, 2009). A sua determinação pode variar de acordo com os métodos adotados, no entanto, a Anvisa considera o mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes e o Inmetro considera a norma ISO 5725-3 que estabelece o mínimo de 15 determinações (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial consiste no grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. O Inmetro (2010) recomenda sete ou mais repetições e a Anvisa não especifica o número de experimentos e réplicas envolvidos. Esta etapa consiste numa ferramenta importante para controle do desempenho de um laboratório e caracteriza o processo de validação completo, necessário para padronização de procedimentos analíticos (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

A precisão de um método analítico pode ser expresso em termos de desvio padrão absoluto através do intervalo de confiança da média ou pela estimativa do desvio padrão ou o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) (RIBANI, 2004b).

O critério de aceitabilidade da precisão recomendado pela Anvisa (2003) considera o método empregado, a concentração do analito, o tipo de matriz e a finalidade do método admitindo valor inferior a 5% para o desvio padrão relativo. O Inmetro recomenda a avaliação através dos valores de HORRAT pela equação de *HORWITZ* já estabelecida no seu guia e relacionada diretamente com a razão de concentração do analito (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

No estudo desenvolvido por Wood (1999) e mencionado por Ribani (2004b) menciona que Horwitz e outros autores estabeleceram uma relação matemática para expressar a dependência dos valores de desvio padrão relativa com a concentração dos analitos e os valores obtidos originaram a Trombeta de Horwitz. Esta curva apresenta-se independente da natureza do analito ou da técnica de análise utilizada e apresenta seus valores descritos na tabela 10.

Tabela 10 - Coeficientes de variação em função da razão de concentração do analito na amostra.

<b>Razão de concentração do analito</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
1	2
$10^{-1}$	2,8
$10^{-2}$	4
$10^{-3}$	5,6
$10^{-4}$	8
$10^{-5}$	11
$10^{-6}$	16
$10^{-7}$	23
$10^{-8}$	32
$10^{-9}$	45

(Adaptado de INMETRO, 2010)

#### \* Robustez

Consiste na avaliação da sensibilidade do método em resistir a variações nos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Conforme recomendado pela Anvisa, as alterações relacionam-se com o tipo de técnica empregada e nas determinações por cromatografia em fase líquida são recomendadas as alterações na variação do pH da fase móvel, da composição da fase móvel, do fluxo de fase móvel, da temperatura e diferentes lotes ou fabricantes de colunas para que sejam estabelecidos os controles e precauções no desempenho do método (BRASIL, 2003).

O Inmetro (2010) recomenda a determinação através do teste de Youden que permite avaliar a robustez através da realização de oito ensaios independentes para determinar o efeito de sete variações ou combinação de efeitos admitindo dois níveis em ordem aleatória. A matriz da combinação dos fatores para determinação de robustez utiliza letra maiúscula para os fatores nominais do método e a letra minúscula para a variação a ser avaliada. Os efeitos resultantes das combinações ensaiadas são avaliados isoladamente para posteriormente serem obtidas as médias correspondentes aos grupos (letras maiúsculas e letras minúsculas) de cada fator.

As alterações, segundo Ribani (2008) devem refletir as possibilidades reais de situações de transferência do método para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Entretanto, existem limitações quanto os parâmetros adotados para que as alterações não caracterizem a necessidade de novo processo de validação. Isto porque, conforme recomendado pela Farmacopéia Americana (USP 34), múltiplos ajustes podem afetar o desempenho do sistema configurando novas implementações, os limites de variação permitidos aos parâmetros apresentam-se descritos na tabela 11.



Tabela 11 – Limitações de variações permitidas nos métodos analíticos segundo a Farmacopéia Americana.

<b>Fatores</b>	<b>Variação</b>
Variação do pH da fase móvel	± 0,2 unidades
Variação da composição da fase móvel (orgânica)	± 10%
Fluxo da fase móvel	± 50%
Comprimento da coluna cromatográfica	±70%
Tamanho da partícula interna da coluna	Reduzido em até 50%
Temperatura (°C)	± 10°
Volume de injeção( µL)	Reduzido admitindo o LD

(Adaptado de CHROMATOGRAPHY, 2011)

As avaliações resultantes devem indicar um controle mais rigoroso dos fatores de maior influência e a indicação de diferença não significativa sugere que a média e o desvio padrão dos fatores correspondem a estimativa realista da precisão do método (INMETRO, 2003).

#### 1.5. – A IMPORTÂNCIA DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE GLICOSE E FRUTOSE MONOIDRATADAS E MANITOL NO CONTEXTO SANITÁRIO

Para avaliar padrões de qualidade e segurança sanitária em produtos, deve ser considerado o cumprimento de quesitos de conformidade, eficácia, efetividade e desempenho no momento da fabricação e da utilização. A legislação brasileira especifica que os produtos para a saúde, quando utilizados nas condições e finalidades previstas não devem comprometer a saúde dos pacientes e dos operadores do produto (ANVISA, 2010c).

O regulamento técnico para BPF de bolsas de sangue estabelece que a comprovação da eficácia e da segurança de bolsas de sangue seja realizada pelo

INCQS (ANVISA, 2010c). Nesta atuação, como laboratório de referência nacional, realiza análises para fins de controle sanitário em bolsas de sangue o que indica a necessidade da comprovação de sua competência técnica na produção de resultados confiáveis e rastreáveis no controle da qualidade das bolsas de sangue.

Nesta avaliação, a determinação do teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol em soluções anticoagulantes e preservadoras apresenta grande importância devido a atuação desses analitos na manutenção da qualidade do sangue coletado. Pela comprovação da elevada criticidade do ensaio segundo os percentuais de reprovações encontrados no estudo desenvolvido por Vale (2010) sobre os produtos analisados no período entre 1999 e 2008. E, em decorrência da revisão bibliográfica apresentar uma variedade de métodos pouco reprodutíveis e com problemas específicos na determinação simultânea dos analitos.

Sendo assim, o estudo dos parâmetros que exercem influência no desempenho e a validação analítica da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, segundo os critérios dos principais órgãos reguladores, possui grande relevância no controle sanitário por assegurar a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados e contribuir para a redução dos riscos envolvidos e para o oferecimento de produto de qualidade comprovada à população.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar o método de determinação do teor de glicose e frutose monoidratadas e manitol em soluções anticoagulantes e preservadoras de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detecção por índice de refração recomendado na Portaria nº 950 de 26 de novembro de 1998.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as amostras utilizadas na etapa de validação analítica;
- Avaliar o comportamento dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico no desempenho do método;
- Qualificar os padrões analíticos secundários para a validação analítica;
- Estudar a estabilidade das soluções dos analitos;
- Validar o método de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Inmetro e pela Anvisa;

### 3 - METODOLOGIA

A metodologia para realização deste estudo foi dividida em três etapas. Na primeira etapa foram selecionadas as amostras de trabalho, na segunda etapa foi realizado o planejamento da validação analítica compreendendo a otimização do método e na terceira etapa efetuada a validação analítica.

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados equipamentos qualificados e para o preparo de soluções-padrão e soluções-amostra materiais calibrados.

#### \* Materiais e equipamentos

Foram utilizados balões volumétricos classe A de 25, 50 e 100 mL, pipetas volumétricas classe A de 5, 10 e 15 mL e as pipetas automáticas do fabricante Eppendorf de capacidade de 100 a 1000  $\mu$ L, 500 a 5000  $\mu$ L e 1000 a 10000  $\mu$ L calibrados conforme especificado no APÊNDICE C.

Foram utilizados dois equipamentos de cromatografia líquida de alta eficiência: o equipamento do fabricante Shimadzu Corporation com software LC-20 Solution e o equipamento do fabricante Waters 2695 com software Enpower 2, ambos, apresentando forno, bomba injetora, injetor automático, degaseificador, interface e os detectores de índice de refração modelos Shimadzu CTO-10A e Waters IR 2414, respectivamente. As colunas cromatográficas do fabricante Shodex SC1011 foram utilizadas sendo, na etapa de planejamento da validação utilizada a coluna de lote 708082 e na etapa de validação analítica a coluna de lote 011009.

No preparo das soluções-padrão e soluções-amostra foi utilizada a estufa do fabricante Precision Scientific Group, a balança analítica calibrada do fabricante Mettler Toledo, o deionizador de água do fabricante Millipore, a bomba de aspiração do fabricante Cole Parmer Instrument Co. a bomba de vácuo do fabricante Dayton Electric MFG. Co. e o ultrassom do fabricante Branson.

Na avaliação da robustez foi utilizado o solvente orgânico acetonitrila codificada como 1.00029.1000, do fabricante Merck, de lote I464929, data de fabricação de 10/12/2008 e data de validade 31/12/2011.

\* Padrões Analíticos

Foram utilizados os padrões analíticos Sigma Aldrich de glicose (99,5%), frutose (99%) e manitol (98 %) de lote, data de fabricação e validade identificados na tabela 12 e os padrões USP de glicose, frutose e manitol identificados na tabela 13.

Tabela 12 - Identificação dos padrões analíticos Sigma Aldrich de glicose, frutose e manitol.

<b>Padrões</b>	<b>Lote</b>	<b>Data de fabricação</b>	<b>Data de validade</b>
Glicose (99,5%)	108k00301	16/03/2009	03/09/2014
Frutose (99,5%)	079k0352	12/10/2009	24/11/2014
Manitol (98%)	069k0057	27/07/2009	24/11/2014

Tabela 13 - Identificação dos padrões USP de glicose, frutose e manitol.

<b>Padrões</b>	<b>Lote</b>
Glicose (0,999 mg/mg)	J2E294
Frutose (0,999 mg/mg)	I3E340
Manitol (0,996 mg/mg)	I1G090

No preparo das soluções-padrão da curva analítica, os padrões foram secos conforme recomendado pela Farmacopéia Americana, a glicose a 105°C por 16 horas, a frutose a 70°C por 4 horas e o manitol a 105°C por 4 horas (DEXTROSE, 2011; FRUCTOSE, 2011, MANNITOL, 2011).

\* Amostras

No parâmetro de seletividade foram simuladas soluções anticoagulantes e preservadoras contendo os analitos na concentração comercial estabelecida pela

legislação e as mesmas soluções na ausência dos analitos. Para avaliação do efeito matriz foram selecionadas amostras comerciais de soluções de SAG-M1, CPDA, ACD-A e CPD e na avaliação da precisão, exatidão e robustez foi utilizada a amostra comercial de solução de SAG-M1 conforme descrito a seguir.

### 3.1 – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

A seleção das amostras comerciais de trabalho foi realizada utilizando os dados das amostras analisadas no INCQS no programa Instrumentos de Saúde/ Artigos de Saúde, disponíveis no SGA 2000 e SGAWEB 2011, no período de janeiro de 2006 a agosto de 2011 e a consulta ao banco de dados da Anvisa relacionando todos os detentores de registro de bolsas de sangue.

Na etapa inicial, obteve-se um grupo de amostras de bolsas de sangue para relacionar a incidência das soluções anticoagulantes e preservadoras. Paralelamente, em consulta ao banco de dados da Anvisa foram determinados os detentores de registro de bolsas de sangue que apresentaram maiores números de produtos registrados contendo as soluções selecionadas.

Baseado nos resultados obtidos, a seleção das amostras de estudo, considerou referência a um dos detentores de registro, a quantidade disponibilizada dos produtos analisados com resultados satisfatórios, o prazo de validade e a composição das soluções para avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, efeito matriz e robustez.

### 3.2 – PLANEJAMENTO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Na etapa de planejamento, foi verificada a adequação do sistema cromatográfico, a avaliação preliminar da resposta linear, a otimização dos parâmetros analíticos, a qualificação do padrão secundário, a verificação da resposta da nova coluna cromatográfica e o estudo da estabilidade das soluções dos analitos.

### 3.2.1 – Adequação do sistema cromatográfico

A adequação do sistema cromatográfico foi avaliada preparando-se uma solução-padrão de glicose, frutose e manitol nos níveis de concentração aproximados de 2,7 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,75 mg/mL respectivamente.

A solução-padrão foi preparada em balão volumétrico de 100,00 mL pela pesada direta da massa de glicose e manitol anidros (270 mg de glicose e 75 mg de manitol) e transferência da alíquota de solução mãe de frutose (4,50 mL) preparada pela diluição de 400 mg de frutose anidra também diluída com fase móvel para 100 mL.

A solução-padrão de glicose, frutose e manitol foi injetada seis vezes nas condições cromatográficas descritas na tabela 14. Cabe ressaltar que, nesta etapa, utilizou-se a coluna cromatográfica do fabricante Shodex SC1011 do lote 708082.

Tabela 14 - Condições cromatográficas para verificação da adequação do sistema utilizando o cromatógrafo Shimadzu.

<b>Parâmetro cromatográfico</b>	<b>Especificação</b>
Coluna cromatográfica	Coluna de troca iônica SC1011 (300 x 6,5mm)
	Fabricante: Shodex
Forno	Temperatura: 80°C
Detector de Índice de refração	Temperatura da célula do detector: 55 °C
Fase móvel	Água tipo I - Fluxo de 0,5 mL/min
Amostra	Volume de injeção: 20 µL

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados segundo a eficiência de separação pela avaliação visual e pelos valores médios obtidos para os parâmetros de adequação de resolução, fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de assimetria.

### 3.2.2 – Verificação preliminar da resposta linear

A resposta linear foi avaliada pela determinação do coeficiente de determinação dos resultados obtidos para cada analito isoladamente através de uma curva analítica de glicose, frutose e manitol contendo onze níveis de concentração visando a verificação de possíveis desvios.

As soluções-padrão de glicose, frutose e manitol foram preparadas, assim como na adequação do sistema cromatográfico, pela pesada direta da massa dos analitos glicose e manitol anidros transferidos e transferência de alíquotas da solução mãe de frutose (400 mg diluída para 100,00 mL). A tabela 15 relaciona as massas pesadas de glicose e manitol e as alíquotas da solução mãe de frutose adicionadas.

Tabela 15 - Massas aproximadas de glicose e manitol e alíquotas da solução mãe de frutose utilizadas na verificação da faixa linear.

<b>Padrões</b>	<b>Massa de glicose (mg)</b>	<b>Alíquota de SM de frutose (mL)</b>	<b>Massa de manitol (mg)</b>
A	60	0,50	40
B	90	1,00	45
C	120	1,50	50
D	150	2,00	55
E	180	2,50	60
F	210	3,25	65
G	240	4,00	70
H	270	4,50	75
I	300	5,00	80
J	330	10,00	85
L	360	15,00	90

As soluções-padrão de glicose, frutose e manitol foram injetadas em triplicata nas condições cromatográficas descritas na tabela 14.



### 3.2.3 – Otimização dos parâmetros analíticos

#### 3.2.3.1. – Avaliação do fluxo da fase móvel

O fluxo da fase móvel foi avaliado através de dez injeções dos padrões baixo (A), médio (F) e alto (L) das curvas analíticas de glicose, frutose e manitol preparadas na etapa de verificação preliminar da resposta linear sob as condições cromatográficas relacionadas na tabela 14 variando o fluxo em 0,4, 0,5 e 0,6 mL/minuto conforme descrito na tabela 16.

Tabela 16 - Níveis de concentração utilizados na avaliação do fluxo da fase móvel.

Padrões	Concentração (mg/mL)			Fluxo (mL)
	glicose	frutose	manitol	
A	0,60	0,02	0,40	
F	2,10	0,13	0,65	0,4, 0,5 e 0,6
L	3,60	0,60	0,90	

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados segundo os valores médios obtidos para os parâmetros de adequação de resolução, fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de assimetria.

#### 3.2.3.2. – Avaliação da temperatura do forno

A temperatura do forno foi avaliada através de dez injeções dos padrões baixo (A), médio (F) e alto (L) das curvas analíticas de glicose, frutose e manitol preparadas na etapa de verificação preliminar da resposta linear sob as condições cromatográficas descritas na tabela 14 considerando o fluxo determinado na avaliação do fluxo de fase móvel e variando a temperatura em 60, 70 e 80 °C conforme descrito na tabela 17.

Tabela 17 - Níveis de concentração utilizados na avaliação da temperatura do forno.

Padrões	Concentração (mg/mL)			Temperatura do forno (°C)
	glicose	frutose	manitol	
A	0,60	0,02	0,40	60, 70 e 80
F	2,10	0,13	0,65	
L	3,60	0,60	0,90	

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados segundo os valores médios obtidos para os parâmetros de adequação de resolução, fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de assimetria.

#### 3.2.4 – Qualificação do padrão secundário

Na qualificação do padrão secundário, os padrões secundários de glicose, frutose e manitol foram avaliados quanto às características físicas em comparação com os padrões de referência USP.

Além disso, foi preparada uma curva analítica utilizando padrões USP anidros em sete níveis de concentração de glicose, frutose e manitol para o doseamento de amostras preparadas com o padrão secundário (padrão analítico SIGMA-ALDRICH), também anidro, de glicose e frutose na concentração estabelecida para a solução CPDA e de manitol para a solução SAG-M1.

As soluções-padrão foram preparadas em balão volumétrico de 25,00 mL, pela pesada direta da massa de glicose anidra e transferência de alíquotas de solução mãe de frutose e de manitol e as soluções-amostra em balão volumétrico de 50,00 mL, pela pesada direta das massas de padrão analítico diluídas com fase móvel.

As curvas analíticas adotadas apresentaram os níveis de concentração de glicose, frutose e manitol descritos na tabela 18 e possibilitaram o doseamento de três amostras com concentração teórica correspondente a décima parte da concentração preconizada pela legislação vigente para estas soluções (32,0 mg/mL

de glicose e frutose monoidratadas na solução CPDA e 5,2 mg/mL de manitol na solução SAG-M1) injetadas em triplicata nas condições analíticas da tabela 14.

Tabela 18 - Níveis de concentração aproximados de glicose, frutose e manitol da curva analítica para adequação do padrão secundário.

Padrão	Concentração (mg/mL)		
	glicose	frutose	manitol
A	2,00	0,10	0,40
B	2,20	0,15	0,45
C	2,40	0,20	0,50
D	2,60	0,25	0,55
E	2,80	0,30	0,60
F	3,00	0,35	0,65
G	3,20	0,40	0,70

Para a obtenção da concentração das amostras foram plotadas as médias das áreas obtidas para cada amostra contendo glicose, frutose e manitol e, por interpolação com a curva analítica, foram obtidas as concentrações dos analitos nas amostras sendo considerada a diluição realizada.

O teor dos padrões ALDRICH-SIGMA correspondeu à média das concentrações obtidas isoladamente para cada analito nas amostras determinada pela equação 08.

$$\text{Teor (\%)} = ((C_{\text{exp } j} / C_{\text{teo } j}) * 100$$

Equação 08 – Determinação de teor do padrão secundário.

Sendo:

$C_{\text{exp } j}$  – Concentração experimental obtida para o analito  $j$

$C_{\text{teo } j}$  – Concentração teórica do analito  $j$

### 3.2.5. – Verificação da resposta de separação da coluna cromatográfica

A verificação da resposta de separação da nova coluna cromatográfica (lote 011009), utilizada na validação analítica, foi realizada através da avaliação dos sinais cromatográficos obtidos na curva analítica preparada no item 3.2.4.

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados segundo a média dos valores obtidos para os parâmetros de adequação de resolução, fator de retenção, número de pratos teóricos e fator de assimetria.

### 3.2.6 – Estudo da estabilidade das soluções dos analitos

Para avaliar a estabilidade das soluções dos analitos foi preparada a solução-padrão de concentração aproximada de 2,7 mg/mL de glicose, 0,156 mg/mL de frutose e 1,35 mg/mL de manitol e solução-amostra da amostra comercial SAG-M1 na diluição de 15,00 mL de amostra para 50,00 mL com fase móvel.

O método foi ensaiado na solução-padrão e na solução-amostra sob as condições cromatográficas descritas na tabela 14 em injeções múltiplas pelo período de 14 dias ou 336 horas, totalizando 72 injeções do mesmo padrão e da mesma amostra.

A estabilidade das soluções foi verificada através da comparação das áreas obtidas nas injeções e pela verificação da presença de possíveis impurezas nos sinais cromatográficos obtidos.

## 3.3 – VALIDAÇÃO ANALÍTICA

### 3.3.1 – Avaliação da seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada em duas etapas.

i) Comparação de matriz isenta de analito e matriz adicionada de analito

Na primeira etapa pela comparação das matrizes foram preparados dois grupos de soluções. No grupo A, como amostras, foram simuladas soluções anticoagulantes e preservadoras contendo os analitos, ou seja, glicose, frutose e manitol, na concentração comercial estabelecida pela legislação para CPD, CPDA, ACD-A, ACD-B, SAG-M1 e SAG-M2 e no grupo B, as mesmas soluções na ausência dos analitos. Parte dessas soluções foi submetida à degradação forçada pelo processo de autoclavação obtendo-se quatro subgrupos de soluções-amostras conforme identificado na tabela 19.

Tabela 19 - Amostras simuladas para avaliação da seletividade na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Identificação</b>	<b>Amostra</b>	<b>Ausência de Autoclavação</b>	<b>Presença de autoclavação</b>
Grupo A	Presença de analitos	SOLUÇÃO 1	SOLUÇÃO 3
Grupo B	Ausência de analitos	SOLUÇÃO 2	SOLUÇÃO 4

Os subgrupos de soluções-amostra 1, 2, 3 e 4 de cada solução anticoagulante e preservadora foram injetadas sob as condições cromatográficas descritas na tabela 14 para avaliar a pureza dos sinais cromatográficos obtidos e as avaliações foram realizadas:

- Matriz simulada com analito autoclavada e a matriz comercial;
- Matriz simulada com analito não autoclavada e a matriz simulada isenta do analito não autoclavada;
- Matriz simulada isenta do analito não autoclavada e a matriz simulada isenta do analito autoclavada; e
- Matriz simulada com analito não autoclavada e a matriz simulada com analito autoclavada.

Em associação a este procedimento, para comprovar a pureza dos sinais obtidos, foi ensaiada uma solução-padrão de 5-hidroximetilfurfural no nível de

concentração aproximado de 3 mg/mL (massa de 75,0 mg de 5-hidroximetilfurfural diluída para 25,00 mL com fase móvel) paralelamente com a solução-padrão preparada na etapa do estudo de estabilidade dos analitos, nas condições cromatográficas descritas na tabela 14, para comparação dos resultados obtidos.

## ii) Avaliação do efeito-matriz

Para avaliar o efeito matriz foram ensaiadas, nas condições cromatográficas descritas na tabela 14, as curvas analíticas (*curva-solvente*) e as curvas analíticas preparadas pela adição padrão da amostra comercial (*curva-matriz*) da solução preservadora SAG-M1, com sete níveis de concentração e injetadas em triplicata. Cada analito presente na solução preservadora foi avaliado isoladamente.

- Preparo da curva-solvente

No preparo da curva analítica foram transferidas alíquotas da solução mãe de cada analito preparada pela pesada direta das massas dos padrões anidros de aproximadamente 2000 mg de glicose, 250 mg de frutose e 1000 mg de manitol seguida de diluição com fase móvel para 50,00 mL. As alíquotas de solução mãe utilizadas foram diluídas com fase móvel para 50,00 mL e corresponderam aos níveis de concentração estabelecidos na tabela 20.

Tabela 20 - Níveis de concentração de glicose, frutose e manitol da curva analítica.

Padrão	Concentração (mg/mL)		
	glicose	frutose	manitol
A	2,1	0,010	0,90
B	2,3	0,083	1,05
C	2,5	0,156	1,20
D	2,7	0,229	1,35
E	2,9	0,302	1,50
F	3,1	0,374	1,65
G	3,3	0,448	1,80

- Preparo da curva matriz

No preparo da curva analítica pela adição padrão foi adicionado o volume de amostra comercial da solução preservadora correspondente à concentração do analito no primeiro nível da curva analítica, sendo, este mesmo volume, adicionado aos demais padrões para ajuste da concentração final com a quantidade de padrão preparado (solução mãe) admitindo o volume final de 25,00 mL.

O preparo desta solução mãe dos analitos correspondeu a diluição das massas de padrão anidro de 200 mg de glicose, 63 mg de frutose e 125 mg de manitol, separadamente, para 25,00 mL em balão volumétrico.

O volume da amostra comercial da solução preservadora (SAG-M1) foi calculado baseado no teor encontrado na avaliação de dez replicatas sob injeção dupla quantificada por curva analítica preparada conforme descrito na curva-solvente. A tabela 21 relaciona os volumes da amostra comercial da solução preservadora SAG-M1 e os volumes de solução mãe dos analitos utilizados no preparo das curvas.

Tabela 21 - Curva analítica da avaliação do efeito matriz na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Padrão analítico</b>	<b>glicose</b>		<b>Frutose</b>		<b>manitol</b>	
	$V_{AM}$	$V_{SM}$	$V_{AM}$	$V_{SM}$	$V_{AM}$	$V_{SM}$
A		-----		-----		-----
B		0,625		0,730		0,750
C		1,250		1,460		1,500
D	6,430	1,875	5,150	2,190	4,350	2,250
E		2,500		2,920		3,000
F		3,125		3,650		3,750
G		3,750		4,380		4,500

$V_{AM}$  – Volume (mL) de amostra SAG-M

$V_{SM}$  – Volume (mL) de solução mãe

O mesmo procedimento foi realizado para avaliação do efeito matriz dos analitos nas soluções anticoagulantes CPDA, CPD e ACD-A corrigindo o preparo da *curva-matriz* pela alteração dos volumes de amostra de solução adicionada de acordo com os teores encontrados também pela avaliação de dez replicatas sob injeção dupla das soluções quantificada por curva analítica preparada conforme descrito na curva-solvente.

Os sinais cromatográficos para as duas curvas (*curva-solvente* e *curva-matriz*) inicialmente foram avaliados segundo os critérios da planilha de linearidade de Souza e Junqueira (2005) - Planilha de Avaliação da Linearidade de Curva Analítica para aceitabilidade dos parâmetros com as avaliações estatísticas envolvidas descritas no APÊNDICE B.

Na etapa seguinte foi utilizada a planilha desenvolvida no Setor de Alimentos e Contaminantes do INCQS/FIOCRUZ compreendendo as aplicações do testes F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e do teste t (Student) para avaliação das inclinações e interseções das duas curvas conforme recomendado pelo Inmetro (2007) e as avaliações estatísticas envolvidas descritas no APÊNDICE A.

Na avaliação da existência de homogeneidade entre as variâncias da amostra ensaiada através do teste F foi considerada a homogeneidade das variâncias indicada pelos valores de F menores que o valor crítico. Na presença de homogeneidade, as inclinações e interseções das duas curvas foram comparadas através do teste t com variâncias combinadas e na ausência de homogeneidade, através do teste t com variâncias amostrais, sendo o efeito matriz rejeitado para valores de t inferiores ao valor crítico nas duas situações.

### 3.3.2 – Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção

Nesta avaliação foram preparadas três curvas analíticas na faixa de trabalho estabelecida com sete níveis de concentração e injeção em triplicata de cada nível sob as condições cromatográficas descritas na tabela 14 obedecendo ao preparo dos níveis de concentração mencionados no preparo da curva-solvente (item 3.3.1.).

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados plotando-se as médias dos sinais obtidos para cada nível da curva analítica na planilha desenvolvida por Souza



& Junqueira (2005) - Planilha de Avaliação da Linearidade de Curva Analítica e os parâmetros envolvidos nesta avaliação foram:

- Homocedasticidade (Teste de Levene);
- 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
- Limite de detecção e o limite de quantificação

### 3.3.3 – Avaliação da precisão

Para avaliar a precisão do método, o parâmetro da repetitividade foi avaliado por vinte determinações da concentração teórica do analito na amostra comercial da solução contendo os três analitos (solução preservadora SAG-M1) e o parâmetro de precisão intermediária foi avaliado alternando analistas, equipamentos e dias de análise.

#### i) Avaliação da repetitividade

Para avaliar a repetitividade foram preparadas as curvas analíticas dos analitos conforme descrito no preparo da curva-solvente (item 3.3.1.) e vinte repetições da amostra comercial da solução preservadora SAG-M1 preparadas pelo mesmo analista e injetadas num mesmo equipamento, no mesmo dia e em duas sequências distintas (primeira seqüência não aleatória e segunda seqüência aleatória) de acordo com a tabela 22. As vinte repetições da amostra comercial da solução preservadora SAG-M1 foram preparadas na diluição de 15,00 mL para o volume final de 50,00 mL e ensaiadas nas condições cromatográficas descritas na tabela 14.

Tabela 22 – Grupos de replicatas da avaliação da repetitividade na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Grupos de replicatas</b>	<b>Sequência das replicatas</b>				
Injeção 1 (não aleatória)	Am 1 >	Am 2 >	Am 3 >	Am 4 >	Am 5 >
	Am 6 >	Am 7 >	Am 8 >	Am 9 >	Am 10 >
	Am 11 >	Am 12 >	Am 13 >	Am 14 >	Am 15 >
	Am 16 >	Am 17 >	Am 18 >	Am 19 >	Am 20
Injeção 2 (aleatória)	Am 5 >	Am 19 >	Am 7 >	Am 11 >	Am 4 >
	Am 20 >	Am 6 >	Am 12 >	Am 8 >	Am 15 >
	Am 9 >	Am 17 >	Am 1 >	Am 14 >	Am 10 >
	Am 16 >	Am 2 >	Am 18 >	Am 3 >	Am 13

(Adaptado de INCQS, 2010)

Assim como no cálculo da qualificação do padrão secundário, para a obtenção da concentração dos analitos, foram plotadas as médias das áreas obtidas para cada grupo de replicata contendo glicose, frutose e manitol e, por interpolação com a curva analítica, foram obtidas as concentrações dos analitos sendo considerada a diluição realizada.

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados pela determinação do desvio padrão e do desvio padrão relativo da repetitividade (DPRr), também chamado de coeficiente de variação, dos teores de cada analito determinado pela equação 09.

$$\text{DPRr (\%)} = ((s/ \text{Md}) * 100)$$

Equação 09 – Determinação do desvio padrão relativo da repetitividade.

Sendo:

DPRr (ou CV) - desvio padrão relativo de repetitividade (ou coeficiente de variação)

s - desvio-padrão

Md - média das concentrações das repetições

## ii) Avaliação da precisão intermediária

Para avaliar a precisão intermediária foram ensaiadas nas condições cromatográficas descritas na tabela 14, a curva analítica dos analitos e vinte repetições da amostra comercial da solução preservadora SAG-M1 conforme descrito na avaliação da repetitividade preparada por dois analistas, em dois dias diferentes e injetadas em dois equipamentos (Shimadzu e Waters).

Os sinais cromatográficos obtidos também foram avaliados pela determinação das concentrações dos analitos isolados, do desvio padrão e do desvio padrão relativo percentual de reprodutibilidade ( $DPR_R$ ) dos teores de cada analito através das equações 10 e 11

$$S_i(j,k) = \sqrt{1/t(n-1) \cdot \sum_{J=1}^t \cdot \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - Y_j)^2}$$

Equação 10 – Determinação do desvio padrão de reprodutibilidade interna.

$$DPR(\%) = ((S_i / Y_j) * 100)$$

Equação 11 – Determinação do desvio padrão de reprodutibilidade.

Sendo:

$S_i$  = desvio-padrão de reprodutibilidade interna

$t$  = 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  $j$

$Y_j$  = media aritmética dos resultados da amostra  $j$

### 3.3.4 – Avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão do método foi adotado o mecanismo de determinação da recuperação. Neste estudo o método foi ensaiado nas condições cromatográficas descritas na tabela 14 com injeção em triplicata dos níveis da curva analítica com sete níveis de concentração preparada pela adição padrão da amostra comercial da solução preservadora SAG-M1 pelo preparo da curva-matriz descrito no item 3.3.1.

Foram avaliados os sinais cromatográficos de cada analito independentemente quanto à recuperação em cada nível de concentração pela equação 12.

$$\text{Recuperação (\%)} = ((C_1 - C_2) / C_3) * 100$$

Equação 12 – Determinação da recuperação

Sendo:

C<sub>1</sub> – Concentração do analito na amostra fortificada

C<sub>2</sub> – Concentração do analito na amostra não fortificada

C<sub>3</sub> – Concentração teórica do analito fortificado

### 3.3.5 – Avaliação da robustez

Para avaliar a robustez do método foi preparado o nível intermediário da curva analítica dos analitos conforme descrito no item 3.3.1. apresentando concentração aproximada de 2,7 mg/mL de glicose, 0,229 mg/mL de frutose e 1,35 mg/mL de manitol, sendo injetado seis vezes para determinação da média e desvio padrão relativo da área, do tempo de retenção e dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico na avaliação do efeito de cinco variações pela adaptação do teste de Youden para as combinações estabelecidas.

Foram admitidas duas variações de nível, separadamente para os parâmetros de temperatura da célula do detector, temperatura do forno, volume de injeção, composição da fase móvel e fluxo de fase móvel.

Nesta avaliação, as condições cromatográficas foram denominadas pelos fatores nominais, sendo as condições descritas na tabela 14 por letras maiúsculas, de **A** a **E** e a variação, por letra minúsculas conforme descrito na tabela 23.

Tabela 23 - Parâmetros de avaliação da robustez na validação do método de determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição normal</b>	<b>F</b>	<b>Nível I</b>	<b>Nível II</b>	<b>F</b>
Temperatura da célula do detector	55°C	A	53°C	57°C	a
Temperatura do forno	80°C	B	76°C	78°C	b
Volume de injeção	20 uL	C	18 uL	22 uL	c
Composição da fase móvel	sem orgânico	D	com 0,25% de orgânico	com 0,50% de orgânico	d
Fluxo da fase móvel	0,50 mL/min	E	0,45 mL/min	0,55 mL/min	e

F – Fator

A tabela 24 descreve as combinações de variações utilizadas para determinar os efeitos da variação dos cinco fatores no procedimento analítico sendo avaliados os efeitos de cada variação separadamente.

Tabela 24 - Combinações de variações segundo a adaptação do teste de Youden para avaliação da robutez.

Fator	Combinação de variações							
	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
<i>Efeito</i>	<i>s</i>	<i>t</i>	<i>u</i>	<i>v</i>	<i>w</i>	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>

s,u,w,y,t,v,x,z = efeitos das combinações

(Adaptado de INCQS, 2009)

A avaliação foi realizada isoladamente para cada fator pela verificação de sua influência baseando-se nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, expresso em termos de percentuais, de acordo com o cálculo do efeito realizado pela sequencia de equações 13,14 e 15 exposto em tabelas e gráficos.

$$M_{\text{normal}} = \sum_{\text{efeito normal}} / 4$$

Equação 13 – Determinação do efeito normal.

$$M_{\text{variação}} = \sum_{\text{efeito variação}} / 4$$

Equação 14 – Determinação do efeito da variação.

$$\text{Efeito} = M_{\text{normal}} - M_{\text{variação}}$$

Equação 15 – Determinação do efeito.

Sendo:

s,u,w,y,t,v,x,z = efeitos das combinações

$M_{\text{normal}}$  – Média dos resultados das amostras sob as condições normais

$M_{\text{variação}}$  – Média dos resultados das amostras sob as condições variadas

## 4 - RESULTADOS

### 4.1. – SELEÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Na avaliação dos dados disponíveis no SGA de análises das amostras do programa Instrumentos de Saúde/ Artigos de Saúde do INCQS foi possível verificar a incidência de amostras de bolsa de sangue com as soluções anticoagulantes ACD-A, CPD e CPDA e solução preservadora SAG-M1 no período de estudo. Foi verificada, ainda, a ausência da análise de amostras contendo a solução anticoagulante ACD-B e a solução preservadora SAG-M2.

Na consulta ao banco de dados disponibilizado pela Anvisa foram identificados os 3 detentores de registro de bolsas de sangue que apresentavam maiores números de produtos registrados contendo as soluções analisadas pelo INCQS identificados por letras na tabela 25 (ANVISA, 2011).

Tabela 25 - Identificação dos maiores detentores de registros de produtos contendo as soluções avaliadas

<b>Solução</b>	<b>Detentor de registro</b>
Solução preservadora SAG-M1	A / B / C
Solução anticoagulante CPD	A / B / C
Solução anticoagulante CPDA	A / D / E
Solução anticoagulante ACD-A	C / D / E

(Adaptado de ANVISA, 2011)

Na seleção das amostras comerciais, além de considerar referência a um dos detentores relacionados na tabela 25, a disponibilidade e a validade, e, por corresponder a uma determinação de múltiplos analitos, foi admitido, para a análise de precisão, exatidão, efeito matriz (seletividade) e robustez, a amostra SAG-M1 do detentor A por apresentar os três analitos e as demais amostras, CPD do detentor A, CPDA do detentor C e ACD-A do detentor D, para avaliação do efeito matriz apenas.

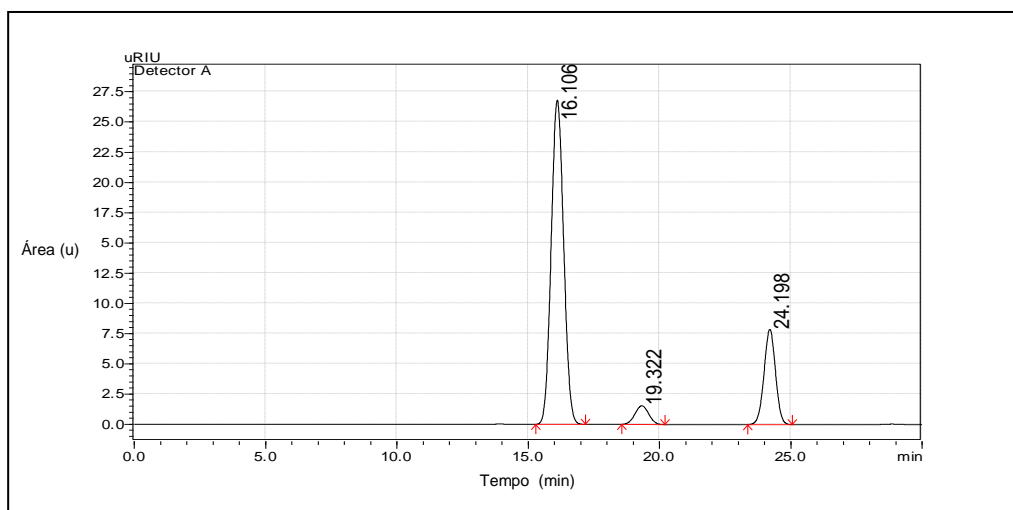
## 4.2. – PLANEJAMENTO DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

### 4.2.1. – Adequação do sistema cromatográfico

A técnica instrumental empregada em determinações para controle de qualidade físico-químico deve proporcionar resultados confiáveis (ABNT, 2005; GARCIA, 2009). Neste objetivo, muitos autores recomendam a realização da verificação da conformidade do sistema cromatográfico (system suitability) no desempenho do equipamento em reproduzir o método (RIBANI, 2004a).

Inicialmente, verificou-se a satisfatoriedade na separação completa dos sinais cromatográficos dos analito pela ausência de sobreposições conforme apresentado anteriormente na figura (figura 11).

Figura 11 - Cromatograma referente a solução-padrão de glicose a 2,7 mg/mL, frutose a 0,2 mg/mL e manitol a 0,75 mg/mL na avaliação da adequação do sistema cromatográfico.



Padrão analítico de concentração de 2,7 mg/mL de glicose, 0,2 mg/mL de frutose e 0,75 mg/mL de manitol, utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.



A avaliação dos sinais cromatográficos demonstrou que todos os parâmetros de adequação estavam dentro dos critérios de conformidade estabelecidos pela farmacopéia americana (CHROMATOGRAPHY, 2011).

A resolução apresentou-se superior a 2, o fator de assimetria inferior a 2, o fator de retenção no intervalo de 1-10, o número de pratos teóricos superior a 2000 e a repetitividade expressa em desvio padrão relativo (DPR) inferior a 2 % (CHROMATOGRAPHY, 2011).

Cabe ressaltar que, a resolução indica o poder de separação do sistema para um par de analitos de interesse, sendo também definida como capacidade de separação de dois ou mais analitos (CHROMATOGRAPHY, 2011; GRAEF, 2007). Assim, considerando que, a avaliação foi realizada na solução-padrão onde os analitos apresentaram-se solubilizados em fase móvel (água tipo I), os sinais cromatográficos obtidos corresponderam apenas aos analitos de interesse não sendo possível determinar a resolução referente ao analito glicose que elui primeiramente (menor tempo de retenção).

A tabela 26 descreve a média dos parâmetros de adequação obtidos pelos sinais cromatográficos revelando excelente reprodutividade e conformidade com os principais compêndios oficiais.

Tabela 26 - Resultados obtidos na adequação do sistema cromatográfico para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol utilizando coluna Shodex SC1011 lote 708082.

Parâmetros de adequação	glicose		frutose		manitol	
	Valor	DPR	Valor	DPR	Valor	DPR
Tempo de retenção (Tr)	16,11	0,01	19,32	0,01	24,20	0,01
Resolução (Rs)	---	---	3,45	0,39	5,48	1,56
Fator de retenção (K)	2,22	0,01	2,87	0,02	3,84	0,01
Fator de assimetria (Tf)	1,06	0,07	1,02	1,39	1,00	0,22
Nº. pratos teóricos (N)	5322	0,34	6206	1,68	14462	0,30

#### 4.2.2. - Verificação preliminar da resposta linear

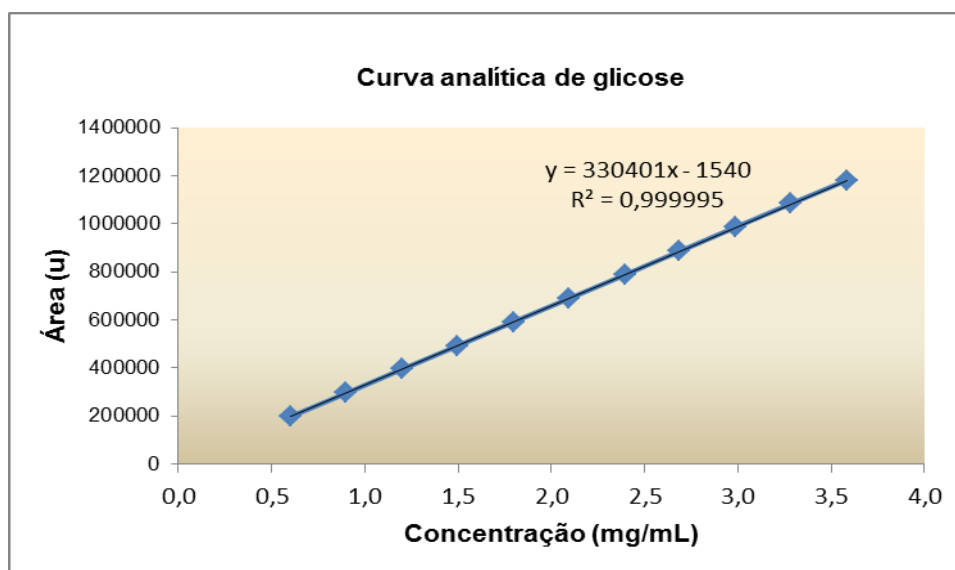
Na verificação da resposta preliminar da faixa linear observou-se que todos os níveis de concentração das curvas analíticas (glicose, frutose e manitol) preparadas conforme item 3.2.2. apresentaram relação linear com excelentes resultados para o coeficiente de determinação.

As tabelas 27, 28 e 29 relacionam as médias das áreas obtidas pelos sinais cromatográficos e as figuras 12,13 e 14 representam as curvas analíticas obtidas.

Tabela 27 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de glicose.

<b>Soluções-padrão</b>	<b>Média da área (u)</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
A	197254,7	0,6
B	295889,7	0,9
C	394686,3	1,2
D	491334,3	1,5
E	591798,7	1,8
F	688334,3	2,1
G	787895,7	2,4
H	886131,3	2,7
I	986222,7	3,0
J	1084732,0	3,3
L	1182090,0	3,6

Figura 12 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de glicose.

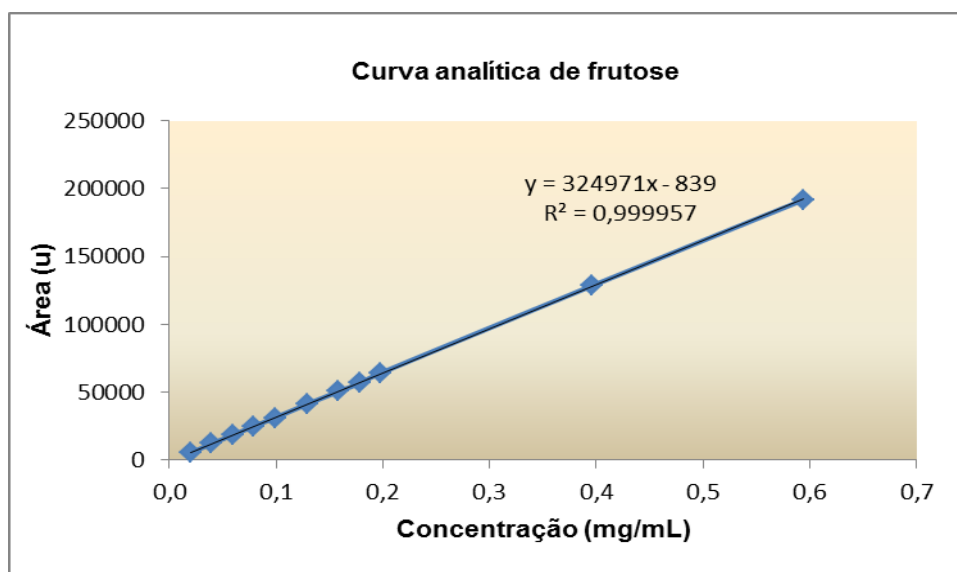


Média das áreas obtidas nos cromatogramas dos padrões na faixa de concentração de 0,60 a 3,60 mg/mL, utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, temperatura do forno em 80°C e detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C.

Tabela 28 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de frutose.

Soluções-padrão	Média da área (u)	Concentração (mg/mL)
A	5309,7	0,02
B	12137,7	0,04
C	18483,3	0,06
D	24946,7	0,08
E	31247,3	0,10
F	41099,7	0,13
G	50530,0	0,16
H	56615,7	0,18
I	64213,7	0,20
J	128542,7	0,40
L	191906,7	0,60

Figura 13 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de frutose.

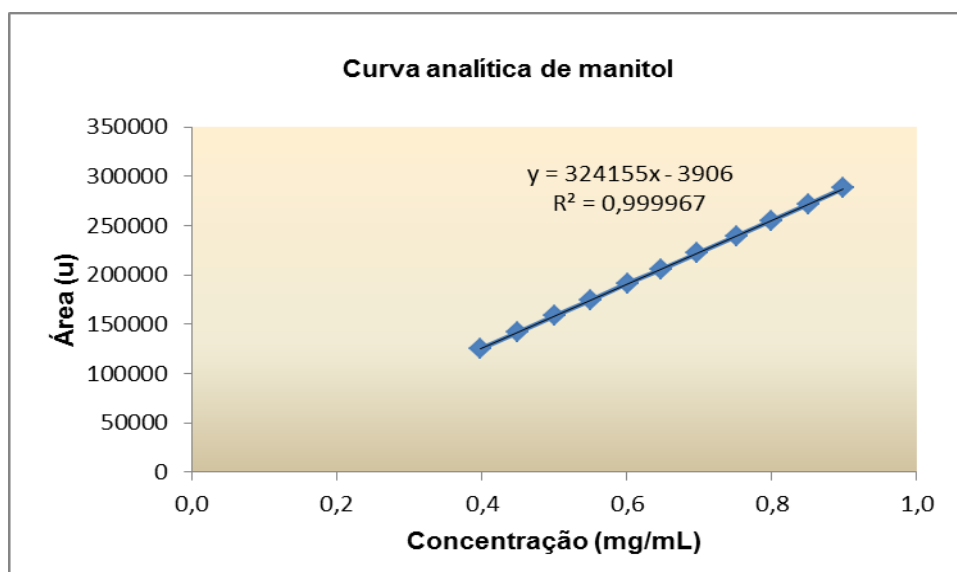


Média das áreas obtidas nos cromatogramas dos padrões na faixa de concentração de 0,02 a 0,60 mg/mL utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, temperatura do forno em 80°C e detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C.

Tabela 29 - Resultados obtidos na verificação preliminar da resposta linear de manitol.

Soluções-padrão	Média da área (u)	Concentração (mg/mL)
A	125125,7	0,40
B	141498,0	0,45
C	158843,7	0,50
D	174381,3	0,55
E	191491,7	0,60
F	205334,7	0,65
G	221967,7	0,70
H	239636,3	0,75
I	255284,7	0,80
J	271760,0	0,85
L	288150,3	0,90

Figura 14 - Curva analítica obtida na verificação preliminar da resposta linear de manitol.



Média das áreas obtidas nos cromatogramas dos padrões na faixa de concentração de 0,40 a 0,90 mg/mL utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, temperatura do forno em 80°C e detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C.

Segundo Souza (2007), os coeficientes de correlação ( $r$ ) e determinação ( $R^2$ ) não são adequados como indicadores de linearidade indicando apenas o grau de ajuste dos dados à curva e podendo, até mesmo, corresponder a pontos bem ajustados em um modelo não linear. Entretanto, segundo recomendado pela Anvisa (2003), o critério de aceitabilidade para o coeficiente de correlação corresponde a 0,99.

Esta etapa apresentou-se importante para identificar possíveis desvios de linearidade devido a determinação de manitol associado a outros analitos em soluções preservadoras apresentar-se ausente nos compêndios oficiais, estando, esta determinação, relacionada apenas em alguns estudos científicos, como o desenvolvido por Fontes (2009) que avaliou a determinação de glicose, frutose e manitol em suco de caju, produto alimentício (uso oral). O estudo em questão não oferece segurança na comparação com a determinação de manitol na solução preservadora de bolsa de sangue, imprescindível para a manutenção da viabilidade do sangue e extremamente crítica por oferecer risco ao paciente receptor no seu uso



Os resultados obtidos demonstraram satisfatoriedade dos parâmetros de adequação para os analitos nos fluxos testados. No fluxo de 0,6 mL/min foi verificado um fator de retenção inferior para a glicose sendo excluído da avaliação. Embora os fluxos de 0,4 e 0,5 mL/min tenham apresentado valores muito próximos, optou-se por utilizar o fluxo de 0,5 mL/min devido ao menor tempo de análise.

#### 4.2.3.2 – Avaliação da temperatura do forno

A temperatura do forno foi avaliada, após o estabelecimento do fluxo de fase móvel (0,5 mL/min), para verificar sua influência no método proposto. Isto devido, Santos et al. (2006) em seu estudo de determinação de açúcares, já mencionar que em determinações com detecção por índice de refração, além do fluxo de fase móvel, o controle de temperatura exerce grande influência.

Neste estudo, as temperaturas avaliadas permitiram a análise dos analitos sendo encontrado valor inadequado referente ao número de pratos teóricos (valor inferior a 2000) para o analito glicose na temperatura de 60°C e por isso foi excluída esta temperatura. Os resultados obtidos apresentam-se descritos na tabela 31.

Tabela 31 - Resultado da separação cromatográfica na avaliação da temperatura do forno para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

Parâmetros de adequação	Glicose			Frutose			Manitol		
	60°C	70°C	80°C	60°C	70°C	80°C	60°C	70°C	80°C
Tr	16,0	16,1	16,1	20,4	19,8	19,3	24,2	25,0	24,2
Rs	---	---	---	2,59	3,22	3,50	4,33	5,17	5,54
K	2,20	2,21	2,22	3,07	2,95	2,86	4,22	4,01	3,84
N	1445	3037	5264	2366	4858	6631	11361	12431	14443
Tf	1,26	1,11	1,07	1,04	1,05	1,01	1,02	1,04	1,01

Tr - Tempo de retenção

K – Fator de retenção

Tf – Fator de assimetria

N – Número de pratos teóricos

Rs – Resolução

As avaliações nas temperaturas de 70° e 80°C também não apresentaram problemas na eficiência de separação, sendo que na temperatura de 80°C foram obtidos os resultados com maiores números de pratos teóricos, maior proximidade de 1 (um) dos valores de fator de assimetria e melhor resolução concordando com a especificação do fabricante da coluna cromatográfica. Este indica a temperatura de 80°C para um aumento da eficiência da separação cromatográfica de monossacarídeos (SHODEX, 2011b).

#### 4.2.4 - Qualificação do padrão secundário

Considerando a disponibilidade e o alto custo dos materiais de referência certificados (MRC), a substituição desses surge como uma alternativa que, conforme mencionada em alguns trabalhos científicos, viabiliza o processo analítico (BRITO et al., 2003; SILVA, 2010; SOUZA, 2007). Sua utilização apresenta-se também recomendada pela Anvisa (2003) condicionada a comprovação do teor.

Para esta finalidade, inicialmente, os padrões secundários Aldrich Sigma de glicose, frutose e manitol foram avaliados apresentando-se na forma de pó branco homogêneo, assim como os respectivos padrões de referência USP dos analitos.

Na avaliação dos sinais cromatográficos obtidos foi observada a ausência de interferentes na região de determinação dos analitos e o teor (pureza) foi determinado permitindo posteriores correções nas avaliações. Os resultados obtidos apresentam-se descritos detalhadamente no APÊNDICE D e, resumidamente, na tabela 32 e confirmaram as informações técnicas disponibilizadas pelo fabricante.



Tabela 32 - Resultados da qualificação do padrão secundário para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Analito</b>	<b>Conc. teórica. (mg/mL)</b>	<b>Conc. exp. (mg/mL)</b>	<b>Teor (%)</b>	<b>Média do teor (%)</b>
glicose	2,866	2,852	99,5	99,5
	2,865	2,849	99,4	
	2,864	2,848	99,5	
frutose	0,326	0,324	99,5	99,5
	0,322	0,320	99,4	
	0,322	0,321	99,6	
manitol	0,519	0,510	98,4	98,4
	0,521	0,514	98,8	
	0,521	0,511	98,0	

#### 4.2.5 - Verificação da resposta de separação da coluna cromatográfica

Na etapa de adequação do sistema cromatográfico (item 3.2.1.) foi avaliado o equipamento no desempenho do método analítico utilizando a coluna cromatográfica Shodex SC1011 de lote 708082. Entretanto, para avaliação dos parâmetros da validação analítica, optou-se por utilizar uma nova coluna cromatográfica de mesma especificação (propriedades físicas) diferenciando-se no lote, 011009.

Desta forma, foi necessária a realização da verificação da resposta de separação cromatográfica da nova coluna através da avaliação dos parâmetros de adequação já descritos anteriormente.

Os sinais cromatográficos referentes aos níveis de concentração da curva analítica descrita no item 3.2.4. apresentaram os resultados descritos na tabela 33 relacionados com as médias dos valores obtidos nos sinais cromatográficos.

Tabela 33 - Resultados da verificação da resposta de separação cromatográfica para a determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol utilizando a coluna cromatográfica Shodex SC1011 lote 011009.

Parâmetros de adequação	Glicose		Frutose		Manitol	
	Valor	DPR	Valor	DPR	Valor	DPR
Tempo de retenção	16,86	0,01	19,97	0,01	24,65	0,01
Resolução	---	---	3,25	0,14	5,04	0,15
Fator de retenção	2,37	0,02	2,99	0,02	3,93	0,02
Fator de assimetria	1,08	0,04	1,04	0,27	1,05	0,23
Nº. pratos teóricos	5415	0,41	6543	0,45	12722	0,24

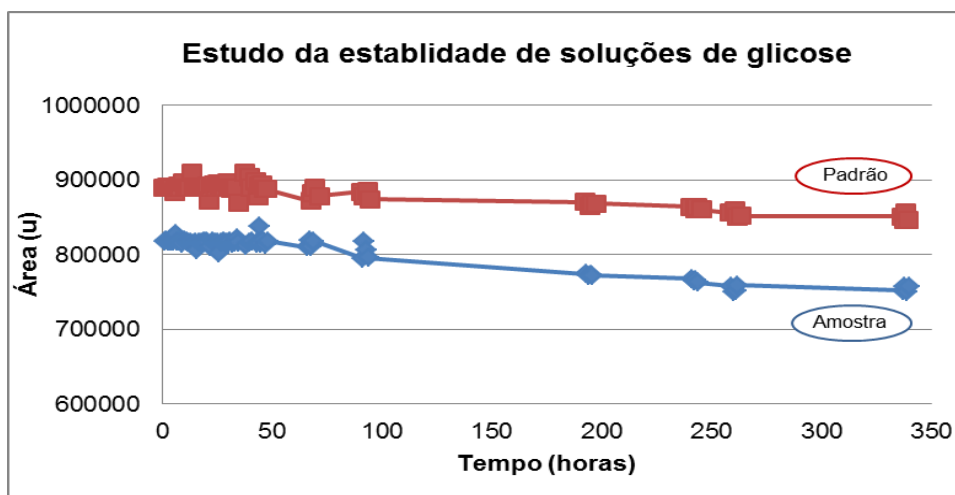
Nesta avaliação, os resultados apresentaram pequenas alterações em relação a etapa de adequação do sistema cromatográfico sendo mais significativo para número de pratos teóricos na separação do manitol. Esta variação apresenta-se relacionada com a diferença de eficiência de separação das colunas. No entanto, todos os resultados apresentaram-se dentro dos critérios de conformidade estabelecidos pela Farmacopéia Americana permitindo a utilização da mesma.

A verificação da separação cromatográfica da nova coluna assegurou que a alteração de coluna não interferiu significativamente no desempenho do equipamento para a produção dos resultados pelo método em estudo.

#### 4.2.6 - Estudo da estabilidade das soluções dos analitos

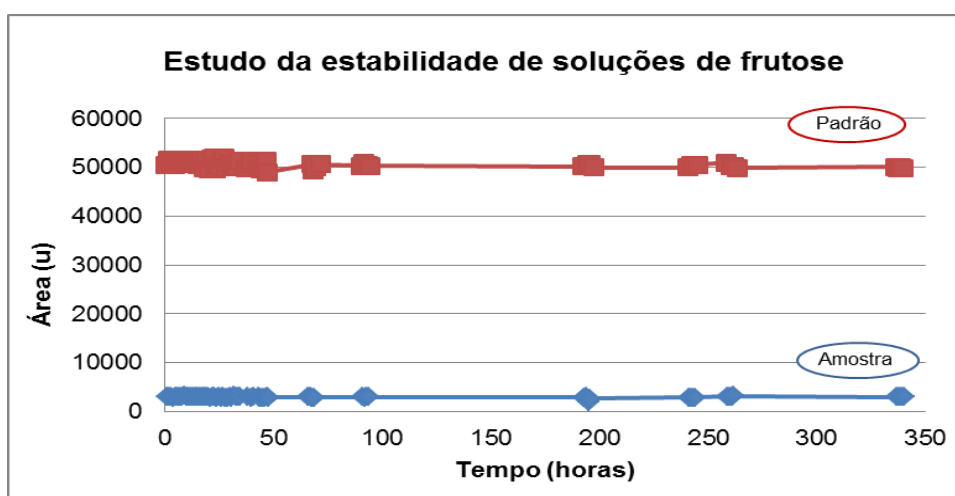
No estudo da estabilidade das soluções dos analitos foi possível comparar as áreas obtidas nas injeções da solução-padrão e da solução-amostra. Segundo Aguiar (2009), esta etapa apresenta-se importante para evitar que os experimentos sejam afetados por instabilidades nas soluções permitindo estabelecimento da segurança do tempo de preparo e uso das soluções permitindo a redução do custo analítico. As figuras 15, 16 e 17 demonstram a variação observada na área da solução-padrão e da solução-amostra para cada analito.

Figura 15 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito glicose em função do tempo.



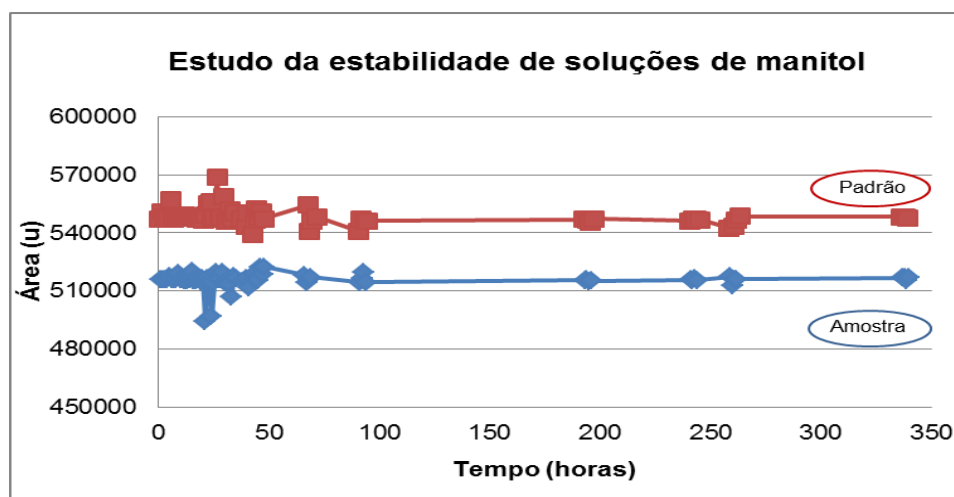
Áreas referentes ao analito glicose obtidas nos cromatogramas da solução-padrão e da solução-amostra SAG-M1, utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Figura 16 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito frutose em função do tempo.



Áreas referentes ao analito frutose obtidas nos cromatogramas da solução-padrão e da solução-amostra SAG-M1, utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Figura 17 - Avaliação da estabilidade da solução-padrão e da solução-amostra do analito manitol em função do tempo.



Áreas referentes ao analito manitol obtidas nos cromatogramas da solução-padrão e da solução-amostra SAG-M1, utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Neste estudo, os sinais cromatográficos apresentaram ausência de produtos de degradação na região de determinação dos analitos. De acordo com os resultados obtidos pode-se observar, após 100 horas (quatro dias) de preparo de solução, pequena variação de área mais evidente no analito glicose. Para os demais analitos (frutose e manitol), pode-se verificar que ambas as soluções (solução-padrão e solução-amostra) permaneceram com suas concentrações inalteradas no período estudado (336 horas ou quatorze dias).

### 4.3 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA

#### 4.3.1 – Avaliação da seletividade

Conforme as definições do item 1.4.4. referente a seletividade e especificidade, nesta etapa foi avaliada a seletividade do método e não sua

especificidade uma vez que o método em estudo apresenta como aplicabilidade produzir resposta para múltiplos analitos (BARBOSA, 2009).

Considerando a importância da seletividade pelo comprometimento dos resultados de linearidade, exatidão e precisão, conforme mencionado por Ribani (2004b) optou-se por avaliar este parâmetro em duas etapas conforme descrito no item 3.3.1..

i) Comparação de matriz isenta de analito e matriz adicionada de analito

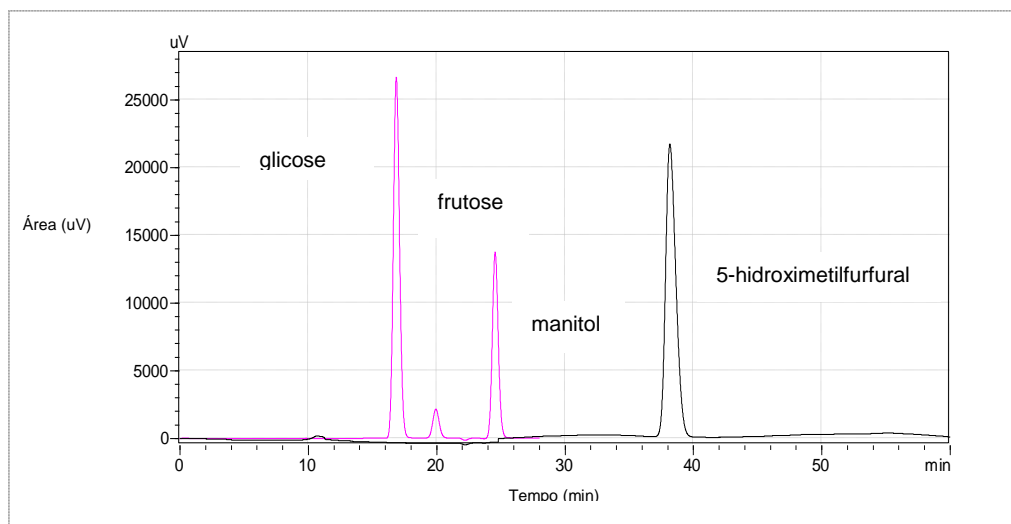
Nesta avaliação, os grupos de soluções-amostra foram preparados e submetidos às condições de degradação forçada, neste caso utilizou-se a autoclavação por apresentar-se como uma etapa do processo industrial de bolsas de sangue e provocar a formação de possíveis produtos de degradação.

Cabe ressaltar que se tratando de soluções anticoagulantes e preservadoras autoclavadas, a dextrose apresenta como principais subprodutos de degradação a frutose e o 5-hidroximetilfurfural (HMF).

Segundo Templeton (2003), a detecção por índice de refração de HMF exigiria uma sensibilidade muito grande devido aos baixos níveis de formação desses compostos. Além disso, este analito apresenta tempo de retenção superior aos analitos de interesse conforme comprovado pela figura 18.

No caso da frutose, que possui a mesma aplicabilidade da glicose segundo Costa Júnior (2006), esta apresenta sua quantificação como um dos objetivos deste estudo apresentando seu resultado final expresso em associação com o teor de glicose.

Figura 18 - Avaliação da seletividade do método de determinação de glicose e frutose monoidratas e manitol.

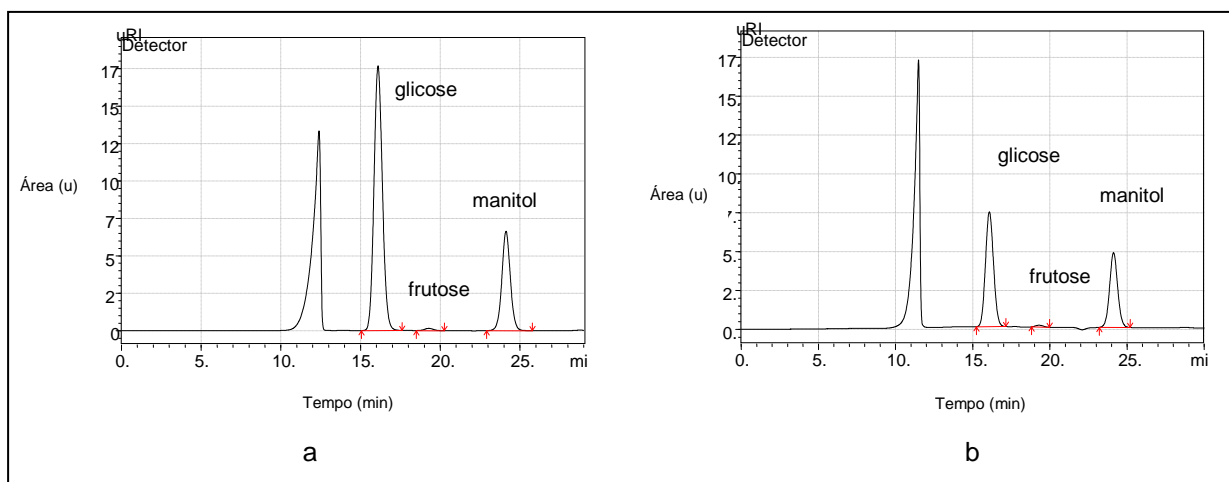


Cromatogramas referentes ao padrão analítico de 5-hidroximetilfurfural na concentração de 3 mg/mL (cor preta) sobreposto ao cromatograma da solução-padrão do nível intermediário (D) da avaliação da adequação do padrão secundário (cor rosa), utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Os cromatogramas obtidos foram avaliados visualmente quanto a presença de interferentes e/ou produtos de degradação. A comparação dos cromatogramas obedeceu à sequência descrita no item 3.3.1. subitem i).

A comparação dos cromatogramas da matriz simulada com analito autoclavada (a) com a amostra comercial (b) apresentada na figura 19 comprovou que a matriz simulada em laboratório apresentou as características cromatográficas da amostra proveniente do processo industrial pela verificação dos sinais cromatográficos em tempos de retenção semelhantes.

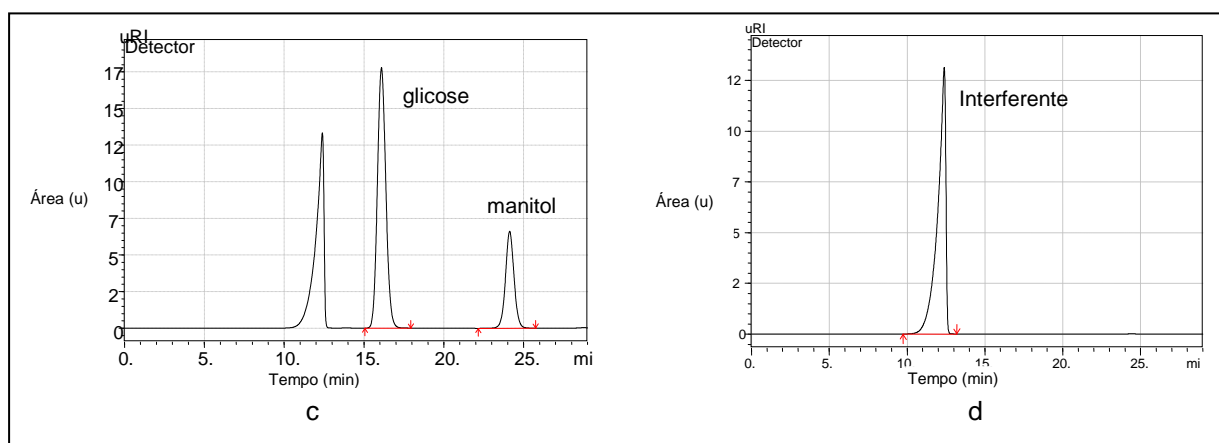
Figura 19 - Comparação da matriz simulada com os analitos e a amostra comercial na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monohidratadas e manitol.



Cromatogramas referentes a matriz simulada de SAG-M1 com analito autoclavada (a) e a matriz comercial de SAG-M1 (b), utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

A figura 20 compara os cromatogramas da matriz simulada com analito não autoclavada (c) com a matriz simulada isenta do analito (d) não autoclavada para identificar a presença do interferente no placebo e na matriz simulada com analito.

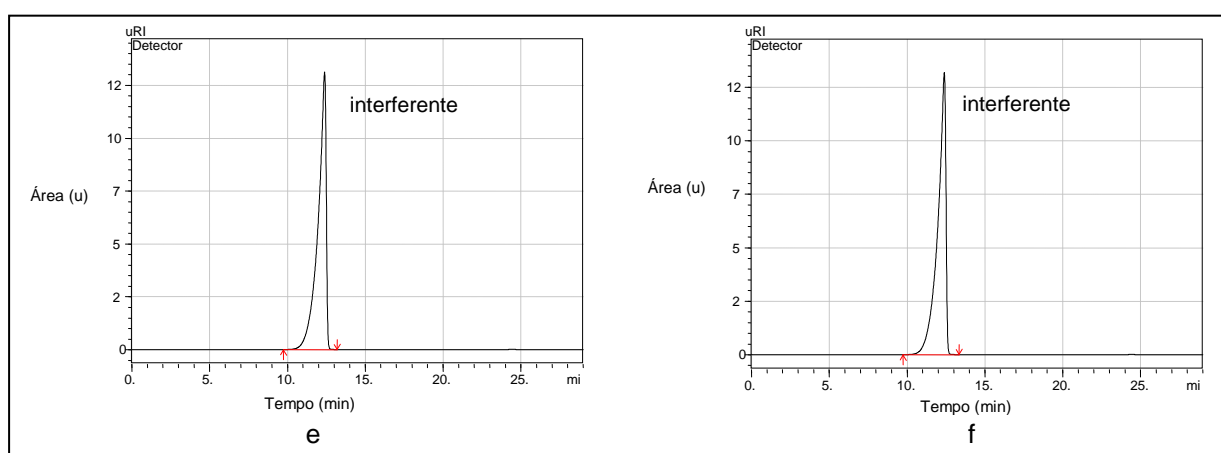
Figura 20 - Comparação das matrizes não autoclavadas com os analitos e isenta dos analitos na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monohidratadas e manitol.



Cromatogramas referentes a matriz de SAG-M1 com analito não autoclavada (c) e a matriz de SAG-M1 isenta do analito (placebo) não autoclavada (d), utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

A figura 21 relacionou a comparação dos cromatogramas da matriz simulada isenta dos analitos antes (e) e após autoclavagem (f) permitindo avaliar o efeito não representativo do processo de degradação no placebo.

Figura 21 - Comparação da matriz isenta dos analitos antes e após autoclavagem na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.



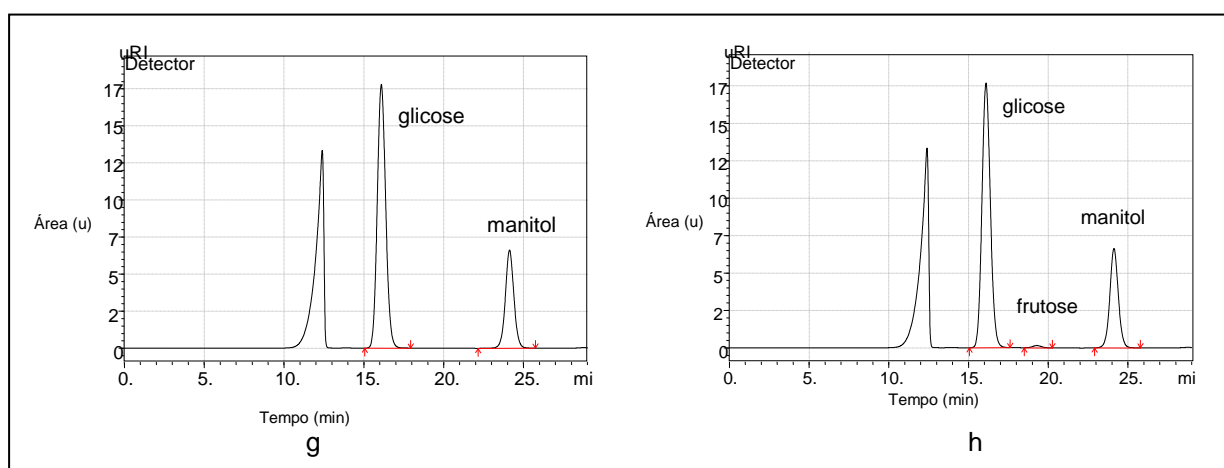
Cromatogramas referentes a matriz de SAG-M 1 isenta do analito não autoclavada (e) e a matriz de SAG-M 1 isenta do analito (placebo) autoclavada (f), utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Finalizando, os cromatogramas obtidos nas análises da matriz simulada com os analitos antes (g) e após (h) o processo de degradação relacionado na figura 22 comprovou a formação do produto de degradação frutose e a ausência de sinais de interferentes e outros produtos em eluição simultânea com os analitos de interesse. O 5-hidroximetilfurfural não foi observado devido aos cromatogramas serem realizados no tempo máximo de 30 minutos e este produto de degradação apresentar tempo de retenção superior (aproximadamente 40 minutos) e fora da região de interesse.

A redução da área de glicose nas soluções autoclavadas para a formação de frutose apresentou-se variável para cada solução anticoagulante e preservadora estando em menor proporção na amostra simulada de SAG-M1.



Figura 22 - Comparação da matriz com os analitos antes e após autoclavação na avaliação da seletividade para a validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.



Cromatogramas referentes a matriz de SAG-M1 com analito não autoclavada (g) e a matriz de SAG-M1 com analito autoclavada (h), utilizando como fase móvel água tipo I sob o fluxo de 0,5 mL/minuto, coluna de troca iônica Shodex SC1011 tamanho 300 x 6,5mm, detecção por índice de refração com temperatura da célula em 55°C e temperatura do forno em 80°C.

Os resultados apresentados corresponderam às avaliações na matriz SAG-M1, sendo também reproduzido nas demais soluções anticoagulante e preservadora. Cabe ressaltar que, devido a ausência de soluções comerciais de SAG-M2 e ACD-B não foi possível realizar a comparação da amostra com analito autoclavada e a amostra comercial, no entanto, as avaliações seqüenciais foram realizadas.

A ausência de interferentes e a ausência dos produtos de degradação em eluição simultânea com os analitos de interesse foram comprovadas, assim como na avaliação da matriz SAG-M1 comprovando que o método permite detectar os analitos na presença de outras substâncias.

## ii) Avaliação do efeito-matriz

Esta etapa, recomendada pelo Inmetro (2010) e citada em alguns trabalhos científicos, dentre eles o estudo desenvolvido por Souza (2007), permitiu avaliar não somente os interferentes da matriz, mas também todos aqueles provenientes de

materiais e reagentes relacionados com o preparo das soluções-amostra e soluções padrão.

Considerando que trata-se de uma determinação simultânea dos analitos em diferentes matrizes, as avaliações foram realizadas para cada combinação analito-matriz separadamente, conforme recomendado por Souza (2007).

Os resultados obtidos relacionados com as duas curvas (*curva-solvente* e *curva-matriz*) foram avaliados segundo os critérios da planilha de linearidade de Souza e Junqueira para comprovação da linearidade. Isto devido aos estudos realizados por Fust (2011), Aguiar (2008) e Souza (2007) indicarem que, na indisponibilidade de materiais de referência, é necessário o delineamento experimental para comprovação da linearidade no preparo das curvas analíticas destinadas a verificação de efeito matriz.

Na segunda etapa da avaliação, através da planilha desenvolvida no Setor de Alimentos e Contaminantes do INCQS/FIOCRUZ, a verificação da existência de homogeneidade entre as variâncias residuais foi ensaiada através do teste F sendo considerada ausência de significância entre as variâncias (homogeneidade das variâncias) na obtenção do valor de F calculado ter sido inferior ao valor de F tabelado (F crítico).

Nesta avaliação, considerada determinante para a avaliação das inclinações e interseções das curvas, foi verificada a homogeneidade das variâncias para todos os analitos nas amostras estudadas com exceção da avaliação do analito glicose na solução anticoagulante ACD-A (INMETRO, 2007).

Na avaliação das inclinações e interseções das duas curvas estudadas (*curva-solvente* e *curva-matriz*), obedecendo ao critério da avaliação da homogeneidade de variâncias residuais, o teste t indicou que todas as matrizes estudadas apresentaram rejeição do efeito matriz no ensaio pelos valores de t calculado ( $t_a^2$  e  $t_b^3$ ) inferiores aos valores de t tabelado (t crítico).

Os resultados apresentam-se descritos resumidamente nas tabelas 34 e 35 e as planilhas das avaliações de efeito matriz das soluções anticoagulantes CPDA, CPD e ACD-A e da solução preservadora SAG-M1 relacionadas detalhadamente no APÊNDICE E, relacionados respectivamente com os analitos correspondentes.

---

$t_a^2$  - Estatística t para comparação das inclinações das curvas solvente e matriz

$t_b^3$  - Estatística t para comparação das intersecções das curvas solvente e matriz

Tabela 34 - Resultados da avaliação da homogeneidade das variâncias do efeito matriz na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

Soluções anticoagulantes e preservadora		Resultados de $F_{calc}$	Resultados de $F_{tab}$	Avaliação
SAG-M1	Glicose	42,56	2,29	$F_{calc} > F_{tab}$
	Frutose	56,82	2,26	$F_{calc} > F_{tab}$
	Manitol	51,97	2,34	$F_{calc} > F_{tab}$
CPDA	Glicose	48,98	2,24	$F_{calc} > F_{tab}$
	Frutose	79,52	2,26	$F_{calc} > F_{tab}$
CPD	Glicose	3,72	2,17	$F_{calc} > F_{tab}$
	Frutose	208,30	2,26	$F_{calc} > F_{tab}$
ACD-A	Glicose	1,61	2,17	$F_{calc} < F_{tab}$
	Frutose	13,01	2,26	$F_{calc} > F_{tab}$

Tabela 35 - Resultados da avaliação das inclinações e interseções das curvas do efeito matriz na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

Soluções anticoagulantes e preservadora		Resultados de $t_a$	Resultados de $t_b$	Resultados de $t_{tab}$	Avaliação
SAG-M1	Glicose	0,58	1,16	2,09	
	Frutose	1,07	1,88	2,10	
	Manitol	0,64	1,05	2,09	
CPDA	Glicose	1,89	1,37	2,09	$t_a < t_{tab}$
	Frutose	0,38	1,34	2,10	
CPD	Glicose	2,02	0,72	2,05	$t_b < t_{tab}$
	Frutose	0,92	1,44	2,10	
ACD-A	Glicose	0,06	0,35	2,02	
	Frutose	0,90	1,67	2,10	

A determinação do efeito matriz vem apresentando crescente aplicação em validações de métodos quantitativos conforme pode ser observado nos estudos de Teixeira (2008), Aguiar (2008), Cardoso (2008) e Fust (2011).

Assim como nas comparações da matriz isenta de analito com a matriz adicionada de analito, a determinação do efeito matriz permitiu excluir a possibilidade de interferência no desempenho das medições conforme recomendado pelo Inmetro (2010) e Anvisa (2003).

#### 4.3.2 – Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção

Na avaliação da linearidade, assim como na avaliação realizada por Barbosa (2009) e outros autores, foram construídas 3 curvas analíticas sob injeção em triplicata conforme descrito no item 3.3.2. admitindo 7 níveis de concentração equidistantes obedecendo aos critérios estabelecidos pela Anvisa (BRASIL, 2003) e Inmetro (INMETRO,2010).

A faixa linear de trabalho escolhida permitiu a determinação dos analitos em seis soluções anticoagulantes e preservadoras que apresentam variações na concentração dos analitos conforme descrito na tabela 3 (item 1.3.1.).

Nesta etapa, optou-se utilizar como ferramenta, a planilha desenvolvida por Souza & Junqueira (2005) - Planilha de Avaliação da Linearidade de Curva Analítica devido a avaliação visual e os coeficientes de correlação e determinação, embora ainda recomendado em muitas literaturas se apresentarem inadequados por possibilitarem indicar apenas pontos bem ajustados à curva (SOUZA, 2007). Cabe ressaltar que, todos os valores encontrados de coeficiente de correlação apresentaram-se superiores a 0,99 conforme estabelecido pela Anvisa (2003).

Na avaliação estatística dos resultados dos analitos, o tratamento dos valores *outliers* (valores extremos) pelo teste de Jacknife considerou o limite máximo de 22,2% do número total de resultados da curva analítica (21 replicatas) (HORWITZ, 1995). A premissa da distribuição normal para os resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner, a variabilidade aleatória pelo teste de Levene demonstrou homoscedasticidade e a independência dos resíduos foi comprovada pelo teste de Durbin-Watson. A confirmação da homoscedasticidade e independência indicaram o uso do MMQO (Método dos Mínimos Quadrados Ordinários) para estimativa dos

parâmetros da regressão. Nesta etapa, as avaliações nas faixas estudadas (glicose entre 2,1 e 3,3 mg/mL, frutose entre 0,010 e 0,448 mg/mL e manitol entre 0,90 e 1,80 mg/mL) não interferiram na determinação da significância da regressão e desvio da linearidade. As descrições das avaliações realizadas apresentam-se no APÊNDICE B (VALE, 2010).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pela planilha desenvolvida por Souza & Junqueira (2005) baseando-se no desvio padrão da resposta e nos coeficientes angular e linear conforme relacionado no estudo realizado por BRITO et al. (2003).

A avaliação dos analitos apresentou satisfatoriedade das premissas e comprovação da linearidade com excelentes coeficientes de correlação satisfazendo aos critérios estabelecidos pela Anvisa (2003) e Inmetro (2010). Os resultados encontrados apresentam-se resumidamente descritos na tabela 36 e relacionados detalhadamente nas planilhas descritas no APÊNDICE F.

Tabela 36 - Resultados obtidos na avaliação da linearidade na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Parâmetro estatístico</b>	<b>glicose</b>	<b>frutose</b>	<b>manitol</b>
Intervalo de concentração (mg/mL)	2,1 – 3,3	0,010 – 0,448	0,90-1,80
Coeficiente de correlação	0,9998	0,9999	0,9990
Limite de detecção (mg/mL)	2,94E-02	5,84E-03	4,17E-02
Limite de quantificação (mg/mL)	8,79E-02	1,75E-02	1,24E-01

#### 4.3.3 – Avaliação da precisão

##### i) Avaliação da repetitividade

Esta avaliação foi realizada pelo doseamento de vinte replicatas da solução-amostra em curva analítica de sete níveis injetados em triplicata. O número de réplicas adotado apresentou-se superior ao recomendado pela Anvisa que corresponde a nove determinações (BRASIL, 2003).

Além da denominação, repetitividade e repetibilidade, o Inmetro e a Anvisa apresentam ainda divergências quanto os critérios de aceitabilidade. A Anvisa recomenda como critério de aceitabilidade o valor de DPR igual ou inferior a 5% e o Inmetro recomenda a avaliação pela equação de *Horwitz* já estabelecida no seu guia e esta encontra-se relacionada com a razão de concentração do analito (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Esta última, considerada por Wood (1999) como a melhor opção para o critério de aceitabilidade da precisão de um método, apresenta seus valores obtidos no estudo desenvolvido por Horwitz que independe da natureza do analito ou da técnica de análise envolvida.

Na avaliação foram considerados os dois critérios de aceitabilidade (Anvisa e Inmetro), conforme descritos na tabela 37 que relaciona também os resultados obtidos. O APÊNDICE G descreve detalhadamente todos os resultados da avaliação.

Tabela 37 - Resultados obtidos na avaliação da repetitividade na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Curva</b>	<b>glicose</b>	<b>Frutose</b>	<b>manitol</b>
Concentração média	8,90	0,049	5,20
DPR	1,04	2,57	1,90
Critério Anvisa - DPR	≤ 5%	≤ 5%	≤ 5%
Critério Inmetro - DPR	4%	8%	4%

O critério de aceitabilidade do Inmetro apresenta-se relacionado com a razão de concentração analito na amostra estabelecendo uma relação inversamente proporcional entre esta razão de concentração e o valor de desvio padrão relativo conforme apresentado na tabela 10. Esta relação justifica o critério de aceitabilidade de maior desvio padrão relativo para o analito frutose em comparação com os demais analitos.

Este parâmetro demonstrou a concordância entre os resultados de medições sucessivas sob as mesmas condições num curto intervalo de tempo pela obtenção de valores de DPR dentro dos critérios de aceitabilidade (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

## ii) Avaliação da precisão intermediária

A precisão intermediária avaliada em duas instrumentações diferentes contemplou o recomendado pela Anvisa (2003) pelo número de dias e número de equipamentos e superou o número de réplicas recomendadas pelo Inmetro (2010).

A avaliação deste parâmetro foi realizada conforme recomendado pelo Inmetro baseando-se na dispersão entre os resultados obtidos, como critério de aceitabilidade. Assim como na repetitividade, foram admitidos os valores de DPR recomendados pela Anvisa e pelo Inmetro relacionados na tabela 38.

Conforme recomendado por Ribani (2004a; 2004b), esta etapa é considerada importante para a aceitabilidade do método, sendo esperado que corresponda a avaliação com maior representatividade quanto a variabilidade dos resultados. No entanto, os resultados de DPR apresentaram baixa variabilidade, estando resumidamente descritos na tabela 38 e relacionados sucintamente no APÊNDICE H.

Tabela 38 - Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Curva</b>	<b>glicose</b>	<b>Frutose</b>	<b>manitol</b>
Concentração média	8,94	0,049	5,17
DPR	0,86	2,71	1,53
Critério Anvisa - DPR	≤ 5%	≤ 5%	≤ 5%
Critério Inmetro - DPR	4%	8%	4%

#### 4.3.4 – Avaliação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela determinação da recuperação, recomendado pelo Inmetro (2010) e pela Anvisa (2003) e escolhido por ser considerado o método mais utilizado para validação de processos analíticos (LOWEN, 2003; MAMANI, 2007; BARBOSA, 2009; BENETTI, 2011;).

Embora a Anvisa e o Inmetro recomendem a utilização de 3 níveis de concentração, nesta avaliação foram utilizados os sete níveis de concentração da curva analítica, preparados e avaliados conforme descrito no item 3.3.4. (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

As avaliações foram realizadas isoladamente para cada analito e foi adotado como critério de aceitabilidade o estudo desenvolvido por Horwitz (1995). Neste estudo, a recuperação apresenta-se relacionada com as concentrações dos analitos, obtidas na etapa de repetitividade, e correspondente a 95-105% para os analitos glicose e manitol e 80-110% para o analito frutose.

A tabela 39 descreve todos os resultados obtidos para recuperação e o APÊNDICE I relaciona detalhadamente os cálculos envolvidos, sendo possível observar que as médias dos resultados se encontram dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 39 - Resultados obtidos na avaliação da recuperação na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

<b>Curva</b>	<b>glicose (%)</b>	<b>frutose (%)</b>	<b>manitol (%)</b>
Nível 1	98,3	91,2	103,7
Nível 2	96,5	94,4	105,1
Nível 3	98,7	95,0	103,8
Nível 4	99,8	95,5	105,5
Nível 5	99,6	96,2	104,6
Nível 6	99,8	96,0	106,2
Recuperação média (%)	98,8	94,7	104,8



#### 4.3.5 – Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada pela adaptação do teste de Youden, recomendado pelo Inmetro (2010) e considerado o método mais utilizado nesta avaliação. Esta ferramenta permite avaliar e ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais indicando o grau desta influência (TEIXEIRA, 2008; BARBOSA, 2009; INMETRO, 2010; BENETTI, 2011). A escolha das variáveis, denominadas de fatores, baseou-se na indicação da Anvisa (2003) apresentando-se relacionada com a técnica empregada no método e estando descrito no item 3.3.5..

Foram considerados dois níveis, identificado por nível I e nível II, para avaliação dos fatores de temperatura da célula do detector, temperatura do forno, volume de injeção, composição da fase móvel e fluxo da fase móvel. O número de injeções em cada combinação também obedeceu ao critério de aceitabilidade estabelecido pela Farmacopéia Americana que determina o mínimo de seis injeções para valores de DPR inferiores a dois (CHROMATOGRAPHY, 2011).

Todos os resultados das combinações dos fatores apresentam-se relacionados detalhadamente no APÊNDICE J correspondente às determinações de glicose, frutose e manitol respectivamente. Esses resultados foram demonstrados pelos parâmetros de adequação do sistema cromatográficos: resolução (Rs), fator de retenção (k), fator de assimetria (Tf) e número de pratos teóricos(N), tempo de retenção (Tr) e área obtida. A tabela 40 indica, resumidamente, a variabilidade dos resultados obtidos para a determinação de cada analito.

Tabela 40 - Variabilidade dos resultados dos parâmetros de adequação da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose e frutose monoidratadas e manitol.

Parâmetros	Glicose	Frutose	Manitol
Tempo de retenção	13,3 – 16,9	16,1 – 22,3	20,3 – 27,6
Resolução	---	2,806 - 3,483	4,197 – 5,210
Fator de retenção	1,659 – 2,741	2,222 – 3,464	3,057 – 4,525
Fator de assimetria	1,065 – 1,113	1,013 – 1,120	0,924 – 1,145
Nº. pratos teóricos	2919 - 6181	3546 - 8845	5128 - 13242

Foi observada que todas as combinações apresentaram valores dentro dos critérios de aceitabilidade, ou seja, a resolução ( $R_s$ ) superior a 2, o fator de retenção ( $k$ ) entre 1 e 10, fator de assimetria ( $T_f$ ) inferior a 2 e número de pratos teóricos ( $N$ ) superior a 2000. Além disso, todos os resultados apresentaram repetitividade dentro do permitido (inferior a 2%), conforme descrito detalhadamente no APÊNDICE J, demonstrando baixa variabilidade do equipamento (CHROMATOGRAPHY, 2011).

Os efeitos resultantes dessas combinações para cada fator na determinação dos analitos apresentam-se descritos com valores em módulo nas tabelas 41, 42 e 43 respectivamente e a verificação gráfica demonstrada nas figuras 23, 24 e 25 possibilita observar a influência dos fatores no método.

Tabela 41 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose.

Fator	Nível	Tr	$R_s$	K	F	N
Temperatura do detector	(I)	0,2	---	0,3	0,6	13,1
	(II)	0,0	---	0,0	0,5	4,2
Temperatura do forno	(I)	0,1	---	0,2	1,0	5,5
	(II)	0,1	---	0,2	0,5	16,7
Volume de injeção	(I)	0,2	---	0,3	0,3	5,2
	(II)	0,1	---	0,2	0,5	3,8
Composição da fase móvel	(I)	4,8	---	7,1	0,4	14,1
	(II)	0,8	---	1,1	0,1	2,5
Fluxo da fase móvel	(I)	8,8	---	13,0	0,3	16,4
	(II)	11,1	---	16,3	0,4	8,9

Figura 23: Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de glicose.

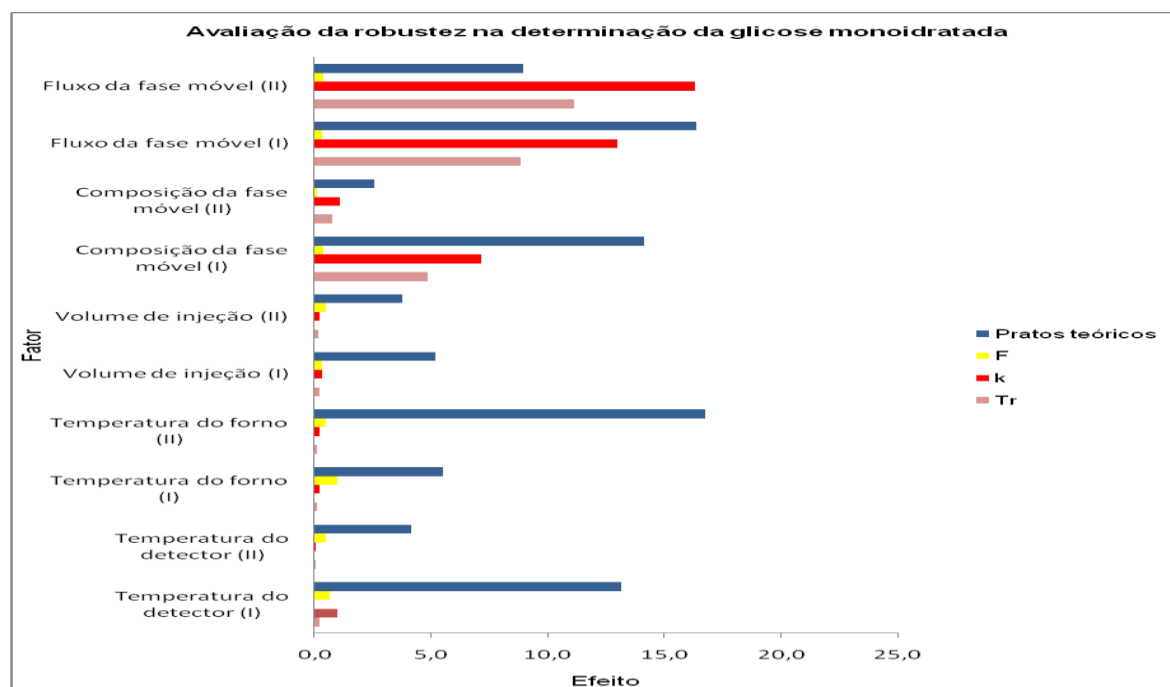


Tabela 42 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de frutose.

Fator	Nível	Tr	Rs	k	F	N
Temperatura do detector	(I)	0,0	3,6	0,0	0,3	9,3
	(II)	0,0	2,0	0,0	1,2	5,1
Temperatura do forno	(I)	0,3	1,3	0,4	2,1	3,4
	(II)	0,8	2,0	1,1	0,0	9,8
Volume de injeção	(I)	0,4	2,5	0,5	1,1	5,8
	(II)	0,2	2,0	0,3	1,0	4,2
Composição da fase móvel	(I)	4,7	6,6	6,5	1,5	17,0
	(II)	0,7	1,6	1,0	0,1	5,5
Fluxo da fase móvel	(I)	5,8	7,8	12,0	1,2	18,7
	(II)	11,0	4,0	15,0	1,1	8,5

Figura 24 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de frutose.

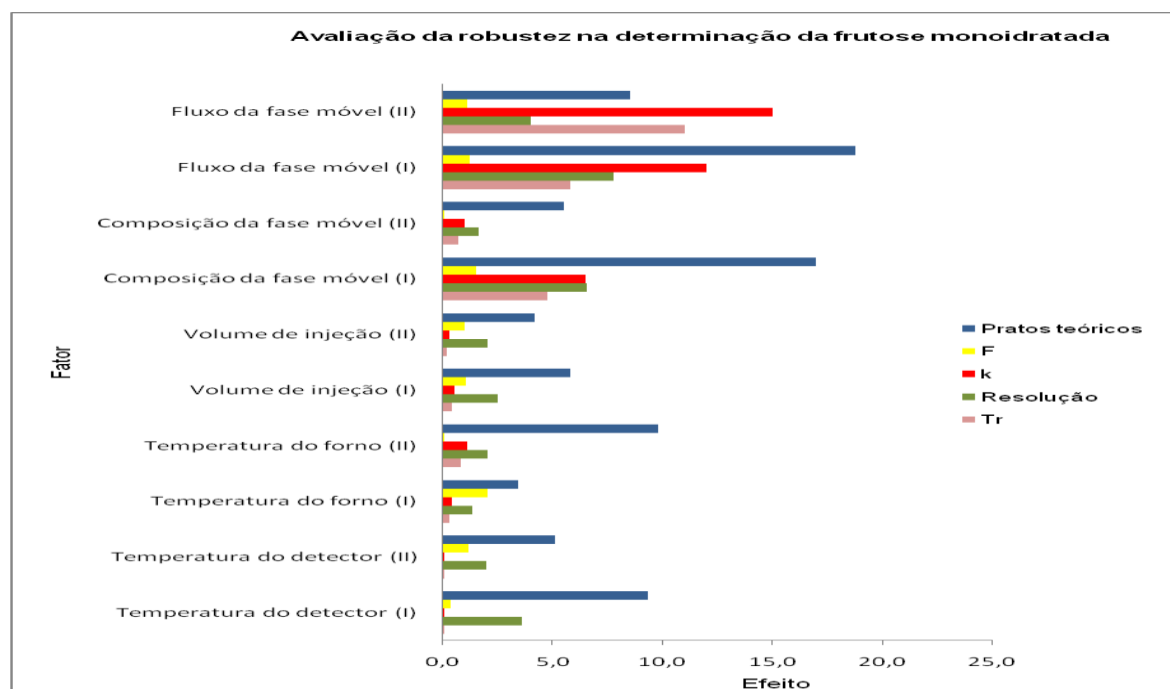
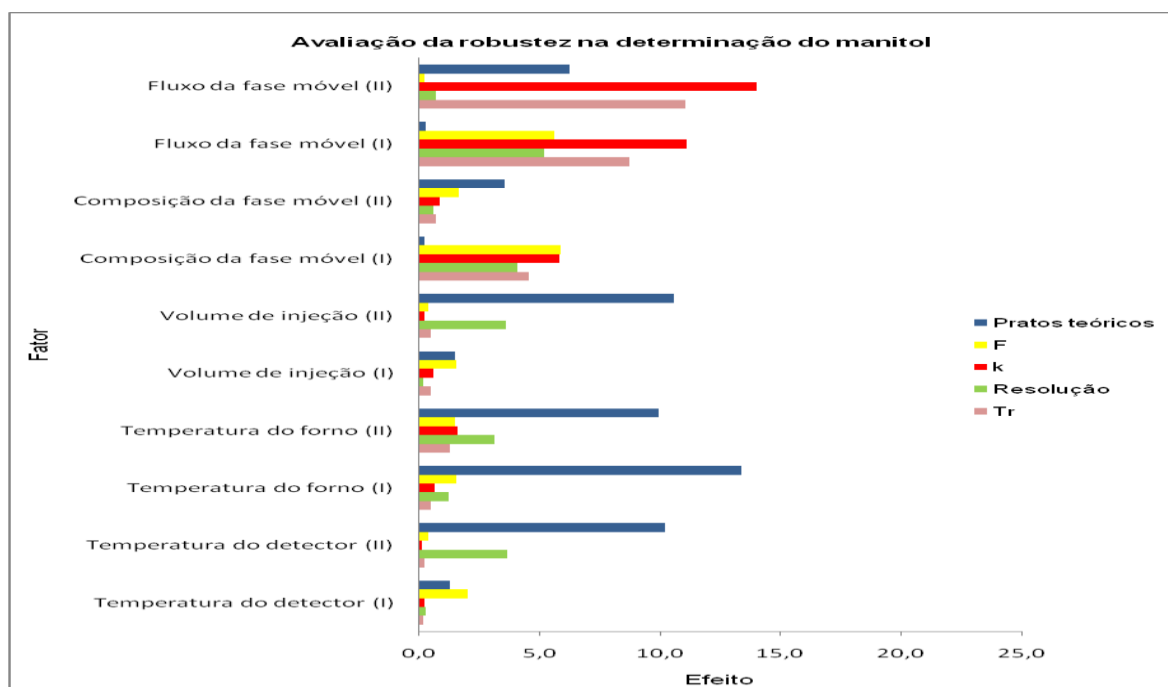


Tabela 43 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de manitol.

Fator	Nível	Tr	Rs	k	F	N
Temperatura do detector	(I)	0,2	0,3	0,2	2,0	1,3
	(II)	0,2	3,7	0,1	0,4	10,2
Temperatura do forno	(I)	0,5	1,2	0,7	1,5	13,4
	(II)	1,3	3,1	1,6	1,5	10,0
Volume de injeção	(I)	0,5	0,2	0,6	1,5	1,5
	(II)	0,5	3,6	0,2	0,4	10,5
Composição da fase móvel	(I)	4,6	4,1	5,8	5,9	0,2
	(II)	0,7	0,6	0,8	1,6	3,5
Fluxo da fase móvel	(II)	8,7	5,2	11,1	5,6	0,3
	(I)	11,0	0,7	14,0	0,2	6,2

Figura 25 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de manitol.



Os resultados demonstraram que o número de pratos teóricos foi o parâmetro de adequação que apresentou maior alteração, verificado pela variabilidade dos resultados em todas as combinações e pelos efeitos nas determinações dos analitos. Além disso, o fator de retenção ( $k$ ), na determinação de frutose e manitol, se apresentou sob forte influência da variação do fluxo de fase móvel e, na determinação de glicose, da variação do fluxo e da composição de fase móvel.

O fluxo de fase móvel foi o fator que demonstrou maior efeito nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico sendo seguido do fator composição da fase móvel (presença de componente orgânico). Os demais fatores, temperatura do detector, temperatura do forno e volume de injeção, apresentaram baixa variabilidade nas respostas obtidas para os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico.

Segundo Barbosa (2009) a aceitabilidade dos parâmetros de adequação comprova que as mudanças promovidas não podem ocasionar variações significativas com relação aos parâmetros de adequação do sistema avaliados (tempo de retenção, resolução, fator de retenção, fator de assimetria, e número de

pratos teóricos). Os valores baixos de DPR comprovaram que o método é robusto a pequenas variações nas condições analíticas avaliadas mantendo sua exatidão e precisão, e garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos (REIS, 2006; TEIXEIRA, 2008).

## 5 - CONCLUSÃO

As informações disponibilizadas no SGA e no banco de dados da Anvisa permitiram observar a incidência de amostras de bolsas de sangue e os maiores detentores de registro desses produtos sendo escolhida a solução preservadora SAG-M1 como solução principal de trabalho.

O método avaliado demonstrou separação cromatográfica eficiente comprovada pelos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico e resposta linear satisfatória na faixa de concentração compreendida entre 0,6 e 3,6 mg/mL para a glicose, 0,02 e 0,60 mg/mL para a frutose e 0,40 e 0,90 mg/mL para o manitol.

A otimização das condições analíticas do método através da variação do fluxo de fase móvel e da temperatura do forno permitiu a avaliação da influência dessas variáveis nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, indicando o fluxo de 0,5 mL/minuto e a temperatura de 80°C como favoráveis para o desempenho do método.

A qualificação dos padrões secundários possibilitou a redução do custo analítico de validação comprovando as especificações declaradas pelo fornecedor e contribuindo, também, para as análises de rotina. Além disso, a avaliação da estabilidade dos analitos na solução-padrão e na solução-amostra permitiu garantir a integridade dos analitos na amostra caracterizada pela pequena variabilidade na área do sinal cromatográfico e ausência de produtos de degradação.

Na validação analítica, a comparação das matrizes no parâmetro de seletividade comprovou a formação da frutose a partir da glicose após a etapa de autoclavação, assim como a formação do produto de degradação 5-hidroximetilfurfural em tempo de retenção (aproximadamente 40 minutos) distinto dos analitos analisados nas mesmas condições. A avaliação do efeito matriz através da verificação da homocedasticidade das curvas, através do teste F, indicou variâncias homogêneas para todos os analitos e soluções, exceto para a avaliação do analito glicose na solução anticoagulante ACD-A que se apresentou heterogênea. A comparação entre as inclinações das duas curvas pelo teste t revelou que o método não sofre efeito de matriz para nenhum dos analitos em nenhuma das soluções.

O parâmetro da linearidade apresentou coeficientes de correlação superiores aos valores recomendados pela Anvisa e pelo Inmetro para os intervalos de concentração de 2,1 a 3,3 mg/mL para a glicose, 0,010 a 0,448 mg/mL para a frutose e 0,90 a 1,80 mg/mL para o manitol. O estudo estatístico dos resultados revelou a inexistência da tendência nos resíduos confirmando a adequação do modelo testado. Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método dos mínimos quadrados.

A repetitividade e a precisão intermediária indicaram valores de DPR satisfatórios em relação aos recomendados pela Anvisa e Inmetro variando entre 1,04% e 2,57% na repetitividade e 0,86% e 2,71% na precisão intermediária, respectivamente.

A exatidão foi avaliada através da recuperação média sendo determinada em todos os níveis de concentração das curvas analíticas estabelecidas, obtendo-se a recuperação de 98,8% para o analito glicose, 94,7% para o analito frutose e 104,8% para o analito manitol.

A robustez do método foi avaliada através da adaptação do método de Youden, pelas variações de cinco condições analíticas denominadas de fatores, indicando que o número de pratos teóricos e o fator de retenção foram os parâmetros de adequação que apresentaram as maiores alterações. Na avaliação dos efeitos dos fatores, o fluxo e a composição de fase móvel apresentaram os efeitos mais significativos.

Este estudo contribuiu para a revisão da legislação vigente apresentando-se em Consulta Pública nº 65/2011. E, ressalta ainda, a importância da validação analítica para assegurar a qualidade não só de bolsas de sangue, mas também de produtos de âmbito sanitário, principalmente, disponibilizados pelo Ministério da Saúde, garantindo produtos seguros e eficazes à população brasileira.



## 6 - REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR ISO 3826-1**: Bolsas plásticas para acondicionamento de sangue humano e seus componentes. Rio de Janeiro, 2003.

\_\_\_\_\_. **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

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) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

AGUIAR, F. A. **Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil in vitro de dissolução e no efeito farmacológico**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

ALBERT, A. L. M. **Curso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2001. Apostila de aula.

ALMEIDA, E. V. **Desenvolvimento e validação de metodologia para radiofármacos de Tecnécio-99m empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2009. 150 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

ANDRADE, M. V. A. S. *et al.* Análise de Hidroximetilfurfural em soros anticoagulantes. In: Congresso Brasileiro de Química, 46, 2006. Salvador. **[Anais]** Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2006/trabalhos2006/4/815-993-4-T1.htm>>. Acesso em: 4 maio 2009.

ANTICOAGULANT and preservative solutions for human blood. In: European Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2011a.

ANTICOAGULANT Citrate Dextrose Solution. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopoeial, 2011b.

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

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

ANVISA. **Apresentação**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/portal/Anvisa/agencia.htm>> Acesso em: 08 mai. 2010a.

\_\_\_\_\_. **História da Vigilância Sanitária**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/institucional/historia.htm>>. Acesso em 04 abr. de 2010b.

\_\_\_\_\_. **Manual de Tecnovigilância: Abordagens de vigilância sanitária de produtos para a saúde comercializados no Brasil**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2010c. 629 p.

\_\_\_\_\_. **Notícias da Anvisa**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2006/090506.htm>>. Acesso em 04 abr. de 2010d.

\_\_\_\_\_. **Notificação de Ocorrências Associadas a Produtos para a Saúde**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sistec/alerta/RelatorioAlerta.asp>>. Acesso em 04 mai. de 2009.

\_\_\_\_\_. **Produto para Saúde**. Brasília, 2010. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/ANVISA/servicos.htm>>. Acesso em 08 mai. 2010e.

\_\_\_\_\_. **Consulta de produtos**. Brasília, 2011. Disponível em <[http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto\\_correlato/rconsulta](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta)>. Acesso em 30 fev. 2011.

AQUINO, *et al.* Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. **Revista Ciência Tecnológica Alimentícia**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 32-38, 2004.

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.

BARBOSA, E. A. **Desenvolvimento e validação de método empregando cromatografia líquida de alta eficiência comparativamente a um doseamento microbiológico.** 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BARROS C. B., Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BENETTI, F. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de multiresíduo de glicosato e AMPA via CG-EM em amostras ambientais.** 2011. 114 f. Tese (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BERTOLETTI, C. F. **Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M.** 2011. 42 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BONFIM, M.V.J.; ABRANTES, S.M.P.; ZAMITH, H.P.S. Validação de método analítico para determinar a migração de s-caprolactama das embalagens para alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1114-1118, 2010.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set. 1976.

\_\_\_\_\_. Decreto n.º 79094, de 5 de janeiro de 1977a. 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, DF, 5 jan. 1977a.

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

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

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

\_\_\_\_\_. 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**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 nov. de 1998.

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

\_\_\_\_\_. Resolução nº 9, de 21 de outubro de 1999. Regulamento Técnico para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Bolsas de Sangue e Anexos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 22 Out 1999b.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 59, de 27 de junho de 2000. Regulamento Técnico que estabelece as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos. **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Brasília, 24 Out. 2000.

\_\_\_\_\_. Decreto nº 3.961, de 10 de outubro de 2001. Altera o Decreto nº 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamenta a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 out. 2001a.

\_\_\_\_\_. 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. **Diário Oficial da União**: Poder Executivo, Brasília, 24 Out. 2001b.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente**. Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003

BUENO, E. **À Sua Saúde**: a Vigilância Sanitária na história do Brasil. 1 ed. Brasília: Editora Anvisa, 2005.

CARDOSO, M. H. W. M. et.al. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, Supl.1, p. 63-72, mai 2010

CENPES. **Monografias de Química Analítica: Técnicas Instrumentais de Química Analítica Orgânica**. Rio de Janeiro, 1985. 338p.

CHROMATOGRAPHY. In: Internacional Pharmacopoeia. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 2008.

CHROMATOGRAPHY. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

CROMATOGRAFIA. In: FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005

CROMATOGRAFIA. In: FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2011

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

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. **Conhecendo a Vigilância Sanitária**. Disponível em: <[http://ibict.metodista.br/tedeSimplificado/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo1437](http://ibict.metodista.br/tedeSimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo1437)>. Acesso em: 01 abr. 2010.

COSTA JÚNIOR, J. D. **Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CDP/SAG-M**. 2006. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DAVID, D. B. **O papel do 2,3-DPG no metabolismo das hemácias**. 2009. In: Seminário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFGS, 2009. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/ensino\\_bioquimica.php](http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/ensino_bioquimica.php)>. Acesso em: 28 abr. 2010

DEXTROSE. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FOLHA ON LINE. **Brasil inutiliza 260 mil bolsas de sangue por falha em estocagem**. São Paulo, 2010. Disponível em : <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u460128.shtml>>. Acesso em: 08 mai. de 2010.

FONTES, C. P. M. L. **Produção do manitol a partir da fermentação do suco de caju utilizando bactérias lácticas heterofermentativas**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia de Alimentos – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FRUCTOSE. In: The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals. 14. ed. Whitehouse Station. NJ. U. S. A. 2006. P. 4273-4274.

FRUCTOSE. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO. **O que é sangue?** São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.prosangue.sp.gov.br/prosangue/actioncuriosidades.do?acao=curiosidadeE>>. Acesso em: 08 mai 2010.

FUST, A. M. B. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para dosagem de adenina em bolsa de sangue** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

GARCIA, P. L. **Desenvolvimento, validação e comparação de métodos para determinação de bloqueadores neuromusculares derivados de esteróides**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GLUCOSE. In: The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals. 14. ed. Whitehouse Station. NJ. U. S. A. 2006. P. 4459-4460.

GRAEF, L. E. **Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha**. 92 f. : Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

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

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies. **Pure Appl. Chem.**, v.67, p. 331-343, 1995.

HIENE, M. A. C. **Análise químico-farmacêutica de azumoleno sódico.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

HUBER, L. **Validação de Métodos Analíticos e Procedimentos.** Disponível em <[http://www.labcompliance.com/methods/meth\\_val.htm](http://www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm)>. Acesso em 04 out. de 2010.

ICH. **Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: text and methodology.** Geneva, 2005.

INCQS. **Análises.** Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=65&Itemid=62](http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=65&Itemid=62)>. Acesso em: 04 mai. 2010b.

\_\_\_\_\_. **Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear.** POP nº 65.3120.126. rev.1. Rio de Janeiro, 2009.

\_\_\_\_\_. **GT/AIS - Grupo Técnico de Artigos e Insumos de Saúde Grupo Técnico de Artigos e Insumos de Saúde.** Disponível em: <[http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=83&Itemid=91](http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=83&Itemid=91)>. Acesso em: 04 mai. 2010a.

INMETRO. **Guia Eurachem: Determinando a Incerteza na Medição Analítica.** Rio de Janeiro, 2002.

\_\_\_\_\_. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos:** manual de orientação. Rio de Janeiro, 2007.

\_\_\_\_\_. **Orientações sobre validação de métodos analíticos:** documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro, 2010.

ÍON Chromatography. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

JUNIOR, W. E. F. Carboidratos: Estrutura, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v.29, n. 8, p. 8-13, 2008.

LEE, R., et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p.196-217, 1999.

LEHNINGER, A. L. et al. **Princípios da Bioquímica**. 5 ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2011. 1274 p.

LEITÃO, D.P.S. et al. **Desenvolvimento e padronização de método cromatográfico para análise de carboidratos e polóis em produtos farmacêuticos**. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0109/index.html> em 17/03/2009

LIQUID chromatography. In: European Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008.

LOWEN, T. C. R. **Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de Lamivudina e do Ensaio Limite do Enantiômero(+)-BCH-189 em Comprimidos de Lamivudina**. 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

MAMANI, M. C. V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MANNITOL. In: The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals. 14. ed. Whitehouse Station. NJ. U. S. A. 2006. P. 5743.

MANNITOL. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

MILLER, J. C.. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5 ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2005. 285 p.



OMS. **Estruturação da rede Núcleos de análise de informação em saúde com ênfase em vigilância sanitária.** Disponível em: [http://new.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&task=view&id=182&Itemid=610&limit=1&limitstart=10](http://new.paho.org/bra/index.php?option=com_content&task=view&id=182&Itemid=610&limit=1&limitstart=10)>. Acesso em: 14 abr. 2010.

REIS, P. B., **Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto.** 2006. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

RIBANI M. **Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. SP. 2004a.

\_\_\_\_\_. **Obtenção e aplicação de isoflavonas de soja.** 133 f. 2008. Tese (Doutorado)- Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, jan. 2008.

SANTOS, A. F. *et al.* Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos par análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. **Enciclopédia Química**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 13-20, 2006.

SANTOS A. F. **Ação de desferoxamina e deferiprona em eritrócitos de portadores de  $\beta$ -talassemias submetidos a sobrecarga oxidativa de terc-butilhidroperóxido, in vitro.** 2008. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SECCHI, P. **Bioquímica dos conservantes sanguíneos.** 2010. In: Seminário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010. Disponível em: < [http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/conservantes\\_secchi.pdf](http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/conservantes_secchi.pdf)>. Acesso em: 28 abr. 2010

SHODEX. **Effect of Flow Rate (SC1011)**. Disponível em <<http://www.shodex.com/english/dc030255.html>>. Acesso em: 11 mai. 2011a.

SHODEX. **Effect of temperature (1)**. Disponível em <<http://www.shodex.com/english/dc030256.html>>. Acesso em: 11 mai. 2011b.

SILVA, S. M. **Padronização e validação do método extração sortida em barra de agitação e cromatografia líquida de alta eficiência (SBSE/HPLC) para a determinação de antidepressivos em amostras de plasma**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SILVA, J. M. C. L. et al. Validação de método de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de ampicilina em injetáveis utilizados em hospitais públicos de Recife, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 8, p. 72-78, 2010.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. São Paulo: Boohman, 2002. 836 p.

SOLUÇÃO anticoagulante citrato e glicose. In: FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005a.

SOLUÇÃO anticoagulante citrato, fosfato e glicose. In: FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005b

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

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

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.

TEMPLETON, H. X. A. C. *et al.* Quantification of 5-HMF and dextrose in commercial aqueous dextrose solutions. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, West Point, USA, v. 32. p. 451-459, 2003.

VALE, R. F. D. **Avaliação das metodologias preconizadas no controle de qualidade físico-químico de bolsas de sangue.** 2009. 66 f. Dissertação (Especialização) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

VALIDATION of compendia procedures. In: UNITED States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

VOGEL, A. J. *et al.* **Análise química quantitativa.** 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2002.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

WHOLE Blood. In: UNITED States Pharmacopoeia. 32. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

TOMCZAK, A. C. T. Q., *et al.* Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** São Paulo, 25 jun. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842010005000076>>. Acesso em: 27 nov. 2011.

## APÊNDICE A - DESCRIÇÃO DA PLANILHA DE AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ

Descrição da planilha de verificação do efeito matriz elaborada pelo Setor de Alimentos e Contaminantes do INCQS/FIOCRUZ.

Esta planilha apresenta como condição preliminar a adequação ao modelo linear seguindo para avaliação baseada na estatística do teste F (Snedecor) e do teste t (Student) compreendendo as etapas abaixo:

### 1) Preparo das curvas analíticas

Avaliação: As curvas analíticas com concentrações idênticas ou na mesma faixa de concentração avaliadas nas condições analíticas normais em curto período de tempo.

- Curva-solvente: Preparo da curva analítica pela adição do analito no solvente
- Curva-matriz: Preparo de curva analítica utilizando materiais de referência ou pela adição do analito em amostras brancas (matrizes isentas do analito) ou diretamente na matriz.

### 2) Avaliação da linearidade

Objetivo: Verificar as premissas de normalidade dos resíduos da regressão e adequação ao modelo linear

Avaliação: Planilha desenvolvida por Souza & Junqueira (2005) descrita no APÊNDICE B

Características: Esta avaliação é realizada devido a exigência da avaliação de comparações das inclinações e interseções pelo teste t. Na presença de modelo não lineares, métodos estatísticos complexos devem ser realizados podendo ser realizada também a avaliação visual.

### 3) Avaliação da Homocedasticidade dos resíduos

Objetivo: Verificar a homocedasticidade das variâncias dos resíduos da regressão das duas curvas através do teste F (Snedecor).

Avaliação: Utilização das equações 16 e 17 para estabelecer a razão entre as variâncias F, sendo a maior variância no numerador e a menor no denominador.

$$F_{\text{crítico}} = F_{(1-\alpha/2; n1-2; n2-2)}$$

Equação 16 – Determinação do valor de  $F_{\text{crítico}}$ .

$$F_{\text{calc}} = s_1^2 / s_2^2$$

Equação 17 – Determinação do valor de  $F_{\text{calculado}}$ .

Sendo:

$s_1^2$  e  $s_2^2$  = estimativas do desvio padrão residual das curvas 1 e 2

Admitindo:

$F_{\text{calc}} > F_{\text{crítico}}$  – variâncias heterocedásticas

$F_{\text{calc}} < F_{\text{crítico}}$  – variâncias homocedásticas

Características: Adotar um nível de significância  $\alpha = 0,05$  (5%) ou nível de confiança  $1 - \alpha = 0,95$  (95%)

### 4) Comparação das inclinações e interseções

Objetivo: Comparar as inclinações e interseções através do teste t (Student).

Avaliação: Utilizar o teste t com variâncias combinadas pelas equações 18, 19, 20, 21 e 22 para variâncias homogêneas e o teste t com variâncias distintas (variâncias de cada curva) pelas equações 23, 24, 25 e 26 para variâncias heterogêneas.

- Variâncias homogêneas

$$t_{\text{crítico}} = t_{(1-\alpha/2; n1+n2-4)}$$

Equação 18 – Determinação do valor de  $t_{\text{crítico}}$  para variâncias homogêneas.

$$t_a = (a_1 - a_2) / \sqrt{((s_p^2 \sum x_1^2) / n_1 Sxx_1) + (s_p^2 \sum x_2^2) / n_2 Sxx_2)}$$

Equação 19 – Determinação do valor de  $t_{\text{linear}}$  para variâncias homogêneas.

$$t_b = (b_1 - b_2) / \sqrt{((s_p^2 / Sxx_1) + (s_p^2 / Sxx_2))}$$

Equação 20 – Determinação do valor de  $t_{\text{angular}}$  para variâncias homogêneas.

$$s_p^2 = ((n_1 - 2)s_{\text{res1}}^2 + (n_2 - 2)s_{\text{res2}}^2) / n_1 + n_2 - 4$$

Equação 21 – Determinação do desvio padrão residual agregado para variâncias homogêneas.

$$Sxx_n = \sum (x_n - x_m)^2$$

Equação 22 – Determinação do desvio padrão das curvas solvente e matriz.

Admitindo:

$t_a, t_b > t_{\text{crítico}}$  – inclinações e interseções diferentes

$t_a, t_b < t_{\text{crítico}}$  – inclinações e interseções idênticas

- Variâncias heterogêneas

$$t_{\text{crítico}} = t_{(1-\alpha/2;v)}$$

Equação 23 – Determinação do valor de  $t_{\text{crítico}}$  para variâncias heterogêneas.

$$t_a' = (a_1 - a_2) / \sqrt{((s_p^2 \sum x_1^2) / n_1 Sxx_1) + (s_p^2 \sum x_2^2) / n_2 Sxx_2)}$$

Equação 24 – Determinação do valor de  $t_{\text{linear}}$  para variâncias heterogêneas.

$$t_b' = (b_1 - b_2) / \sqrt{((s_{\text{res}}^2 / Sxx_1) + (s_{\text{res}}^2 / Sxx_2))}$$

Equação 25 – Determinação do valor de  $t_{\text{angular}}$  para variâncias heterogêneas.

$$v = ((s_{\text{res1}}^2 / n_1) + (s_{\text{res2}}^2 / n_2)) / ((s_{\text{res1}}^2 / n_1)^2 / n_1 - 2) + ((s_{\text{res2}}^2 / n_2)^2 / n_2 - 2)$$

Equação 26 – Determinação do desvio padrão residual agregado para variâncias heterogêneas.

Admitindo:

$t_a', t_b' > t_{\text{crítico}}$  – inclinações e interseções diferentes

$t_a', t_b' < t_{\text{crítico}}$  – inclinações e interseções idênticas

Sendo:

Índices 1 e 2 = curvas do analito em solventes e em matriz

$a_1$  e  $a_2$  = coeficiente linear da curva 1 e 2

$b_1$  e  $b_2$  = coeficiente angular da curva 1 e 2

$s_p^2$  = estimativa do desvio padrão residual agregado das duas curvas

$x_n$  = concentração da curva-solvente ou curva-matriz no nível n

$x_m$  = média das concentrações da curva-solvente ou curva-matriz

$s_{\text{res}1}^2$  e  $s_{\text{res}2}^2$  = estimativas do desvio padrão residual das curvas 1 e 2

$t_a$  = Estatística t para comparação das inclinações das curvas solvente e matriz

$t_b$  = Estatística t para comparação das intersecções das curvas solvente e matriz

Características: Adotar um nível de significância  $\alpha = 0,05$  (5%) ou nível de confiança  $1 - \alpha = 0,95$  (95%). A verificação de inclinações e interseções idênticas indica que o único efeito matriz presente é a interferência natural ocasionada pelo nível básico do analito.

(INMETRO, 2007; SOUZA, 2007; CARDOSO, 2010).

## APÊNDICE B - DESCRIÇÃO DA PLANILHA DE AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE

Descrição da planilha de verificação da linearidade de curva analítica elaborada por Souza & Junqueira (2005).

Esta planilha baseia-se na avaliação 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 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  $\sigma^2$ .

## 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  $d_{\text{calc}} > d_U$  .

Os resíduo são dependentes  $d_{\text{calc}} < d_L$ .

Resultado inconclusivo:  $d_L < d_{\text{calc}} < d_U$ .

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 –  $t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ .

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  $t_L$ .

(AGUIAR, 2008; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; VALE, 1010).

**APÊNDICE C – DESCRIÇÃO DO MATERIAL CALIBRADO UTILIZADO NA  
VALIDAÇÃO ANALÍTICA**

<b>Material</b>	<b>Capacidade de volume</b>	<b>Ident.</b>	<b>Nº Registro</b>	<b>Erro</b>	<b>Incerteza calibração</b>
Balão volumétrico	25,00 mL	254	7250/2011	0,015 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1852	0309/2005	0,050 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1855	0316/2005	0,030 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1856	0312/2005	0,010 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1857	0323/2005	0,040 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1858	0310/2005	0,030 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1859	0315/2005	0,030 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	25,00 mL	1860	0313/2005	0,050 mL	0,05 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2886	1461/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2887	1462/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2888	1463/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2889	1476/2007	0,00 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2891	1465/2007	0,02 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2892	1477/2007	0,00 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2894	1466/2007	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2896	1475/2007	0,00 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2897	1468/2007	0,00 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2898	1474/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2900	1478/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	2903	1481/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3212	1836/2007	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3213	1822/2007	0,02 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3214	1837/2007	0,04 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3215	1838/2007	0,02 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3216	1823/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3217	1821/2007	0,01 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3218	1824/2007	0,04 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3219	1825/2007	0,02 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3220	1839/2007	0,06 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3221	1826/2007	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3222	1840/2007	0,02 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3223	1841/2007	0,04 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3224	1842/2007	0,05 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3225	1843/2007	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	3226	1827/2007	0,02 mL	0,10 mL

<b>Material</b>	<b>Capacidade de volume</b>	<b>Ident.</b>	<b>Nº Registro</b>	<b>Erro</b>	<b>Incerteza calibração</b>
Balão volumétrico	50,00 mL	3227	1844/2007	0,04 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	4490	4371/2010	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	50,00 mL	4491	4372/2010	0,03 mL	0,10 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3191	1803/2007	0,13 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3192	1804/2007	0,12 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3193	1805/2007	0,10 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3194	1806/2007	0,13 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3195	1807/2007	0,13 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3196	1808/2007	0,14 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3197	1809/2007	0,13 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3199	1811/2007	0,12 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3200	1812/2007	0,13 mL	0,20 mL
Balão volumétrico	100,00 mL	3325	2035/2008	0,11 mL	0,20 mL
Pipeta eppendorf	0,1-1,0 mL	2666	6547/2011	0-1 uL	1 uL
Pipeta eppendorf	0,5 -5,0 mL	2665	7018/2011	4-8 uL	1-3 uL
Pipeta eppendorf	1,0-10,0 mL	3972	4975/2011	0-10 uL	100 uL
Pipeta volumétrica	5,00 mL	3908	3131/2009	0,04 mL	0,03 mL
Pipeta volumétrica	10,00 mL	2791	1370/2007	0,02 mL	0,02 mL
Pipeta volumétrica	15,00 mL	2936	1511/2007	0,02 mL	0,03 mL

**APÊNDICE D – RESULTADOS DA QUALIFICAÇÃO DO PADRÃO SECUNDÁRIO  
SIGMA- ALDRICH UTILIZADO NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA**

Curva dos Padrões de Glicose						
Códigos	C01	C02	C03	Média	conc.(mg/mL)	pesada (mg)
SGFM03062011A	663730	663739	663432	663633,7	2,01600	50,4
SGFM03062011B	717372	717322	717433	717375,7	2,16800	54,2
SGFM03062011C	785641	785854	786033	785842,7	2,38000	59,5
SGFM03062011D	856103	855656	855898	855885,7	2,59600	64,9
SGFM03062011E	922172	922366	922612	922383,3	2,79600	69,9
SGFM03062011F	996433	996388	996363	996394,7	3,01600	75,4
SGFM03062011G	1067918	1067820	1067589	1067775,7	3,21600	80,4

Regressão Linear	
Interseção	-7699,84
conc.(mg/mL)	333406,9

Análise de glicose em solução anticoagulante/preservadora						
Amostras		A	B	C	Média	Incerteza
Amostra	C01	943634	941779	941966		
	C02	942948	942200	941672		
	C03	943185	942417	942067		
	média	943255,7	942132	941901,67		
	conc.(mg/mL)	2,852237	2,848867	2,8481758	2,84976	0,005394406

Curva dos Padrões de Frutose						
Códigos	C01	C02	C03	Média	conc. (mg/mL)	pesada (mg)
SGFM03062011A	31649	31770	31785	31734,7	0,10000	62,5
SGFM03062011B	47450	47570	47438	47486,0	0,15000	
SGFM03062011C	63507	63517	63589	63537,7	0,20000	
SGFM03062011D	79697	79660	79801	79719,3	0,25000	
SGFM03062011E	95650	95696	95654	95666,7	0,30000	
SGFM03062011F	112626	112423	112613	112554,0	0,35000	
SGFM03062011G	128450	128414	128596	128486,7	0,40000	

Regressão Linear	
Interseção	-1348,7
conc.(mg/mL)	324571,2

Análise de frutose em solução anticoagulante/preservadora						
Amostras		A	B	C	Média	Incerteza
Amostra	C01	103986	102234	102557		
	C02	103866	102275	102622		
	C03	103926	102594	102913		
	média	103926	102367,7	102697,33		
	conc.(mg/mL)	0,32435	0,319549	0,3205646	0,321488	0,006281638

Curva dos Padrões de Manitol						
Códigos	C01	C02	C03	Média	conc.(mg/mL)	pesada (mg)
SGFM07062011A	131896	132045	132020	131987,0	0,40096	125,3
SGFM07062011B	148329	148518	148520	148455,7	0,45108	
SGFM07062011C	165134	165273	165103	165170,0	0,50120	
SGFM07062011D	181372	181551	181559	181494,0	0,55132	
SGFM07062011E	198206	198040	197946	198064,0	0,60144	
SGFM07062011F	215429	215629	215520	215526,0	0,65156	
SGFM07062011G	232133	231901	231987	232007,0	0,70168	

Regressão Linear	
Interseção	-2224,52
conc.(mg/mL)	333710,3

Análise de manitol em solução anticoagulante/preservadora						
Amostras		A	B	C	Média	Incerteza
Amostra	C01	168146	169581	168111		
	C02	168116	169382	168223		
	C03	168092	169307	168271		
	média	168118	169423	168202		
	conc.(mg/mL)	0,510450	0,514362	0,510701	0,511838	0,005435828

## APÊNDICE E – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ DAS SOLUÇÕES ANTICOAGULANTES CPDA, CPD, ACD-A E DA SOLUÇÃO PRESERVADORA SAG-M1 NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Efeito Matriz		Avaliação do efeito matriz para o analito glicose na solução anticoagulante CPDA							
<b>Curva com Solvente</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)		
S1	2,09	704724	701474,5238	3249,47619	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Solv	47536412,56	
S2	2,09	695898	701474,5238	-576,52381	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Matriz	970589,5739	
S3	2,09	694283	701474,5238	-7191,52381	0,356551578	4,3677568	GL (n1 + n2) - 4	36	
S1	2,29	773344	767230,6667	6113,33333	0,158467368	5,2393274	F (1,2/2,9)	2,24	
S2	2,29	779803	767230,6667	12572,33333	0,158467368	5,2393274	Teste F	48,97684237	
S3	2,29	760842	767230,6667	-6388,66667	0,158467368	5,2393274			
S1	2,49	830651	832986,8095	-2335,80952	0,039616842	6,1901316			
S2	2,49	827621	832986,8095	-5365,80952	0,039616842	6,1901316			
S3	2,49	834910	832986,8095	1923,19048	0,039616842	6,1901316			
S1	2,69	904311	898742,9524	5568,04762	0	7,2201695	Estatísticas (Solvente)		
S2	2,69	899045	898742,9524	302,047619	0	7,2201695	Inclinação	330366,8053	
S3	2,69	894225	898742,9524	-4517,95238	0	7,2201695	Intercepção	11035,02381	
S1	2,89	962038	964499,0952	-2461,09524	0,039616842	8,329441	Sxx <sub>1</sub>	3,327814727	
S2	2,89	963481	964499,0952	-1018,09524	0,039616842	8,329441	s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	47536412,56	
S3	2,89	973949	964499,0952	9449,90476	0,039616842	8,329441	n <sub>1</sub>	21	
S1	3,09	1030752	1030255,238	496,761905	0,158467368	9,5179463	ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	154,9513732	
S2	3,09	1036449	1030255,238	6193,7619	0,158467368	9,5179463	X <sub>1,med</sub>	2,6870373	
S3	3,09	1026307	1030255,238	-3948,2381	0,158467368	9,5179463	Estatísticas (Matriz)		
S1	3,28	1105472	1096011,381	9460,61905	0,356551578	10,785685	Inclinação	335595,3878	
S2	3,28	1078945	1096011,381	-17066,381	0,356551578	10,785685	Intercepção	-8553,4397	
S3	3,28	1096552	1096011,381	540,619048	0,356551578	10,785685	Sxx <sub>2</sub>	3,284448885	
							s <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	970589,5739	
							n <sub>2</sub>	19	
							ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup>	138,5332801	
							X <sub>2,med</sub>	2,6680254	
<b>Curva com Matriz</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Avaliação		
S1	2,09	691157	692149,7284	-992,728443	0,336498607	4,3594951	s <sup>2</sup> p	25546996,15	
S2	2,09	693206	692149,7284	1056,27156	0,336498607	4,3594951	t <sub>h</sub>	1,369316846	
S3	2,09	690973	692149,7284	-1176,72844	0,336498607	4,3594951	t <sub>a</sub>	1,888793333	
S1	2,29	760559	759400,695	1158,30502	0,144166015	5,2364697	GL (n1 + n2) - 4	19,85592259	
S2	2,29	760587	759400,695	1186,30502	0,144166015	5,2364697	t (1-α/2, GL)	2,09	
S3	2,29	760433	759400,695	1032,30502	0,144166015	5,2364697			
S1	2,49	827755	826651,6615	1103,33848	0,032148131	6,1937591			
S2	2,49	825680	826651,6615	-971,661519	0,032148131	6,1937591			
S3	2,49	825137	826651,6615	-1514,66152	0,032148131	6,1937591			
S1	2,69	892990	893902,6281	-912,628057	0,000444957	7,2313631			
S2	2,69	893037	893902,6281	-865,628057	0,000444957	7,2313631			
S3	2,69	893356	893902,6281	-546,628057	0,000444957	7,2313631			
S1									
S2									
S3	2,89	962619	961153,5946	1465,40541	0,049056491	8,3492819			
S1	3,09	1027662	1028404,561	-742,561133	0,177982734	9,5475154			
S2	3,09	1028458	1028404,561	53,4388674	0,177982734	9,5475154			
S3	3,09	1028464	1028404,561	59,4388674	0,177982734	9,5475154			
S1	3,29	1095528	1095655,528	-127,527671	0,387223687	10,826064			
S2	3,29	1095375	1095655,528	-280,527671	0,387223687	10,826064			
S3	3,29	1096672	1095655,528	1016,47233	0,387223687	10,826064			

**Curva com Solvente**

Área vs. Conc. (mg/L)

$y = 330367x + 11035$   
 $R^2 = 0,9974$

**Curva com Matriz**

Área vs. Conc. (mg/L)

$y = 335595x - 8553,4$   
 $R^2 = 1$

**Efeito Matriz** Avaliação do efeito matriz para o analito frutose na solução anticoagulante CPDA

**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>
S1	0,010	3162	3599,507042	-437,507042	0,042887326	9,908E-05
S2	0,010	3027	3599,507042	-572,507042	0,042887326	9,908E-05
S3	0,010	3081	3599,507042	-518,507042	0,042887326	9,908E-05
S1	0,083	28455	26741,80282	1713,19718	0,018071022	0,0068257
S2	0,083	25469	26741,80282	-1272,80282	0,018071022	0,0068257
S3	0,083	26036	26741,80282	-705,802817	0,018071022	0,0068257
S1	0,155	55252	49884,09859	5367,90141	0,003814847	0,0241125
S2	0,155	52389	49884,09859	2504,90141	0,003814847	0,0241125
S3	0,155	49253	49884,09859	-631,098592	0,003814847	0,0241125
S1	0,228	73333	73026,39437	306,605634	0,000118801	0,0519594
S2	0,228	74383	73026,39437	1356,60563	0,000118801	0,0519594
S3	0,228	73993	73026,39437	966,605634	0,000118801	0,0519594
S1	0,301	91146	96168,69014	-5022,69014	0,006982886	0,0903665
S2	0,301	91689	96168,69014	-4479,69014	0,006982886	0,0903665
S3	0,301	90572	96168,69014	-5596,69014	0,006982886	0,0903665
S1	0,373	120592	119310,9859	1281,01408	0,024407099	0,1393337
S2	0,373	120479	119310,9859	1168,01408	0,024407099	0,1393337
S3	0,373	120702	119310,9859	1391,01408	0,024407099	0,1393337
S1	0,446	150021	142453,2817	7567,71831	0,052391442	0,198861
S2						
S3	0,446	138067	142453,2817	-4386,28169	0,052391442	0,198861

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S <sup>2</sup> res Solv	10645533,26
S <sup>2</sup> res Matriz	133872,8685
GL (n1+n2)-4	35
F <sub>(1-n1/2;GL)</sub>	2,26
Teste F	79,51972185

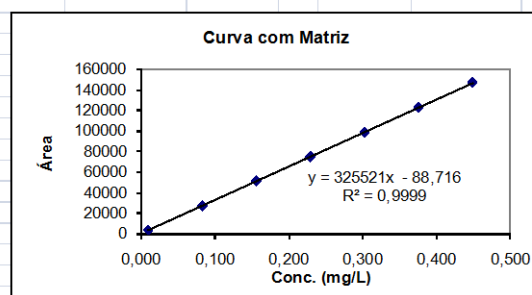
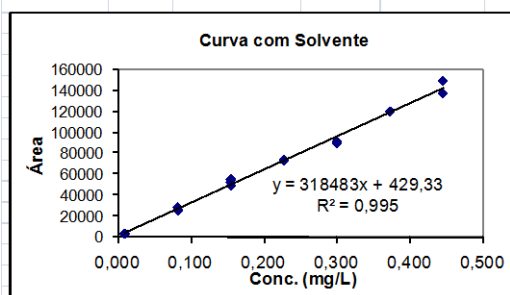
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	318483,411
Intercepção	429,3295389
Sxx <sub>1</sub>	0,393628827
s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	10645533,26
n <sub>1</sub>	20
ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1,335812784
X <sub>1,med</sub>	0,217046534

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	325521,2732
Intercepção	-88,71635651
Sxx <sub>2</sub>	0,395555437
s <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	133872,8685
n <sub>2</sub>	19
ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1,326729129
X <sub>2,med</sub>	0,221380084

**Curva com Matriz**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>
S1	0,009	3119	2983,813837	135,186163	0,044919108	8,909E-05
S2	0,009	3238	2983,813837	254,186163	0,044919108	8,909E-05
S3	0,009	3312	2983,813837	328,186163	0,044919108	8,909E-05
S1	0,083	26704	26817,20542	-113,205421	0,019244682	0,0068318
S2	0,083	26875	26817,20542	57,7945792	0,019244682	0,0068318
S3	0,083	26400	26817,20542	-417,205421	0,019244682	0,0068318
S1	0,156	50706	50650,597	55,4029957	0,004291445	0,0242958
S2						
S3	0,156	51017	50650,597	366,402996	0,004291445	0,0242958
S1	0,229	73772	74483,98859	-711,988588	0,000059	0,0524809
S2	0,229	74836	74483,98859	352,011412	0,000059	0,0524809
S3	0,229	74128	74483,98859	-355,988588	0,000059	0,0524809
S1	0,302	98027	98317,38017	-290,380171	0,006548538	0,0913872
S2	0,302	98004	98317,38017	-313,380171	0,006548538	0,0913872
S3	0,302	98498	98317,38017	180,619829	0,006548538	0,0913872
S1	0,376	121811	122150,7718	-339,771755	0,023758867	0,1410147
S2	0,376	121740	122150,7718	-410,771755	0,023758867	0,1410147
S3	0,376	122266	122150,7718	115,228245	0,023758867	0,1410147
S1	0,449	146601	145984,1633	616,836662	0,051690385	0,2013634
S2	0,449	146475	145984,1633	490,836662	0,051690385	0,2013634
S3						

Avaliação	
s <sup>2</sup> p	5539869,644
t <sub>h</sub>	1,344930765
t <sub>a</sub>	0,382954867
GL (n1+n2)-4	18,47627124
t <sub>(1-α/2;GL)</sub>	2,10





<b>Efeito Matriz</b>		<b>Avaliação do efeito matriz para o analito glicose na solução anticoagulante CPD</b>							
<b>Curva com Solvente</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)		
S1	2,09	704724	701474,5238	3249,47619	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Solv	47536412,56	
S2	2,09	695898	701474,5238	-5576,52381	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Matriz	12766716,22	
S3	2,09	694283	701474,5238	-7191,52381	0,356551578	4,3677568	GL (n1+n2)-4	38	
S1	2,29	773344	767230,6667	6113,33333	0,158467368	5,2393274	F (t1-t2/2 GL)	2,17	
S2	2,29	779803	767230,6667	12572,33333	0,158467368	5,2393274	Teste F	3,723464337	
S3	2,29	760842	767230,6667	-6388,66667	0,158467368	5,2393274			
S1	2,49	830651	832986,8095	-2335,80952	0,039616842	6,1901316			
S2	2,49	827621	832986,8095	-5365,80952	0,039616842	6,1901316			
S3	2,49	834910	832986,8095	1923,19048	0,039616842	6,1901316			
S1	2,69	904311	898742,9524	5568,04762	0	7,2201695	<b>Estatísticas (Solvente)</b>		
S2	2,69	899045	898742,9524	302,047619	0	7,2201695	Inclinação	330366,8053	
S3	2,69	894225	898742,9524	-4517,95238	0	7,2201695	Interceção	11035,02381	
S1	2,89	962038	964499,0952	-2461,09524	0,039616842	8,329441	Sxx <sub>1</sub>	3,327814727	
S2	2,89	963481	964499,0952	-1018,09524	0,039616842	8,329441	s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	47536412,56	
S3	2,89	973949	964499,0952	9449,90476	0,039616842	8,329441	n <sub>1</sub>	21	
S1	3,09	1030752	1030255,238	496,761905	0,158467368	9,5179463	ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	154,9513732	
S2	3,09	1036449	1030255,238	6193,7619	0,158467368	9,5179463	X <sub>1,med</sub>	2,6870373	
S3	3,09	1026307	1030255,238	-3948,2381	0,158467368	9,5179463	<b>Estatísticas (Matriz)</b>		
S1	3,28	1105472	1096011,381	9460,61905	0,356551578	10,785685	Inclinação	333459,7619	
S2	3,28	1078945	1096011,381	-17066,381	0,356551578	10,785685	Interceção	-12280,42619	
S3	3,28	1096552	1096011,381	540,619048	0,356551578	10,785685	Sxx <sub>2</sub>	3,36	
<b>Curva com Matriz</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	Avaliação		
S1	2,09	685659	684650,4762	1008,52381	0,36	4,3681	s <sup>2</sup> p	30151564,39	
S2	2,09	685385	684650,4762	734,52381	0,36	4,3681	t <sub>n</sub>	0,72731791	
S3	2,09	685207	684650,4762	556,52381	0,36	4,3681	t <sub>a</sub>	2,017893491	
S1	2,29	749072	751342,4286	-2270,42857	0,16	5,2441	GL (n1+n2)-4	28,51896313	
S2	2,29	760998	751342,4286	9655,57143	0,16	5,2441	t (t1-t2/2 GL)	2,05	
S3	2,29	748999	751342,4286	-2343,42857	0,16	5,2441			
S1	2,49	817094	818034,381	-940,380952	0,04	6,2001			
S2	2,49	818106	818034,381	71,6190476	0,04	6,2001			
S3	2,49	817771	818034,381	-263,380952	0,04	6,2001			
S1	2,69	881079	884726,3333	-3647,33333	0	7,2361			
S2	2,69	890042	884726,3333	5315,66667	0	7,2361			
S3	2,69	876869	884726,3333	-7857,33333	0	7,2361			
S1	2,89	949158	951418,2857	-2260,28571	0,04	8,3521			
S2	2,89	948160	951418,2857	-3258,28571	0,04	8,3521			
S3	2,89	948492	951418,2857	-2926,28571	0,04	8,3521			
S1	3,09	1018857	1018110,238	746,761905	0,16	9,5481			
S2	3,09	1018766	1018110,238	655,761905	0,16	9,5481			
S3	3,09	1017687	1018110,238	-423,238095	0,16	9,5481			
S1	3,29	1087493	1084802,19	2690,80952	0,36	10,8241			
S2	3,29	1086362	1084802,19	1559,80952	0,36	10,8241			
S3	3,29	1087997	1084802,19	3194,80952	0,36	10,8241			

**Curva com Solvente**

Área

Conc. (mg/L)

$y = 330367x + 11035$   
 $R^2 = 0,9974$

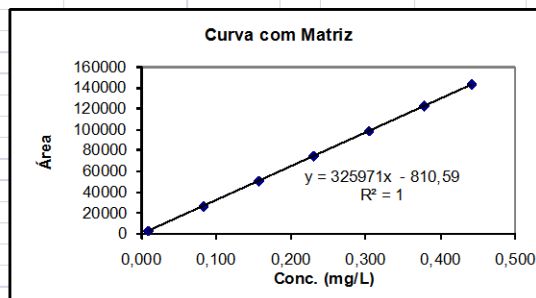
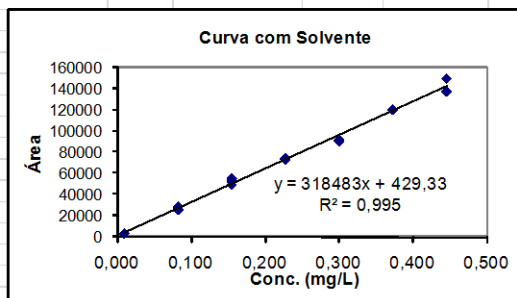
**Curva com Matriz**

Área

Conc. (mg/L)

$y = 333460x - 12280$   
 $R^2 = 0,9993$

<b>Efeito Matriz</b>		<b>Avaliação do efeito matriz para o analito fufose na solução anticoagulante CPD</b>						
<b>Curva com Solvente</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	<b>Homoceadasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)</b> S <sup>2</sup> res Solv <b>10645533,26</b> S <sup>2</sup> res Matriz <b>51105,64014</b> GL (n1 + n2) - 4 <b>35</b> F (1-α/2; GL) <b>2,26</b> Teste F <b>208,3044696</b>  <b>Estadísticas (Solvente)</b> Inclinação <b>318483,411</b> Intercepção <b>429,3295389</b> Sxx <sub>1</sub> <b>0,393628827</b> s <sup>2</sup> res <sub>1</sub> <b>10645533,26</b> n <sub>1</sub> <b>20</b> ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup> <b>1,335812784</b> X <sub>1,med</sub> <b>0,217046534</b>  <b>Estadísticas (Matriz)</b> Inclinação <b>325970,539</b> Intercepção <b>-810,5864992</b> Sxx <sub>2</sub> <b>0,365197505</b> s <sup>2</sup> res <sub>2</sub> <b>51105,64014</b> n <sub>2</sub> <b>19</b> ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup> <b>1,537079199</b> X <sub>2,med</sub> <b>0,248350526</b>  <b>Avaliação</b> s <sup>2</sup> p <b>5499668,418</b> t <sub>n</sub> <b>1,435999483</b> t <sub>α</sub> <b>0,919681632</b> GL (n1 + n2) - 4 <b>18,18188798</b> t (1-α/2; GL) <b>2,10</b>	
S1	0,010	3162	3599,507042	-437,507042	0,042887326	9,908E-05		
S2	0,010	3027	3599,507042	-572,507042	0,042887326	9,908E-05		
S3	0,010	3081	3599,507042	-518,507042	0,042887326	9,908E-05		
S1	0,083	28455	26741,80282	1713,19718	0,018071022	0,0068257		
S2	0,083	25469	26741,80282	-1272,80282	0,018071022	0,0068257		
S3	0,083	26036	26741,80282	-705,802817	0,018071022	0,0068257		
S1	0,155	55252	49884,09859	5367,90141	0,003814847	0,0241125		
S2	0,155	52389	49884,09859	2504,90141	0,003814847	0,0241125		
S3	0,155	49253	49884,09859	-631,098592	0,003814847	0,0241125		
S1	0,228	73333	73026,39437	306,605634	0,000118801	0,0519594		
S2	0,228	74383	73026,39437	1356,60563	0,000118801	0,0519594		
S3	0,228	73993	73026,39437	966,605634	0,000118801	0,0519594		
S1	0,301	91146	96168,69014	-5022,69014	0,006982886	0,0903665		
S2	0,301	91689	96168,69014	-4479,69014	0,006982886	0,0903665		
S3	0,301	90572	96168,69014	-5596,69014	0,006982886	0,0903665		
S1	0,373	120592	119310,9859	1281,01408	0,024407099	0,1393337		
S2	0,373	120479	119310,9859	1168,01408	0,024407099	0,1393337		
S3	0,373	120702	119310,9859	1391,01408	0,024407099	0,1393337		
S1	0,446	150021	142453,2817	7567,71831	0,052391442	0,198861		
S2								
S3	0,446	138067	142453,2817	-4386,28169	0,052391442	0,198861		
<b>Curva com Matriz</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>		
S1								
S2	0,010	2780	2413,262131	366,737869	0,056863423	9,781E-05		
S3	0,010	2769	2413,262131	355,737869	0,056863423	9,781E-05		
S1	0,083	26086	26391,65498	-305,654979	0,027192184	0,0069639		
S2								
S3	0,083	26042	26391,65498	-349,654979	0,027192184	0,0069639		
S1	0,157	50410	50373,30753	36,6924678	0,008341265	0,0246553		
S2	0,157	50318	50373,30753	-55,3075322	0,008341265	0,0246553		
S3	0,157	50194	50373,30753	-179,307532	0,008341265	0,0246553		
S1	0,231	74431	74351,70038	79,2996201	0,000316	0,0531671		
S2	0,231	74103	74351,70038	-248,70038	0,000316	0,0531671		
S3	0,231	74459	74351,70038	107,29962	0,000316	0,0531671		
S1	0,304	98215	98333,35293	-118,352933	0,003113581	0,0925072		
S2	0,304	98332	98333,35293	-1,35293294	0,003113581	0,0925072		
S3	0,304	98319	98333,35293	-14,3529329	0,003113581	0,0925072		
S1	0,378	122462	122311,7458	150,254219	0,016733873	0,1426648		
S2	0,378	122151	122311,7458	-160,745781	0,016733873	0,1426648		
S3	0,378	122488	122311,7458	176,254219	0,016733873	0,1426648		
S1	0,441	143114	143007,6153	106,384699	0,03719092	0,1946574		
S2	0,441	143367	143007,6153	359,384699	0,03719092	0,1946574		
S3	0,441	142703	143007,6153	-304,615301	0,03719092	0,1946574		



<b>Efeito Matriz</b>		<b>Avaliação do efeito matriz para o analito glicose na solução anticoagulante ACD-A</b>							
<b>Curva com Solvente</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)		
S1	2,09	704724	701474,5238	3249,47619	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Solv	47536412,56	
S2	2,09	695898	701474,5238	-5576,52381	0,356551578	4,3677568	S <sup>2</sup> res Matriz	76311374,86	
S3	2,09	694283	701474,5238	-7191,52381	0,356551578	4,3677568	GL (n1+n2)-4	38	
S1	2,29	773344	767230,6667	6113,33333	0,158467368	5,2393274	F (1-α/2, GL)	2,17	
S2	2,29	779803	767230,6667	12572,3333	0,158467368	5,2393274	Teste F	1,60532465	
S3	2,29	760842	767230,6667	-6388,66667	0,158467368	5,2393274			
S1	2,49	830651	832986,8095	-2335,80952	0,039616842	6,1901316			
S2	2,49	827621	832986,8095	-5365,80952	0,039616842	6,1901316			
S3	2,49	834910	832986,8095	1923,19048	0,039616842	6,1901316			
S1	2,69	904311	898742,9524	5568,04762	0	7,2201695	<b>Estatísticas (Solvente)</b>		
S2	2,69	899045	898742,9524	302,047619	0	7,2201695	Inclinação	330366,8053	
S3	2,69	894225	898742,9524	-4517,95238	0	7,2201695	Interceção	11035,02381	
S1	2,89	962038	964499,0952	-2461,09524	0,039616842	8,329441	Sxx <sub>1</sub>	3,327814727	
S2	2,89	963481	964499,0952	-1018,09524	0,039616842	8,329441	s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	47536412,56	
S3	2,89	973949	964499,0952	9449,90476	0,039616842	8,329441	n <sub>1</sub>	21	
S1	3,09	1030752	1030255,238	496,761905	0,158467368	9,5179463	ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	154,9513732	
S2	3,09	1036449	1030255,238	6193,7619	0,158467368	9,5179463	X <sub>1,med</sub>	2,6870373	
S3	3,09	1026307	1030255,238	-3948,2381	0,158467368	9,5179463			
S1	3,28	1105472	1096011,381	9460,61905	0,356551578	10,785685	<b>Estatísticas (Matriz)</b>		
S2	3,28	1078945	1096011,381	-17066,381	0,356551578	10,785685	Inclinação	329979,3125	
S3	3,28	1096552	1096011,381	540,619048	0,356551578	10,785685	Interceção	16910,80576	
							Sxx <sub>2</sub>	3,356937771	
							s <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	76311374,86	
							n <sub>2</sub>	21	
							ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup>	155,6493194	
							X <sub>2,med</sub>	2,692957143	
<b>Curva com Matriz</b>									
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>			
S1	2,09	707935	707755,4944	179,505567	0,359228985	4,383161	<b>Avaliação</b>		
S2	2,09	722074	706567,5689	15506,4311	0,363557316	4,3681	s <sup>2</sup> p	61923893,71	
S3	2,09	708396	706567,5689	1828,43109	0,363557316	4,3681	t <sub>n</sub>	0,063656545	
S1	2,29	763518	773784,3549	-10266,3549	0,159406266	5,2610597	t <sub>α</sub>	0,354952838	
S2	2,29	771298	773784,3549	-2486,35487	0,159406266	5,2610597	GL (n1+n2)-4	38	
S3	2,29	764993	773784,3549	-8791,35487	0,159406266	5,2610597	t (1-α/2, GL)	2,02	
S1	2,49	848992	839813,2153	9178,7847	0,039663568	6,2190384			
S2	2,49	839474	839813,2153	-339,215299	0,039663568	6,2190384			
S3	2,49	841684	839813,2153	1870,7847	0,039663568	6,2190384			
S1	2,69	907981	905842,0757	2138,92427	8,8898E-07	7,2570972			
S2	2,69	908426	905842,0757	2583,92427	8,8898E-07	7,2570972			
S3	2,69	908672	905842,0757	2829,92427	8,8898E-07	7,2570972			
S1	2,89	964036	971870,9362	-7834,93617	0,04041823	8,375236			
S2	2,89	962457	971870,9362	-9413,93617	0,04041823	8,375236			
S3	2,89	964734	971870,9362	-7136,93617	0,04041823	8,375236			
S1	3,09	1044113	1037899,797	6213,2034	0,160915592	9,5734548			
S2	3,09	1034800	1037899,797	-3099,7966	0,160915592	9,5734548			
S3	3,09	1019854	1037899,797	-18045,7966	0,160915592	9,5734548			
S1	3,29	1108617	1102542,744	6074,25608	0,356460173	10,8241			
S2	3,29	1121897	1102542,744	19354,2561	0,356460173	10,8241			
S3	3,29	1102199	1102542,744	-343,74392	0,356460173	10,8241			

**Curva com Solvente**

Área

Conc. (mg/L)

$y = 330367x + 11035$   
 $R^2 = 0,9974$

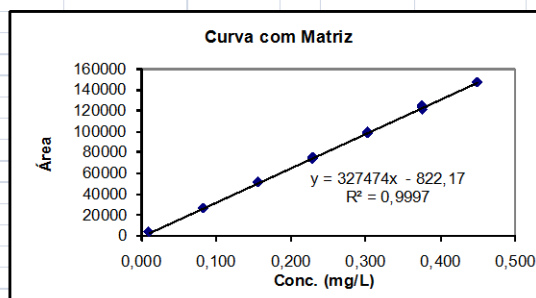
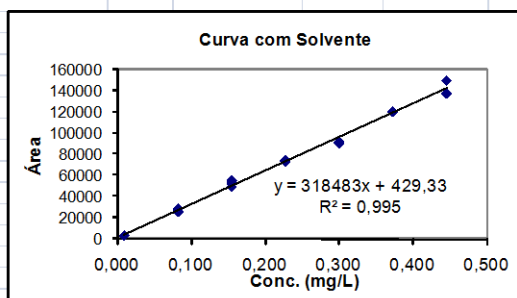
**Curva com Matriz**

Área

Conc. (mg/L)

$y = 329979x + 16911$   
 $R^2 = 0,9958$

<b>Efeito Matriz</b>		<b>Avaliação do efeito matriz para o analito fucose na solução anticoagulante ACD-A</b>						
<b>Curva com Solvente</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	<b>Homoedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)</b> S <sup>2</sup> res Solv <b>10645533,26</b> S <sup>2</sup> res Matriz <b>813188,923</b> GL (n1+n2)-4 <b>35</b> F (1-α/2; GL) <b>2,26</b> Teste F <b>13,09109478</b>  <b>Estadísticas (Solvente)</b> Inclinação <b>318483,411</b> Interceção <b>429,3295389</b> Sxx <sub>1</sub> <b>0,393628827</b> s <sup>2</sup> res <sub>1</sub> <b>10645533,26</b> n <sub>1</sub> <b>20</b> ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup> <b>1,335812784</b> X <sub>1,med</sub> <b>0,217046534</b>  <b>Estadísticas (Matriz)</b> Inclinação <b>327474,065</b> Interceção <b>-822,1748329</b> Sxx <sub>2</sub> <b>0,39562319</b> s <sup>2</sup> res <sub>2</sub> <b>813188,923</b> n <sub>2</sub> <b>19</b> ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup> <b>1,329188613</b> X <sub>2,med</sub> <b>0,221664211</b>  <b>Avaliação</b> s <sup>2</sup> p <b>5869823,156</b> t <sub>n</sub> <b>1,666649735</b> t <sub>α</sub> <b>0,896193179</b> GL (n1+n2)-4 <b>20,86821474</b> t (1-α/2; GL) <b>2,09</b>	
S1	0,010	3162	3599,507042	-437,507042	0,042887326	9,908E-05		
S2	0,010	3027	3599,507042	-572,507042	0,042887326	9,908E-05		
S3	0,010	3081	3599,507042	-518,507042	0,042887326	9,908E-05		
S1	0,083	28455	26741,80282	1713,19718	0,018071022	0,0068257		
S2	0,083	25469	26741,80282	-1272,80282	0,018071022	0,0068257		
S3	0,083	26036	26741,80282	-705,802817	0,018071022	0,0068257		
S1	0,155	55252	49884,09859	5367,90141	0,003814847	0,0241125		
S2	0,155	52389	49884,09859	2504,90141	0,003814847	0,0241125		
S3	0,155	49253	49884,09859	-631,098592	0,003814847	0,0241125		
S1	0,228	73333	73026,39437	306,605634	0,000118801	0,0519594		
S2	0,228	74383	73026,39437	1356,60563	0,000118801	0,0519594		
S3	0,228	73993	73026,39437	966,605634	0,000118801	0,0519594		
S1	0,301	91146	96168,69014	-5022,69014	0,006982886	0,0903665		
S2	0,301	91689	96168,69014	-4479,69014	0,006982886	0,0903665		
S3	0,301	90572	96168,69014	-5596,69014	0,006982886	0,0903665		
S1	0,373	120592	119310,9859	1281,01408	0,024407099	0,1393337		
S2	0,373	120479	119310,9859	1168,01408	0,024407099	0,1393337		
S3	0,373	120702	119310,9859	1391,01408	0,024407099	0,1393337		
S1	0,446	150021	142453,2817	7567,71831	0,052391442	0,198861		
S2								
S3	0,446	138067	142453,2817	-4386,28169	0,052391442	0,198861		
<b>Curva com Matriz</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>		
S1	0,010	2955	2357,598339	597,401661	0,044924587	9,428E-05		
S2	0,010	2819	2357,598339	461,401661	0,044924587	9,428E-05		
S3	0,010	2910	2357,598339	552,401661	0,044924587	9,428E-05		
S1	0,083	25589	26335,24938	-746,249381	0,019247181	0,0068774		
S2	0,083	25515	26335,24938	-820,249381	0,019247181	0,0068774		
S3	0,083	25722	26335,24938	-613,249381	0,019247181	0,0068774		
S1								
S2	0,156	51220	50309,62568	910,374317	0,004293422	0,0243797		
S3	0,156	50529	50309,62568	219,374317	0,004293422	0,0243797		
S1	0,229	74669	74287,27673	381,723274	0,000059	0,052606		
S2	0,229	72942	74287,27673	-1345,27673	0,000059	0,052606		
S3	0,229	74265	74287,27673	-22,2767258	0,000059	0,052606		
S1	0,303	98234	98264,92777	-30,9277684	0,006547365	0,0915547		
S2	0,303	97539	98264,92777	-725,927768	0,006547365	0,0915547		
S3	0,303	98925	98264,92777	660,072232	0,006547365	0,0915547		
S1	0,376	122331	122239,3041	91,6959296	0,023754759	0,1412181		
S2	0,376	120179	122308,0736	-2129,07362	0,023819536	0,141376		
S3	0,376	124134	122239,3041	1894,69593	0,023754759	0,1412181		
S1								
S2	0,449	146484	146216,9551	267,044887	0,051686108	0,20161		
S3	0,449	146614	146216,9551	397,044887	0,051686108	0,20161		



**Efeito Matriz** Avaliação do efeito matriz para o analito glicose na solução preservadora SAG-M

**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>
S1	2,09	704724	701474,5238	3249,47619	0,356551578	4,3677568
S2	2,09	695898	701474,5238	-5576,52381	0,356551578	4,3677568
S3	2,09	694283	701474,5238	-7191,52381	0,356551578	4,3677568
S1	2,29	773344	767230,6667	6113,33333	0,158467368	5,2393274
S2	2,29	779803	767230,6667	12572,33333	0,158467368	5,2393274
S3	2,29	760842	767230,6667	-6388,66667	0,158467368	5,2393274
S1	2,49	830651	832986,8095	-2335,80952	0,039616842	6,1901316
S2	2,49	827621	832986,8095	-5365,80952	0,039616842	6,1901316
S3	2,49	834910	832986,8095	1923,19048	0,039616842	6,1901316
S1	2,69	904311	898742,9524	5568,04762	0	7,2201695
S2	2,69	899045	898742,9524	302,047619	0	7,2201695
S3	2,69	894225	898742,9524	-4517,95238	0	7,2201695
S1	2,89	962038	964499,0952	-2461,09524	0,039616842	8,329441
S2	2,89	963481	964499,0952	-1018,09524	0,039616842	8,329441
S3	2,89	973949	964499,0952	9449,90476	0,039616842	8,329441
S1	3,09	1030752	1030255,238	496,761905	0,158467368	9,5179463
S2	3,09	1036449	1030255,238	6193,7619	0,158467368	9,5179463
S3	3,09	1026307	1030255,238	-3948,2381	0,158467368	9,5179463
S1	3,28	1105472	1096011,381	9460,61905	0,356551578	10,785685
S2	3,28	1078945	1096011,381	-17066,381	0,356551578	10,785685
S3	3,28	1096552	1096011,381	540,619048	0,356551578	10,785685

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S <sup>2</sup> res Solv	47536412,56
S <sup>2</sup> res Matriz	1116827,706
GL (n1+n2)-4	35
F (1-α/2, GL)	2,29
Teste F	42,56378339

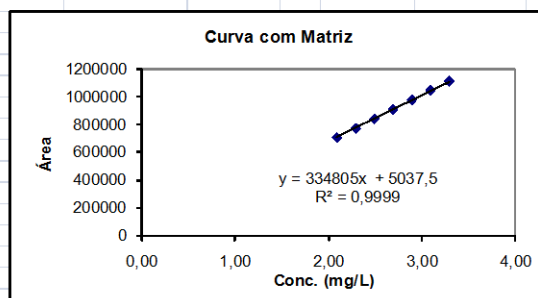
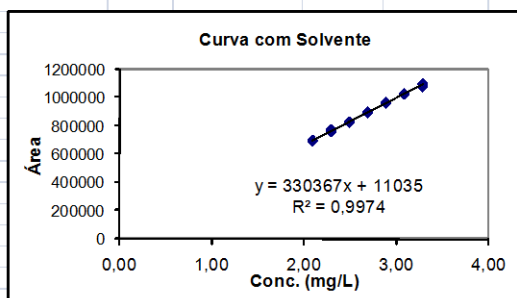
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	330366,8053
Interceção	11035,02381
Sxx <sub>1</sub>	3,327814727
s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	47536412,56
n <sub>1</sub>	21
ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	154,9513732
X <sub>1,med</sub>	2,6870373

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	334805,2327
Interceção	5037,488025
Sxx <sub>2</sub>	3,283979208
s <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	1116827,706
n <sub>2</sub>	18
ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup>	135,7620235
X <sub>2,med</sub>	2,712911969

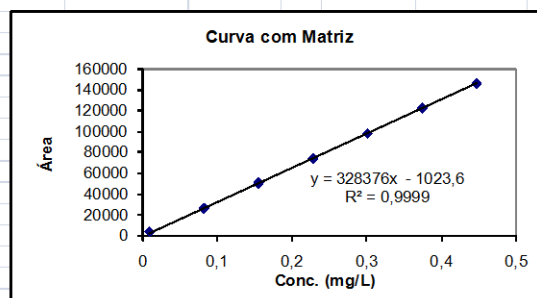
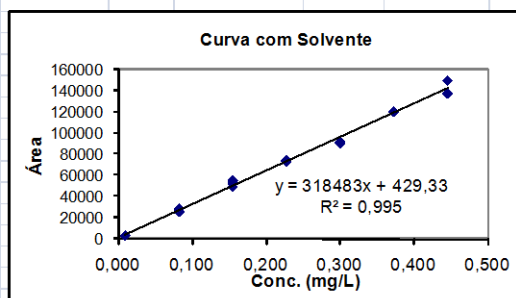
**Curva com Matriz**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>
S1	2,09	705781	704602	1179	0,388683529	4,3658727
S2	2,09	704841	704602	239	0,388683529	4,3658727
S3	2,09	705642	704602	1040	0,388683529	4,3658727
S1	2,29	771864	771694,625	169,375	0,178972901	5,2434592
S2	2,29	771559	771694,625	-135,625	0,178972901	5,2434592
S3	2,29	770950	771694,625	-744,625	0,178972901	5,2434592
S1	2,49	837360	838787,25	-1427,25	0,049576981	6,2013604
S2						
S3						
S1	2,69	904048	905879,875	-1831,875	0,000496	7,2395763
S2						
S3	2,69	904961	905879,875	-918,875	0,000496	7,2395763
S1	2,89	973719	972972,5	746,5	0,031729268	8,358107
S2	2,89	974459	972972,5	1486,5	0,031729268	8,358107
S3	2,89	972442	972972,5	-530,5	0,031729268	8,358107
S1	3,09	1040012	1040065,125	-53,125	0,143277475	9,5569523
S2	3,09	1038535	1040065,125	-1530,125	0,143277475	9,5569523
S3	3,09	1041011	1040065,125	945,875	0,143277475	9,5569523
S1	3,29	1106269	1107157,75	-888,75	0,33514039	10,836112
S2	3,29	1108275	1107157,75	1117,25	0,33514039	10,836112
S3	3,29	1108295	1107157,75	1137,25	0,33514039	10,836112

Avaliação	
s <sup>2</sup> p	26316030,91
t <sub>n</sub>	1,160609925
t <sub>α</sub>	0,577204811
GL (n1+n2)-4	20,03797153
t (1-α/2, GL)	2,09



<b>Efeito Matriz</b>		<b>Avaliação do efeito matriz para o analito fufose na solução preservadora SAG-M</b>						
<b>Curva com Solvente</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	<b>Homoedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)</b> S <sup>2</sup> res Solv <b>10645533,26</b> S <sup>2</sup> res Matriz <b>187370,7269</b> GL (n1 + n2) - 4 <b>35</b> F (1-α/2; GL) <b>2,26</b> Teste F <b>56,81534913</b>  <b>Estadísticas (Solvente)</b> Inclinação <b>318483,411</b> Interceção <b>429,3295389</b> Sxx <sub>1</sub> <b>0,393628827</b> s <sup>2</sup> res <sub>1</sub> <b>10645533,26</b> n <sub>1</sub> <b>20</b> ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup> <b>1,335812784</b> X <sub>1,med</sub> <b>0,217046534</b>  <b>Estadísticas (Matriz)</b> Inclinação <b>328375,9363</b> Interceção <b>-1023,590323</b> Sxx <sub>2</sub> <b>0,341616947</b> s <sup>2</sup> res <sub>2</sub> <b>187370,7269</b> n <sub>2</sub> <b>19</b> ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup> <b>1,539138</b> X <sub>2,med</sub> <b>0,251052632</b>  <b>Avaliação</b> s <sup>2</sup> p <b>5565854,318</b> t <sub>n</sub> <b>1,883246125</b> t <sub>a</sub> <b>1,067989448</b> GL (n1 + n2) - 4 <b>18,66637498</b> t (1-α/2; GL) <b>2,10</b>	
S1	0,010	3162	3599,507042	-437,507042	0,042887326	9,908E-05		
S2	0,010	3027	3599,507042	-572,507042	0,042887326	9,908E-05		
S3	0,010	3081	3599,507042	-518,507042	0,042887326	9,908E-05		
S1	0,083	28455	26741,80282	1713,19718	0,018071022	0,0068257		
S2	0,083	25469	26741,80282	-1272,80282	0,018071022	0,0068257		
S3	0,083	26036	26741,80282	-705,802817	0,018071022	0,0068257		
S1	0,155	55252	49884,09859	5367,90141	0,003814847	0,0241125		
S2	0,155	52389	49884,09859	2504,90141	0,003814847	0,0241125		
S3	0,155	49253	49884,09859	-631,098592	0,003814847	0,0241125		
S1	0,228	73333	73026,39437	306,605634	0,000118801	0,0519594		
S2	0,228	74383	73026,39437	1356,60563	0,000118801	0,0519594		
S3	0,228	73993	73026,39437	966,605634	0,000118801	0,0519594		
S1	0,301	91146	96168,69014	-5022,69014	0,006982886	0,0903665		
S2	0,301	91689	96168,69014	-4479,69014	0,006982886	0,0903665		
S3	0,301	90572	96168,69014	-5596,69014	0,006982886	0,0903665		
S1	0,373	120592	119310,9859	1281,01408	0,024407099	0,1393337		
S2	0,373	120479	119310,9859	1168,01408	0,024407099	0,1393337		
S3	0,373	120702	119310,9859	1391,01408	0,024407099	0,1393337		
S1	0,446	150021	142453,2817	7567,71831	0,052391442	0,198861		
S2								
S3	0,446	138067	142453,2817	-4386,28169	0,052391442	0,198861		
<b>Curva com Matriz</b>								
Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>		
S1								
S2	0,009	2916	1931,793103	984,206897	0,058589476	0,000081		
S3								
S1	0,082	25752	25903,23645	-151,236453	0,028578792	0,006724		
S2	0,082	25899	25903,23645	-4,2364532	0,028578792	0,006724		
S3	0,082	25313	25903,23645	-590,236453	0,028578792	0,006724		
S1	0,155	50040	49874,6798	165,320197	0,009226108	0,024025		
S2	0,155	49110	49874,6798	-764,679803	0,009226108	0,024025		
S3	0,155	50330	49874,6798	455,320197	0,009226108	0,024025		
S1	0,228	73579	73846,12315	-267,123153	0,000531	0,051984		
S2	0,228	73588	73846,12315	-258,123153	0,000531	0,051984		
S3	0,228	73780	73846,12315	-66,1231527	0,000531	0,051984		
S1	0,301	97530	97817,5665	-287,566502	0,00249474	0,090601		
S2	0,301	97559	97817,5665	-258,566502	0,00249474	0,090601		
S3	0,301	97843	97817,5665	25,4334975	0,00249474	0,090601		
S1	0,374	122023	121789,0099	233,990148	0,015116055	0,139876		
S2	0,374	122569	121789,0099	779,990148	0,015116055	0,139876		
S3	0,374	121990	121789,0099	200,990148	0,015116055	0,139876		
S1	0,447	146042	145760,4532	281,546798	0,038395371	0,199809		
S2	0,447	145413	145760,4532	-347,453202	0,038395371	0,199809		
S3	0,447	145629	145760,4532	-131,453202	0,038395371	0,199809		



**Efeito Matriz** Avaliação do efeito matriz para o analito manitol na solução preservadora SAG-M

**Curva com Solvente**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>1</sub> )	Área (Y <sub>1</sub> )	Y <sub>1,est</sub>	Y <sub>1</sub> -Y <sub>1,est</sub>	(X <sub>1</sub> -X <sub>1,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>
S1	0,89	296318	295977,6195	340,380529	0,192344898	0,7921
S2	0,89	296731	295977,6195	753,380529	0,192344898	0,7921
S3	0,89	276799	295977,6195	-19178,6195	0,192344898	0,7921
S1	1,03	350381	344615,7779	5765,22214	0,089144898	1,0609
S2	1,03	347832	344615,7779	3216,22214	0,089144898	1,0609
S3	1,03	352092	344615,7779	7476,22214	0,089144898	1,0609
S1	1,18	397176	396728,0904	447,909582	0,022073469	1,3924
S2	1,18	407729	396728,0904	11000,9096	0,022073469	1,3924
S3	1,18	395680	396728,0904	-1048,09042	0,022073469	1,3924
S1	1,33	450002	448840,403	1161,59702	2,04082E-06	1,7689
S2	1,33	445358	448840,403	-3482,40298	2,04082E-06	1,7689
S3	1,33	450505	448840,403	1664,59702	2,04082E-06	1,7689
S1	1,48	501324	500952,7155	371,284464	0,022930612	2,1904
S2	1,48	494684	500952,7155	-6268,71554	0,022930612	2,1904
S3	1,48	496336	500952,7155	-4616,71554	0,022930612	2,1904
S1	1,62	544394	549590,8739	-5196,87392	0,084930612	2,6244
S2	1,62	545568	549590,8739	-4022,87392	0,084930612	2,6244
S3	1,62	565060	549590,8739	15469,1261	0,084930612	2,6244
S1	1,77	611079	601703,1865	9375,81352	0,194859184	3,1329
S2	1,77	595141	601703,1865	-6562,18648	0,194859184	3,1329
S3	1,77	595037	601703,1865	-6666,18648	0,194859184	3,1329

Homocedasticidade das variâncias dos resíduos (Teste F Snedecor)	
S <sup>2</sup> res Solv	56259245,03
S <sup>2</sup> res Matriz	1082448,476
GL (n1 + n2) - 4	34
F (1-α/2; GL)	2,34
Teste F	51,97406276

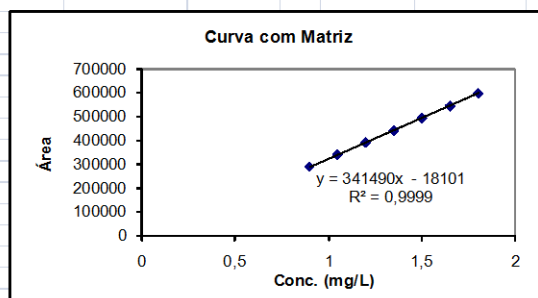
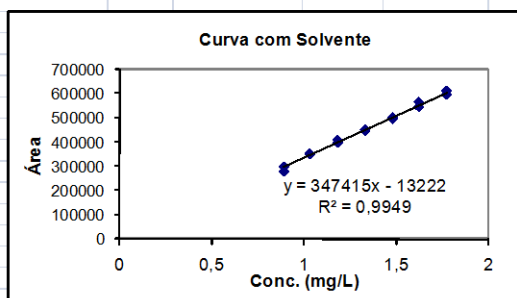
Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	347415,4171
Interceção	-13222,10171
Sxx <sub>1</sub>	1,818857143
s <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	56259245,03
n <sub>1</sub>	21
ΣX <sub>1</sub> <sup>2</sup>	38,886
X <sub>1,med</sub>	1,328571429

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	341490,0056
Interceção	-18100,5956
Sxx <sub>2</sub>	1,564411765
s <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	1082448,476
n <sub>2</sub>	17
ΣX <sub>2</sub> <sup>2</sup>	30,555
X <sub>2,med</sub>	1,305882353

**Curva com Matriz**

Padrão	Conc. (mg/L) (X <sub>2</sub> )	Área (Y <sub>2</sub> )	Y <sub>2,est</sub>	Y <sub>2</sub> -Y <sub>2,est</sub>	(X <sub>2</sub> -X <sub>2,med</sub> ) <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>
S1	0,9	289941	289240,4095	700,590525	0,164740484	0,81
S2	0,9	289980	289240,4095	739,590525	0,164740484	0,81
S3	0,9	290145	289240,4095	904,590525	0,164740484	0,81
S1	1,05	340415	340463,9103	-48,9103215	0,065475779	1,1025
S2	1,05	340085	340463,9103	-378,910321	0,065475779	1,1025
S3	1,05	339906	340463,9103	-557,910321	0,065475779	1,1025
S1	1,2	391810	391687,4112	122,588832	0,011211073	1,44
S2	1,2	391797	391687,4112	109,588832	0,011211073	1,44
S3	1,2	391151	391687,4112	-536,411168	0,011211073	1,44
S1						
S2						
S3	1,35	440957	442910,912	-1953,91201	0,0019463668	1,8225
S1	1,5	494151	494134,4129	16,5871404	0,037681661	2,25
S2	1,5	493867	494134,4129	-267,41286	0,037681661	2,25
S3	1,5	494108	494134,4129	-26,4128596	0,037681661	2,25
S1						
S2	1,65	542863	545357,9137	-2494,91371	0,118416955	2,7225
S3	1,65	546346	545357,9137	988,086294	0,118416955	2,7225
S1	1,8	597933	596581,4146	1351,58545	0,244152249	3,24
S2	1,8	597913	596581,4146	1331,58545	0,244152249	3,24
S3						

Avaliação	
s <sup>2</sup> p	31916540,67
t <sub>n</sub>	1,053699715
t <sub>α</sub>	0,637729721
GL (n1 + n2) - 4	19,89965956
t (1-α/2; GL)	2,09



## APÊNDICE F – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

	Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
---	---	---

### AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

#### Dados da Curva Analítica

Análise:	Avaliação da linearidade para a determinação de glicose		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Shimadzu LC-20	Responsável:	Renata

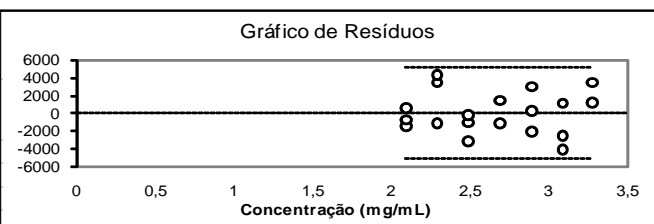
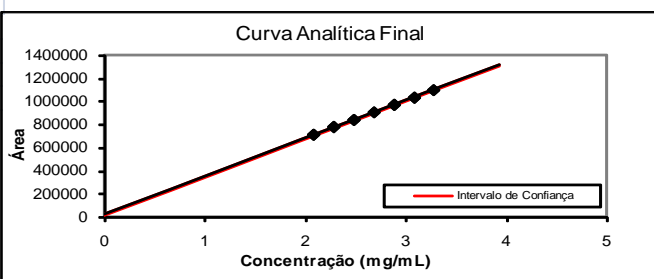
#### Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	2,09	700220,3
	02	2,09	698206,5
	03	2,09	698881,8
2	04	2,29	768805,8
	05	2,29	769691,7
	06	2,29	764149,3
3	07	2,49	827723,3
	08	2,49	829844,0
	09	2,49	830709,7
4	10	2,69	928805,5
	11	2,69	895437,3
	12	2,69	898057,0
5	13	2,89	965248,8
	14	2,89	962471,7
	15	2,89	960095,3
6	16	3,09	1028966,3
	17	3,09	1025285,3
	18	3,09	1023692,3
7	19	3,28	1103381,5
	20	3,28	1091393,7
	21	3,28	1093721,0

#### 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	0,99
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,95

#### Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,43
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,18
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,40

#### Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	6,77E+06
$t_L$ calculado	-4,67E-01
$t_{\text{tabelado}}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,11E+00
p	6,47E-01

#### 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	$Req > Rcrit$

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

Coefficiente Angular (b):	3,28E+05	Coefficiente Linear (a):	1,38E+04
r	0,9998	R <sup>2</sup>	0,9997
N	19	Graus de Liberdade	17

#### Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,94E-02	Limite de Quantificação	8,79E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

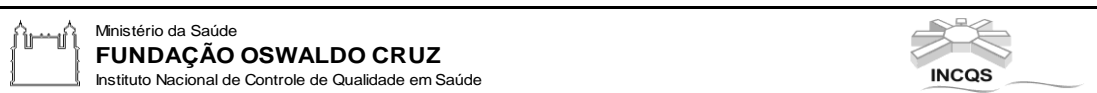
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	3,18E+11	3,18E+11	5,23E+04	4,31E-31
resíduos	17	1,04E+08	6,09E+06		
Ajuste	5	4,50E+07	8,99E+06	1,84E+00	1,79E-01
erro puro	12	5,86E+07	4,89E+06		
total	18	3,18E+11			

#### Observações

--

Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_





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



### AValiação de Linearidade de Curva Analítica

#### Dados da Curva Analítica

Análise:	Avaliação da linearidade para a determinação de frutose		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Shimadzu LC-20	Responsável:	Renata

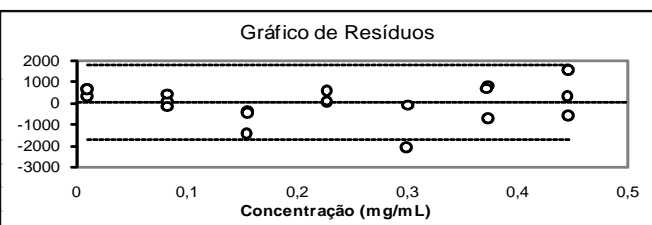
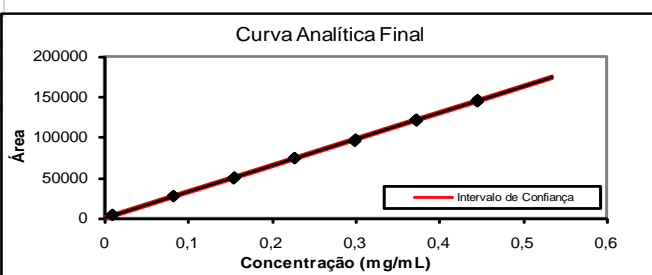
#### Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,010	2734,0
	02	0,010	3071,0
	03	0,010	3013,3
2	04	0,083	26133,7
	05	0,083	26472,3
	06	0,083	25891,3
3	07	0,156	49334,7
	08	0,155	47978,3
	09	0,156	49259,0
4	10	0,228	73614,3
	11	0,228	73090,5
	12	0,228	73150,3
5	13	0,301	87107,0
	14	0,300	94318,7
	15	0,301	96621,0
6	16	0,374	121185,3
	17	0,373	120718,3
	18	0,374	119671,7
7	19	0,447	145588,7
	20	0,446	144022,0
	21	0,447	143470,7

#### 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	0,97
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,95

#### Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,83
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,20
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,41

#### Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	7,06E+05
$t_L$ calculado	-1,12E+00
$t_{tabelado}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,10E+00
p	2,78E-01

#### 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	$Req > Rcrit$

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

Coefficiente Angular (b):	3,24E+05	Coefficiente Linear (a):	-8,31E+02
r	0,9999	R <sup>2</sup>	0,9997
N	20	Graus de Liberdade	18

#### Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	5,84E-03	Limite de Quantificação	1,75E-02
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	4,61E+10	4,61E+10	6,61E+04	1,53E-33
resíduos	18	1,26E+07	6,98E+05		
Ajuste	5	4,73E+06	9,46E+05	1,57E+00	2,36E-01
erro puro	13	7,83E+06	6,02E+05		
total	19	4,61E+10			

#### Observações


Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



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



INCQS

AValiação de Linearidade de Curva Analítica

Dados da Curva Analítica

Análise:	Avaliação da linearidade para a determinação de manitol		
Data de Confeção da Curva:		Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	Shimadzu LC-20	Responsável:	Renata

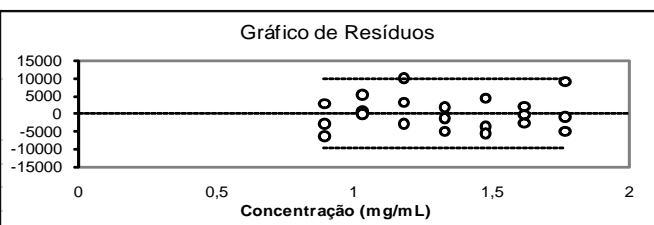
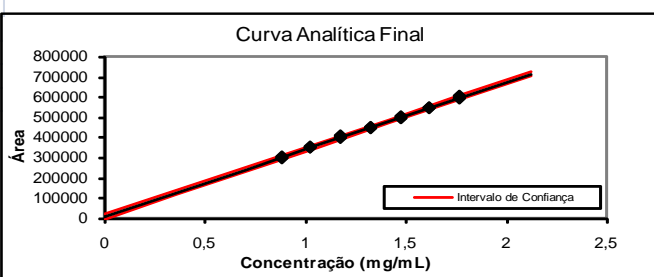
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área
1	01	0,89	300452,3
	02	0,89	291235,8
	03	0,89	294718,8
2	04	1,03	349738,3
	05	1,03	345055,3
	06	1,03	344250,7
3	07	1,18	404604,5
	08	1,18	391621,7
	09	1,18	397683,3
4	10	1,33	446474,5
	11	1,33	443261,3
	12	1,33	439682,3
5	13	1,48	499033,8
	14	1,48	491039,0
	15	1,48	489134,7
6	16	1,62	543446,5
	17	1,62	541129,0
	18	1,62	538869,0
7	19	1,77	600606,3
	20	1,77	590740,7
	21	1,77	586585,0

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)	2,38
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	2,20E+07
$t_L$ calculado	5,58E-03
$t_{tabelado}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,09E+00
p	9,96E-01

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	$Req > Rcrit$

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

Coefficiente Angular (b):	3,34E+05	Coefficiente Linear (a):	5,27E+02
r	0,9990	R <sup>2</sup>	0,9979
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	4,17E-02	Limite de Quantificação	1,24E-01
--------------------	----------	-------------------------	----------

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

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	2,03E+11	2,03E+11	9,24E+03	5,29E-27
resíduos	19	4,17E+08	2,20E+07		
Ajuste	5	7,95E+07	1,59E+07	6,59E-01	6,60E-01
erro puro	14	3,38E+08	2,41E+07		
total	20	2,03E+11			

Observações


Responsável: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Verificado por: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## APÊNDICE G – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA REPETITIVIDADE NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Cálculo da Repetitividade									
Glicose			Frutose			Manitol			
	Área	Média	Teor (g/L)	Área	Média	Teor (g/L)	Área	Média	Teor (g/L)
P 1	828534 821528	825031	8,9686	3251 3040	3145	0,0489	526444 523677	525061	5,1702
P 2	819916 814293	817104,5	8,8849	3201 3251	3226	0,0496	531247 529108	530178	5,2197
P 3	820930 832237	826583,5	8,9850	3115 3261	3188	0,0493	538505 523169	530837	5,2261
P 4	815172 813942	814557	8,8579	2959 3303	3131	0,0488	519652 525189	522421	5,1447
P 5	824490 827789	826139,5	8,9803	3100 2941	3021	0,0479	532700 526837	529769	5,2158
P 6	821183 836260	828721,5	9,0076	2987 3312	3149	0,0490	560056 540932	550494	5,4164
P 7	828937 819969	824453	8,9625	3337 3028	3183	0,0493	547058 555783	551421	5,4253
P 8	816264 813760	815012	8,8627	2852 3260	3056	0,0482	517527 520857	519192	5,1134
P 9	822310 820691	821500,5	8,9313	3028 3095	3061	0,0482	537530 527774	532652	5,2437
P10	813339 817413	815376	8,8666	3048 3241	3145	0,0489	526159 519560	522860	5,1489
P 11	820825 830208	825516,5	8,9738	2992 3024	3008	0,0478	518563 522384	520474	5,1258
P 12	815523 809528	812525,5	8,8365	3817 2820	3319	0,0504	521636 514742	518189	5,1037
P 13	809790 806045	807917,5	8,7878	3505 4215	3860	0,0514	516777 533969	525373	5,1733
P 14	804526 812602	808564	8,7946	2937 3071	3004	0,0478	517648 525361	521505	5,1358
P 15	797741 808646	803193,5	8,7378	2875 2985	2930	0,0472	514063 515337	514700	5,0700
P 16	819540 805242	812391	8,8350	2688 2961	2825	0,0463	517936 521998	519967	5,1209
P 17	859031 819092	839061,5	9,1169	3447 3152	3299	0,0502	521037 521750	521394	5,1347
P 18	813127 816373	814750	8,8600	3033 3075	3054	0,0482	527036 538135	532586	5,2431
P 19	813141 818822	815981,5	8,8730	3293 3477	3385	0,0509	538539 533512	536026	5,2763
P 20	807079 844311	825695	8,9756	3201 3157	3179	0,0492	536256 537016	536636	5,2823
Mín.		<b>8,7378</b>				<b>0,0463</b>			<b>5,0700</b>
Máx.		<b>9,1169</b>				<b>0,0514</b>			<b>5,4253</b>
Md		<b>8,9049</b>				<b>0,0489</b>			<b>5,1995</b>
s		<b>0,0923</b>				<b>0,0013</b>			<b>0,0987</b>
DPR		<b>1,0367</b>				<b>2,5676</b>			<b>1,8988</b>
r		<b>0,7506</b>				<b>0,0101</b>			<b>0,7035</b>
ESM		<b>0,0292</b>				<b>0,0004</b>			<b>0,0312</b>
I.C.		<b>0,0660</b>				<b>0,0009</b>			<b>0,0706</b>
Res.									
DPR	(VR : menor que 4 %)			(VR : menor que 8%)			(VR : menor que 4 %)		

## APÊNDICE H – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Cálculo da Precisão intermediária								
Glicose			Frutose			Manitol		
	Teor (g/L)	Teor (g/L)		Teor (g/L)	Teor (g/L)		Teor (g/L)	Teor (g/L)
P 1	9,0312	8,9686	P 1	0,0470	0,0489	P 1	5,2004	5,1702
P 2	8,9621	8,8849	P 2	0,0479	0,0496	P 2	5,2158	5,2197
P 3	9,0223	8,9850	P 3	0,0466	0,0493	P 3	5,1714	5,2261
P 4	9,0551	8,8579	P 4	0,0479	0,0488	P 4	5,2199	5,1447
P 5	9,0431	8,9803	P 5	0,0487	0,0479	P 5	5,1934	5,2158
P 6	9,0270	9,0076	P 6	0,0469	0,0490	P 6	5,2058	5,4164
P 7	8,9827	8,9625	P 7	0,0489	0,0493	P 7	5,2017	5,4253
P 8	8,9957	8,8627	P 8	0,0491	0,0482	P 8	5,2328	5,1134
P 9	9,0012	8,9313	P 9	0,0499	0,0482	P 9	5,1600	5,2437
P 10	9,0041	8,8666	P 10	0,0485	0,0489	P 10	5,1149	5,1489
P 11	8,9574	8,9738	P 11	0,0462	0,0478	P 11	5,0930	5,1258
P 12	8,9066	8,8365	P 12	0,0491	0,0504	P 12	5,0908	5,1037
P 13	8,9298	8,7878	P 13	0,0482	0,0514	P 13	5,0529	5,1733
P 14	8,8707	8,7946	P 14	0,0459	0,0478	P 14	5,0811	5,1358
P 15	8,9075	8,7378	P 15	0,0488	0,0472	P 15	5,0739	5,0700
P 16	8,8437	8,8350	P 16	0,0479	0,0463	P 16	5,0792	5,1209
P 17	8,9184	9,1169	P 17	0,0472	0,0502	P 17	5,1065	5,1347
P 18	8,9426	8,8600	P 18	0,0480	0,0482	P 18	5,1120	5,2431
P 19	8,9602	8,8730	P 19	0,0497	0,0509	P 19	5,1481	5,2763
P 20	8,9630	8,9756	P 20	0,0516	0,0492	P 20	5,1535	5,2823
Mín.	8,8437	8,7378	Mín.	0,0459	0,0463	Mín.	5,0529	5,0700
Máx.	9,0551	9,1169	Máx.	0,0516	0,0514	Máx.	5,2328	5,4253
Md	8,9662	8,9049	Md	0,0482	0,0489	Md	5,1454	5,1995
s	0,0581	0,0911	s	0,0014	0,0013	s	0,0575	0,0987
DPR	0,6479	1,0230	DPR	2,8454	2,5676	DPR	1,1167	1,8988
r	0,4186	0,7506	r	0,0113	0,0101	r	0,3562	0,7035
ESM	0,0184	0,0288	ESM	0,0004	0,0004	ESM	0,0182	0,0312
I.C.	0,0415	0,0651	I.C.	0,0010	0,0009	I.C.	0,0411	0,0706

Cálculo da Precisão Intermediária						
	Glicose		Frutose		Manitol	
	1ºO - 1ºI	2ºO - 2ºI	1ºO - 1ºI	2ºO - 2ºI	1ºO - 1ºI	2ºO - 2ºI
	(Y+MdY)2	(Y2-MdY2)2	(Y+MdY)2	(Y2-MdY2)2	(Y+MdY)2	(Y2-MdY2)2
P 1	0,0042	0,0041	0,000001	0,000000	0,003032	0,000858
P 2	0,0000	0,0004	0,000000	0,000001	0,004969	0,000410
P 3	0,0031	0,0064	0,000003	0,000000	0,000679	0,000709
P 4	0,0079	0,0022	0,000000	0,000000	0,005558	0,003007
P 5	0,0059	0,0057	0,000000	0,000001	0,002306	0,000265
P 6	0,0037	0,0105	0,000002	0,000000	0,003651	0,047026
P 7	0,0003	0,0033	0,000000	0,000000	0,003170	0,050996
P 8	0,0009	0,0018	0,000001	0,000000	0,007646	0,007409
P 9	0,0012	0,0007	0,000003	0,000000	0,000214	0,001952
P10	0,0014	0,0015	0,000000	0,000000	0,000928	0,002559
P 11	0,0001	0,0047	0,000004	0,000001	0,002741	0,005433
P 12	0,0036	0,0047	0,000001	0,000002	0,002976	0,009180
P 13	0,0013	0,0137	0,000000	0,000006	0,008548	0,000687
P 14	0,0091	0,0122	0,000005	0,000001	0,004129	0,004059
P 15	0,0034	0,0279	0,000000	0,000003	0,005106	0,016773
P 16	0,0150	0,0049	0,000000	0,000007	0,004376	0,006180
P 17	0,0023	0,0449	0,000001	0,000002	0,001510	0,004201
P 18	0,0006	0,0020	0,000000	0,000000	0,001113	0,001900
P 19	0,0000	0,0010	0,000002	0,000004	0,000008	0,005896
P 20	0,0000	0,0050	0,000011	0,000000	0,000067	0,006854
S 1	<b>0,0641</b>	<b>0,1577</b>	<b>0,000036</b>	<b>0,000030</b>	<b>0,0627</b>	<b>0,1764</b>
S 2	<b>0,2218</b>		<b>0,0001</b>		<b>0,2391</b>	
Si(o,i)	<b>0,0764</b>		<b>0,001315</b>		<b>0,07932</b>	
Mín.	<b>8,7378</b>		<b>0,0459</b>		<b>5,0529</b>	
Máx.	<b>9,1169</b>		<b>0,0516</b>		<b>5,4253</b>	
Md	<b>8,9356</b>		<b>0,0485</b>		<b>5,1724</b>	
DPR	<b>0,855</b>		<b>2,708218</b>		<b>1,5335</b>	
R	<b>0,75058</b>		<b>0,01127</b>		<b>0,73738</b>	
	(DPR : menor que 5 %)		(DPR : menor que 8 %)		(DPR : menor que 5 %)	

## APÊNDICE I – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

<b>Avaliação da Tendência para Glicose</b>			
C1	C2	C3	Recuperação
2,2964	2,0999	0,2000	98,3
2,4857		0,4000	96,5
2,6919		0,6000	98,7
2,8980		0,8000	99,8
3,0954		1,0000	99,6
3,2971		1,2000	99,8
Tendencia			98,8
<b>Avaliação da Tendência para Frutose</b>			
C1	C2	C3	Recuperação
0,0756	0,0091	0,0730	91,2
0,1469		0,1460	94,4
0,2171		0,2190	95,0
0,2878		0,2919	95,5
0,3602		0,3649	96,2
0,4295		0,4379	96,0
Tendencia			94,7
<b>Avaliação da Tendência para Manitol</b>			
C1	C2	C3	Recuperação
1,0555	0,9000	0,1500	103,7
1,2152		0,2999	105,1
1,3669		0,4499	103,8
1,5325		0,5998	105,5
1,6878		0,7498	104,6
1,7998		0,9098	106,2
Tendencia			104,8
C1 - Média da concentração do analito na amostra fortificada			
C2 - Média da concentração do analito na amostra não fortificada			
C3 - Média da concentração teórica do analito fortificado			

**APÊNDICE J – RESULTADO DA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA**

Resultados obtidos nas combinações do teste de Youden na avaliação da robustez para a determinação de glicose							
Combinção		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
1	Media	16,9	898801	--	2,370	1,100	5615
	DPR	0,02	0,02	--	0,02	0,04	0,14
2	Media	15,4	817833	--	2,065	1,105	4172
	DPR	0,01	0,19	--	0,02	0,67	0,79
3	Media	15,4	902826	--	2,086	1,091	5075
	DPR	0,45	0,30	--	0,67	0,83	1,43
4	Media	16,9	990913	--	2,375	1,107	6181
	DPR	0,01	0,03	--	0,09	0,02	0,29
5	Media	14,6	958095	--	1,921	1,079	3157
	DPR	0,00	0,04	--	0,05	0,00	0,23
6	Media	13,3	897842	--	1,659	1,074	2919
	DPR	0,08	0,06	--	0,13	0,68	0,38
7	Media	14,6	898212	--	1,919	1,065	3457
	DPR	0,01	0,12	--	0,00	0,07	0,14
8	Media	13,3	820476	--	1,661	1,066	3232
	DPR	0,01	0,07	--	0,00	0,15	0,27
Combinção		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
9	Media	16,9	898801	--	2,370	1,100	5615
	DPR	0,02	0,02	--	0,02	0,04	0,14
10	Media	18,7	994069	--	2,741	1,098	5105
	DPR	0,01	0,06	--	0,01	0,04	0,67
11	Media	18,7	895530	--	2,740	1,107	5743
	DPR	0,01	0,05	--	0,02	0,19	1,67
12	Media	19,8	802959	--	2,361	1,113	4291
	DPR	0,04	0,03	--	0,25	0,06	0,75
13	Media	16,2	868843	--	2,248	1,069	3756
	DPR	0,01	0,03	--	0,00	0,05	0,37
14	Media	14,6	806876	--	1,920	1,082	2924
	DPR	0,17	0,03	--	0,26	0,06	0,45
15	Media	14,6	906462	--	1,929	1,074	3479
	DPR	0,50	0,17	--	0,76	0,32	1,13
16	Media	16,2	1007633	--	2,247	1,078	3163
	DPR	0,01	0,05	--	0,02	0,04	0,36

Resultados obtidos nas combinações do teste de Youden na avaliação da robustez para a determinação de frutose							
Combinção		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
1	Media	19,0	73902	3,388	2,986	1,071	7511
	DPR	9,00	0,09	0,05	0,03	0,16	0,17
2	Media	18,2	67606	3,076	2,644	1081,2	6005
	DPR	0,05	0,86	1,72	0,06	1,63	1,03
3	Media	18,3	75038	3,146	2,651	1,061	6250
	DPR	0,35	0,75	1,25	0,48	1,93	0,41
4	Media	20,0	82400	3,686	3,005	1,120	8845
	DPR	0,00	0,63	0,14	0,68	0,00	0,39
5	Media	17,8	81841	2,844	2,551	1,027	3647
	DPR	0,01	0,23	0,09	0,16	0,00	0,27
6	Media	16,2	73065	2,783	2,235	1,018	3546
	DPR	0,01	0,54	0,39	0,02	0,26	0,70
7	Media	17,7	72987	2,885	2,533	1,013	3867
	DPR	0,01	1,15	0,34	0,02	0,36	1,28
8	Media	16,1	67011	2,806	2,221	1,017	3683
	DPR	0,01	0,21	0,18	0,02	0,15	0,28
Combinção		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
9	Media	19,0	73902	3,388	2,986	1,071	7511
	DPR	9,00	0,09	0,05	0,03	0,16	0,17
10	Media	22,3	82399	3,482	3,464	1,093	7564
	DPR	0,01	0,17	0,40	0,01	0,24	0,93
11	Media	22,1	75058	3,436	3,422	1,106	7746
	DPR	0,02	0,60	0,98	0,03	0,60	0,97
12	Media	20,0	66472	3,181	3,010	1,104	6282
	DPR	0,03	0,34	0,46	0,03	0,56	1,14
13	Media	19,6	73826	2,994	2,925	1,039	4281
	DPR	0,01	0,22	0,21	0,01	0,10	0,41
14	Media	17,8	65801	2,872	2,569	1,017	3660
	DPR	0,13	0,38	0,19	0,19	0,63	0,49
15	Media	17,7	71613	2,922	2,544	1,029	4068
	DPR	0,41	2,79	0,76	0,56	1,64	2,37
16	Media	19,8	82292	2,946	2,963	1,029	3776
	DPR	0,01	0,31	0,75	0,01	0,24	0,36



Resultados obtidos nas combinações do teste de Youden na avaliação da robustez para a determinação de manitol							
Combinação		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
1	Media	24,6	444912	5,210	3,910	1,10	13242
	DPR	0,02	0,06	0,05	0,03	0,07	0,11
2	Media	22,5	412527	4,668	3,501	0,924	10437
	DPR	0,04	1,60	1,61	0,04	0,37	0,59
3	Media	22,5	423623	4,764	3,498	0,943	12932
	DPR	0,34	0,14	3,97	0,45	0,53	0,21
4	Media	24,7	490171	5,121	3,942	1,102	10209
	DPR	0,00	0,20	0,12	0,16	0,00	0,30
5	Media	22,4	518877	4,216	3,479	1,026	7631
	DPR	0,01	0,05	0,11	0,18	0,01	0,20
6	Media	20,5	457410	4,245	3,092	1,002	5128
	DPR	0,01	0,25	0,27	0,01	0,14	0,51
7	Media	22,3	431073	4,305	3,459	1,021	7734
	DPR	0,01	0,17	0,36	0,01	1,21	0,35
8	Media	20,3	414345	4,197	3,057	0,987	7625
	DPR	0,01	1,46	0,11	0,01	0,98	0,45
Combinação		Tr	Área	Rs	k	Tf	N
9	Media	24,6	444912	5,210	3,911	1,096	13242
	DPR	0,02	0,06	0,05	0,03	0,07	0,11
10	Media	27,6	510512	5,048	4,525	1,123	10521
	DPR	0,02	0,55	0,37	0,02	0,71	0,76
11	Media	27,2	463796	4,949	4,449	1,144	10273
	DPR	0,02	0,51	0,75	0,03	1,29	0,85
12	Media	24,8	412459	4,664	3,958	1,145	9424
	DPR	0,02	0,08	0,49	0,03	0,61	0,85
13	Media	24,7	469881	4,359	3,940	1,038	7672
	DPR	0,01	0,06	0,10	0,01	0,09	0,35
14	Media	22,6	422596	4,285	3,520	1,013	7766
	DPR	0,12	6,74	1,51	0,16	2,43	0,21
15	Media	22,3	448741	4,371	3,457	0,976	7967
	DPR	0,02	1,27	0,68	0,02	0,47	0,52
16	Media	24,0	508068	4,306	4,010	1,025	7541
	DPR	0,01	0,02	0,69	0,01	0,10	0,31