

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

Carolina Mesquita de Carvalho

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE PLASTIFICANTES EM BOLSAS
DE SANGUE**

Rio de Janeiro

2018

Carolina Mesquita de Carvalho

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE PLASTIFICANTES EM BOLSAS
DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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
Orientador: André Luiz Mazzei Albert
Co-orientadora: Michele Feitoza Silva

Rio de Janeiro

2018

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

Carvalho, Carolina Mesquita de

Avaliação de técnicas para análise de plastificantes em bolsas de sangue. / Carolina Mesquita de Carvalho – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

81 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Orientação: Kátia Christina Leandro.

1. Bolsas Plásticas para Preservação de Sangue. 2. Plastificantes. 3. Vigilância Sanitária. I. Título.

EVALUATION OF TECHNIQUES FOR ANALYSIS OF PLASTICANTS IN BLOOD BAGS

Carolina Mesquita de Carvalho

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE PLASTIFICANTES EM BOLSAS
DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação 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.

Aprovado em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA:

Bernardete Ferraz Spisso (Doutora).
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde.

André Victor Sartori (Doutor).
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde.

Adriano Arnóbio José da Silva e Silva (Doutor).
Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Kátia Christina Leandro (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde.

Dedico este trabalho aos meus pais, com todo meu amor e gratidão por tudo que são e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, minha saúde, minha família, por orientar os meus passos e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Paulo e Lara, por todo amor, paciência e dedicação. Obrigada pelo apoio em todos esses anos e por tornarem tudo isso possível!

Aos meus amores Carlos e Izabel, por todo amor e incentivo, pela compreensão e por fazer os meus dias mais felizes.

Ao meu irmão, por todas as alegrias e tristezas.

A toda minha família pelo amor, carinho e incentivo, em especial, à minha avó Dora, por todas as orações.

À minha orientadora, Michele Feitoza, por toda ajuda, pela amizade, por me incentivar e contribuir para a minha formação!

À minha orientadora, Kátia Christina Leandro, pelo apoio e por aceitar meu trabalho, pela confiança e por contribuir para a realização desse trabalho!

Ao meu orientador, André Mazzei, pela ajuda e orientação na realização dos ensaios.

A Anna, Lilian e Renata agradeço pelo apoio, pelo carinho e por toda torcida!

Aos amigos que já passaram e que permanecem no Setor de Artigos de Saúde, pelo auxílio na realização dos experimentos e pela amizade!

Aos amigos da turma de mestrado com quem compartilhei bons momentos de alegria e aprendizado.

A todos os meus amigos, agradeço pelo carinho, pelo incentivo, pela torcida e por compreender a minha ausência em alguns momentos!

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

A todos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde que de alguma forma contribuíram para o sucesso dessa jornada.

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Martin Luther King

RESUMO

As bolsas plásticas de sangue foram desenvolvidas para substituir os frascos de vidro, facilitando a armazenagem do sangue, reduzindo a contaminação e a ruptura da embalagem. É um produto que faz parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados do Ministério da Saúde. As bolsas de sangue são fabricadas em PVC plastificado com o di-2-etilhexil-ftalato (DEHP) e não devem liberar qualquer substância acima dos limites especificados na RDC 35/2014. Os plastificantes não são quimicamente ligados ao PVC e durante a utilização desse material médico ocorre a migração para o sangue. Após a exposição a doses elevadas de DEHP tem sido observados diversos efeitos tóxicos para a saúde humana, levando a caracterização do DEHP como um possível desregulador endócrino. Devido a isso, outros plastificantes, como di-2-etil-adipato (DEHA) tem sido utilizados pela indústria. Portanto, a determinação do teor de plastificantes apresenta grande importância devido aos seus efeitos toxicológicos. Além disso, o desenvolvimento de metodologias analíticas para análise da migração é fundamental para avaliar a exposição dos pacientes aos plastificantes durante o uso das bolsas de sangue e contribuir para a redução dos riscos à saúde do usuário. Este trabalho teve como objetivo analisar as notificações de queixas técnicas relacionadas ao produto bolsas plásticas recebidas pelo Notivisa e os resultados obtidos para amostras de bolsas de sangue submetidas ao ensaio de determinação de DEHP no INCQS de 2011 a 2016 e determinar o teor de plastificantes (DEHP e DEHA) pelos métodos espectrofotométrico (farmacopeico) e cromatográficos (CG-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD). A análise das notificações do Notivisa permitiu identificar que a bolsa para sangue foi o segundo produto com o maior número de notificações e o único que oferece alto risco para a saúde do usuário. As notificações relataram, principalmente, a ocorrência de furo/rompimento, vazamento de sangue/solução anticoagulante e colapamento de partes das bolsas e tubos, ou seja, problemas relacionados ao filme plástico que resultaram em acidentes, danos ao usuário, perda do sangue doado e desperdício de recursos públicos. A avaliação retrospectiva dos resultados do INCQS não permitiu estabelecer uma relação entre tipo de bolsa e/ou fabricante com a concentração de DEHP determinada pelo ensaio farmacopeico. A determinação do teor de plastificantes foi realizada com três amostras de bolsa de sangue de três lotes e fabricantes diferentes. Todos os métodos foram lineares nas

faixas de concentração estudadas e permitiram a detecção de DEHP e DEHA. Todas as amostras foram consideradas satisfatórias em relação à quantidade de DEHP extraível e não foi detectada a presença de DEHA nas amostras analisadas. Na comparação dos métodos pela linearidade, o teste de Mann-Whitney/Wilcoxon indicou que não há diferenças significativas entre os métodos. A utilização da técnica CLAE-CAD para determinação de DEHP em bolsas de sangue é uma inovação tecnológica e uma alternativa para a determinação de DEHP extraível, em bolsas de sangue. Além disso, o detector CAD apresenta vantagens como a capacidade de detectar substâncias que não contêm cromóforos UV-Vis ou possuem um cromóforo que absorve pouca energia, já que sua resposta é independente das propriedades químicas das substâncias.

Palavras-chave: Bolsa de Sangue. Plastificantes. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Plastic blood bags were developed to replace the glass vials, making it easier to store blood, reducing contamination and rupturing the packaging. Blood bags are made of plasticized PVC with di-2-ethylhexyl-phthalate (DEHP) and should not release any substance above the limits specified in RDC 35/2014. The plasticizers are not chemically bound to the PVC and during the use of such medical device migration into the blood occurs. After exposure to high doses of DEHP, several toxic effects on human health have been observed, leading to the characterization of DEHP as a possible endocrine disruptor. Because of this, other plasticizers, such as di-2-ethyl-adipate (DEHA) have been used by industry. Therefore, the determination of the plasticizer content is of great importance because of its toxicological effects. In addition, the development of analytical methodologies for migration analysis is critical to assess patient exposure to plasticizers during the use of blood bags and to contribute to the reduction of health risks to the user. The objective of this study was to analyze the notifications of technical complaints related to the product plastic bags received by Notivisa and the results obtained for samples of blood bags submitted to the DEHP determination test in INCQS from 2011 to 2016 and to determine the plasticizer content (DEHP and DEHA) by spectrophotometric (pharmacopoeial) and chromatographic (GC-FID, HPLC-UV and HPLC-CAD) methods. The analysis of notifications from Notivisa allowed to identify that the bag for blood was the second product with the largest number of notifications and the only one that poses a high risk to the health of the user. The reports reported mainly the occurrence of bore/rupture, blood leakage/anticoagulant solution and collapsing of parts of the bags and tubes, ie problems related to plastic film that resulted in accidents, user harm, loss of donated blood and waste of public resources. The retrospective evaluation of the INCQS results did not allow a relation between the type of pouch and/or manufacturer with the DEHP concentration determined by the pharmacopoeial test. Plasticizer content determination was performed with three blood bag samples from three different batches and manufacturers. All methods were linear in the concentration ranges studied and allowed the detection of DEHP and DEHA. All samples were considered satisfactory in relation to the amount of extractable DEHP and the presence of DEHA in the samples analyzed was not detected. In the comparison of the methods by linearity, the Mann-Whitney/Wilcoxon test indicated

that there were no significant differences between the methods. The use of the HPLC HPLC-CAD technique for the determination of DEHP in blood bags is a technological innovation and an alternative for the determination of DEHP in blood bags. In addition, the CAD detector has advantages as the ability to detect substances that do not contain UV-Vis chromophores or have a chromophore that absorbs little energy, since its response is independent of the chemical properties of the substances.

Key-words: Blood bag. Plasticizers. Health Surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Produção do PVC a partir das matérias-primas básicas	18
Figura 2	Efeito de atenuação das ligações dipolo-dipolo devido à presença da molécula de plastificante tipo ftalato em meio às cadeias poliméricas	19
Quadro 1	Tipos de plastificantes e suas propriedades principais	19
Quadro 2	Componentes obtidos a partir do sangue total	22
Figura 3	Componentes da bolsa quádrupla para sangue	22
Quadro 3	Tempo máximo de armazenamento do hemocomponente	24
Figura 4	Metabolismo do DEHP em humanos	26
Figura 5	Componentes de um cromatógrafo a gás	32
Figura 6	Componentes de um sistema para CLAE	34
Figura 7	Detector UV-Visível para CLAE	35
Figura 8	Detector CAD para CLAE	36
Figura 9	Tela de exportação de notificações do sistema Notivisa	39
Gráfico 1	Notificações de bolsas de sangue recebidas entre 2011 e 2015 agrupadas por requisito	49
Gráfico 2	Não conformidades presentes no sistema bolsa de sangue entre 2011 e 2015	51
Gráfico 3	Bolsas de sangue analisadas no INCQS no período de 2011-2016 (N=85)	53
Figura 10	Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CGAR-DIC. Condições do item 3.3.2.5	56
Figura 11	Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CLAE-UV. Condições do item 3.3.2.5	56
Figura 12	Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CLAE-CAD. Condições do item 3.3.2.5	57
Figura 13	Curva de calibração obtida por espectrofotometria UV-Visível para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL. Condições do item 3.3.2.4.	57
Figura 14	Curva de calibração obtida por CGAR-DIC para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL.	58

Condições do item 3.3.2.5.

Figura 15 Curva de calibração obtida por CLAE-UV para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL.

Condições do item 3.3.2.5.

58

Figura 16 Curva de calibração obtida por CLAE-CAD para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL.

Condições do item 3.3.2.5.

59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração das soluções de DEHP da curva de calibração e volumes medidos da solução estoque, para preparar 100 mL de cada solução de DEHP	43
Tabela 2	Programação do modo gradiente	44
Tabela 3	Quantidade de notificações por tipo de bolsa	48
Tabela 4	Bolsas de sangue analisadas no INCQS por tipo de produto	52
Tabela 5	Bolsas de sangue analisadas no INCQS por quantidade de bolsas em cada produto	54
Tabela 6	Parâmetros das curvas de calibração obtidas na faixa de 2,97 a 19,85 mg DEHP, nas condições espectrofométricas e cromatográficas. Condições dos itens 3.3.2.4 e 3.3.2.5.	59
Tabela 7	LOD estimado para os métodos analíticos	60
Tabela 8	Concentração de DEHP em mg/100mL determinadas nas soluções de migração provenientes das amostras ensaiadas, através dos diferentes métodos	61
Tabela 9	Teste de Mann-Whitney/Wilcoxon	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Assimetria
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATBC	Acetil-tri-n-butil-citrato
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i>
CG	Cromatografia com fase gasosa de alta resolução
CG-DIC	Cromatografia com fase gasosa acoplada ao detector por ionização em chama
CG-MS	Cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CH	Concentrado de hemácias
CLAE	Cromatografia com fase líquida de alta eficiência
CLAE-CAD	Cromatografia com fase líquida de alta eficiência acoplada ao detector de aerossol carregado
CLAE-UV	Cromatografia com fase líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta
CP	Concentrado de plaquetas
DCE	Dicloroetano
DEHA	Di-2-etil-adipato
DEHP	Di-2-etilhexil-ftalato
DEHT	Di(2-etil-hexil)tereftalato
DIC	Detector por ionização em chama
DINCH	1,2-ciclo-hexano-ácido-dicarboxílico-di-isononil-éster
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LOD	Limite de detecção
MEHP	Mono(2-etilhexil-ftalato)
MS	Ministério da Saúde
MVC	Monômero cloreto de vinila
N	Número de pratos teóricos
Notivisa	Sistema Nacional de Notificações em Vigilância Sanitária
PC	Plasma comum
PFC	Plasma fresco congelado

PE	Polietileno
PP	Polipropileno
ppb	Parte por bilhão
PVC	Poli(cloreto de polivinila)
QT	Queixa técnica
R	Resolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotação por minuto
ST	Sangue total
TOTM	Tri-octil-trimelitato
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
vis	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Plásticos e plastificantes em materiais médicos	17
1.2 Bolsas plásticas para sangue	20
1.2.1 Tipos e características das bolsas de sangue	22
1.2.2 Regulação das bolsas de sangue no Brasil.....	24
1.3 Efeitos toxicológicos de aditivos plastificantes	25
1.4 Métodos analíticos para determinação de plastificantes	29
1.4.1 Ensaio de migração.....	30
1.4.2 Espectrofotometria de absorção no UV-vis	31
1.4.3 Cromatografia a gás	32
1.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	33
1.4.4.1 <i>Deteção por UV-Vis</i>	33
1.4.4.2 <i>CLAE-CAD</i>	33
1.5 Justificativa	37
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 METODOLOGIA	39
3.1 Análise crítica das notificações do sistema notivisa relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015	39
3.2 Avaliação retrospectiva dos resultados obtidos para as amostras de bolsas de sangue submetidas ao ensaio de FTLATO no INCQS	40
3.3 Avaliação de plastificantes – materiais e métodos	40
3.3.1 Materiais.....	41
3.3.1.1 <i>Amostras</i>	41
3.3.1.2 <i>Vidrarias</i>	41
3.3.1.3 <i>Gases utilizados para a técnica de cromatografia com fase gasosa</i>	41
3.3.1.4 <i>Padrões e solventes</i>	41
3.3.1.5 <i>Equipamentos</i>	41
3.3.2 Métodos.....	42
3.3.2.1 <i>Preparo do solvente de extração</i>	42
3.3.2.2 <i>Ensaio de migração de plastificantes</i>	42

3.3.2.3	<i>Preparo da curva de calibração</i>	42
3.3.2.4	<i>Condições espectrofotométricas</i>	40
3.3.2.5	<i>Condições cromatográficas</i>	40
3.3.3	Técnicas analíticas	45
3.3.3.1	<i>Avaliação dos plastificantes no extrato</i>	45
3.3.3.2	<i>Limite máximo estabelecido</i>	45
3.3.3.3	<i>Avaliação da linearidade</i>	45
3.3.4	Comparação entre os métodos espectrofotométricos e cromatográficos.....	45
3.3.4.1	<i>Teste Mann-Whitney/Wilcoxon</i>	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Análise crítica das notificações do sistema notivisa relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015	48
4.2	Avaliação retrospectiva dos resultados obtidos para as amostras de bolsas de sangue submetidas ao ensaio de DEHP no INCQS (2011-2016)	52
4.3	determinação do teor dos plastificantes dehp e deha de amostras comerciais submetidas ao INCQS	55
4.3.1	Otimização das condições cromatográficas	55
4.3.2	Curvas de calibração e linearidade	57
4.3.3	Limite de Detecção.....	57
4.3.4	Curvas de calibração e linearidade	57
4.4	Comparação entre os métodos espectrofotométrico e cromatográficos	64
5	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CGAR-DIC	75
	APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CLAE-UV	76
	APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CLAE-CAD	77
	APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSAS DO DEHA E DEHP OBTIDOS POR CLAE-EM	78

1 INTRODUÇÃO

As bolsas plásticas de sangue fazem parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados, criado pelo Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2017a). Segundo a classificação de risco da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), as bolsas plásticas para sangue são produtos que oferecem alto risco à saúde do usuário (BRASIL, 2001b; ANVISA, 2017).

A Farmacopeia Europeia determina que o poli(cloreto de polivinila) (PVC) é o único tipo de plástico que pode ser empregado nos materiais médicos que utilizam sangue e suas frações (PROWSE et al, 2014; SASTRI, 2014).

Atualmente, a formulação do plástico das bolsas de sangue fabricadas em PVC plastificado com o di-2-etilhexil-ftalato (DEHP) deve estar em conformidade com o estabelecido na Farmacopeia Europeia, sob o título “materiais para recipientes de sangue humano e de componentes do sangue” (BRASIL, 2014).

A legislação vigente – Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 35 de 2014 estabelece os requisitos e os ensaios para controle da qualidade das bolsas plásticas para sangue, determinando as condições necessárias, inclusive em relação ao desempenho do plástico PVC plastificado (BRASIL, 2014).

De acordo com a RDC nº 35/2014, as bolsas plásticas devem manter-se estáveis biológica, química e fisicamente durante o período de validade e não devem permitir a entrada de microrganismos. Além disso, não devem liberar qualquer substância acima dos limites especificados nesta Resolução para a solução anticoagulante, preservadora e sangue (BRASIL, 2014).

Os plastificantes são adicionados aos plásticos para aumentar sua flexibilidade e para facilitar o processamento. Não são quimicamente ligados ao PVC e, por isso, migram do produto médico durante o contato com sangue e outras substâncias lipofílicas, o que representa um risco para a saúde do paciente (BERNARD et al, 2014; ECKERT et al, 2015).

Após a exposição a doses elevadas de ftalatos tem sido observados diversos efeitos tóxicos para a saúde humana, principalmente, relacionados ao sistema reprodutivo, levando a caracterização do DEHP como um possível desregulador endócrino (LIN et al, 2011; KASTNER et al, 2012; HAISHIMA et al, 2013).

A cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as técnicas cromatográficas mais utilizadas para

determinação de plastificantes. O estabelecimento de limites aceitáveis, o desenvolvimento e a validação de metodologias confiáveis para avaliação da migração de aditivos é fundamental para avaliar a exposição dos pacientes a esses plastificantes durante o uso do produto (BERNARD et al, 2015b; BERNARD et al, 2015c).

1.1 Plásticos e plastificantes em materiais médicos

Os materiais médicos fabricados com borracha natural, metais e vidro exigiam limpeza e reesterilização antes de serem reutilizados. A segurança, o alto desempenho, o baixo custo e a versatilidade dos plásticos¹ possibilitaram a substituição desses materiais e a fabricação de produtos médicos de uso único. Isso resultou em uma revolução dentro do setor de saúde no início dos anos 1960 (PVC MED ALLIANCE, 2018).

Os plásticos utilizados em materiais médicos devem atender a rigorosos requisitos, são eles: resistência à esterilização, resistência química aos lipídeos, caracterização de extraíveis e lixiviáveis, biocompatibilidade, hemocompatibilidade, toxicidade e estabilidade (SASTRI, 2014).

Mais de 70% de todos os plásticos usados em materiais médicos são termoplásticos², exemplos: polietileno (PE), polipropileno (PP) e PVC. Sendo o PVC o polímero utilizado em aproximadamente 40% dos produtos para saúde (SASTRI, 2014; PVC MED ALLIANCE, 2018).

O PVC contém 57% de cloro (proveniente do sal marinho) e 43% de eteno (derivado do petróleo). A reação dessas substâncias produz o dicloroetano (DCE), que é convertido no monômero cloreto de vinila (MVC). As moléculas de MVC são submetidas ao processo de polimerização, formando o PVC (Figura 1), que é um pó branco, fino e inerte (INSTITUTO DO PVC, 2017).

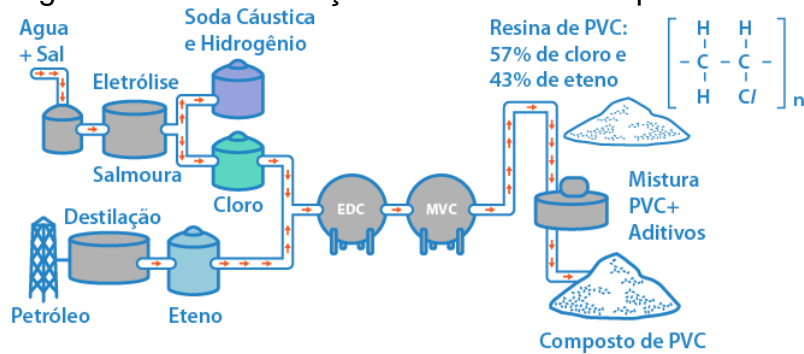
Devido às suas características físico-químicas, a resina de PVC não é processável e faz necessária a adição de substâncias, chamadas de aditivos, para melhorar o processamento e conferir ao produto final características, como

¹ Material polimérico de alta massa molar, sólido como produto acabado.

² Plásticos com a capacidade de amolecer e fluir quando sujeitos a um aumento de temperatura e pressão. Quando estes são retirados, o polímero solidifica-se adquirindo a forma do molde. Novas aplicações de temperatura e pressão produzem o mesmo efeito de amolecimento e fluxo, portanto, é uma transformação física, reversível.

rigidez/flexibilidade, transparência, coloração, estabilidade térmica, radiopacidade entre outras (BRASKEM, 2006; INSTITUTO DO PVC, 2017).

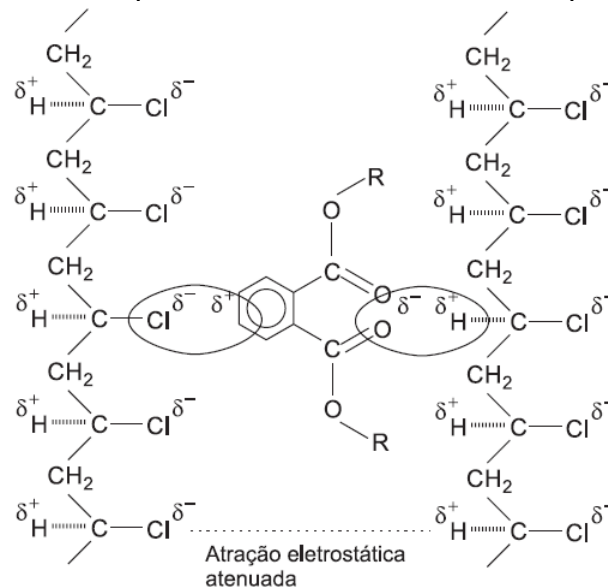
Figura 1 – Produção do PVC a partir das matérias-primas básicas



Fonte: (INSTITUTO DO PVC, 2017).

Os aditivos plastificantes são substâncias orgânicas de baixo peso molecular que são adicionadas ao PVC para melhorar a flexibilidade do produto acabado. Eles estão dispersos entre as moléculas do polímero, formando apenas fracas interações. A ação do plastificante consiste em reduzir a intensidade das ligações entre as moléculas do polímero (Figura 2). Estas ligações são chamadas de força de Van der Waals e conferem elevada rigidez ao PVC. A redução dessas forças diminui a atração intermolecular, aumentando a flexibilidade da cadeia polimérica e alterando as condições de processamento e as propriedades do produto final, como dureza, temperatura de amolecimento e flexibilidade (BRASKEM, 2006; CANEVAROLO, 2006; SASTRI, 2014).

Figura 2 – Efeito de atenuação das ligações dipolo-dipolo devido à presença da molécula de plastificante tipo ftalato em meio às cadeias poliméricas



Fonte: (BRASKEM, 2006).

Existem dois tipos de plastificantes: o plastificante primário (que melhora o alongamento e a suavidade do plástico) e o plastificante secundário ou extensor (que aumenta o efeito de plastificação e a compatibilidade do plastificante primário com os outros componentes da resina). O tipo de plastificante utilizado é selecionado de acordo com os parâmetros necessários para cada aplicação (Quadro 1) (BRASKEM, 2006; SASTRI, 2014). O quadro 1 lista os vários tipos de plastificantes que são usados e também descreve algumas das suas propriedades:

Quadro 1 – Tipos de plastificantes e suas propriedades principais

Família de plastificante	Características
Adipatos	Melhora o desempenho em baixas temperaturas e menores viscosidades. Tem maiores taxas de migração e volatilidade em relação aos ftalatos.
Citratos	Usado para plastificar resinas vinílicas utilizadas em dispositivos médicos e embalagens. Tem maior estabilidade ao calor e não descolore durante a composição.
Ésteres de fosfato	Fornecer retardamento à chama; tem fracas propriedades de migração; melhora o desempenho em baixa temperatura.
Ftalatos	É o plastificante mais utilizado, devido às excelentes propriedades plastificantes e ao custo efetivo.
Sebacatos	Melhor desempenho em baixa temperatura do que adipatos; usado em aplicações externas extremamente exigentes.
Ésteres trimetilato	Baixa volatilidade e baixa migração.
Plastificantes secundários	Usado para melhorar o desempenho dos plastificantes primários. Ex.: parafinas cloradas, óleo de soja epoxidado (ESBO) e óleo de linhaça epoxidado (ELO).

Fonte: (Adaptado de SASTRI, 2014).

Os ftalatos são os plastificantes mais importantes e mais utilizados na indústria do PVC, especialmente DEHP. O DEHP exhibe boa compatibilidade, baixa volatilidade, alta resistência à água e aos métodos de esterilização, boas propriedades elétricas e uma excelente relação custo-desempenho. Além disso, o plastificante proporciona alta transparência ao PVC, o que é especialmente importante para aplicações de dispositivos médicos. Os principais produtos médicos que contêm ftalatos são: recipientes (bolsas flexíveis para fluidos, soluções intravenosas ou nutricionais, sangue e plasma), tubulações flexíveis (tubos de infusão, endotraqueais e cateteres) e dispositivos de proteção (luvas e máscaras de oxigênio) (BRASKEM, 2006; SASTRI, 2014).

A interação de vários aditivos em uma formulação pode afetar a forma como o material interage com fluidos corporais, órgãos e tecidos. Assim, cada combinação de um material deve ser testada quanto a extraíveis, lixiviados, biocompatibilidade e toxicidade. É preciso ter cuidado na escolha da combinação de aditivos, para que atendam aos requisitos de desempenho e também às especificações relacionadas à resistência química, esterilização, biocompatibilidade e toxicidade. Portanto, é o desempenho e a conformidade do produto acabado que devem ser testados de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001a; SASTRI, 2014).

A indústria de plastificantes vem desenvolvendo alternativas para o uso de DEHP em produtos médicos. Atualmente, outros plastificantes como o TOTM, di(2-etil-hexil)tereftalato (DEHT), 1,2-ciclo-hexano-ácido-dicarboxílico-di-isononil-éster (DINCH), di-2-etil-adipato (DEHA) e acetil-tri-n-butil-citrato (ATBC) estão sendo propostos para aplicação em tubos de infusão e bolsas de sangue (BERNARD et al, 2014; PLASTICIZERS, 2018).

1.2 Bolsas plásticas para sangue

O sangue é um tecido vivo produzido na medula óssea e composto por plasma, hemácias, leucócitos e plaquetas. É responsável pelo transporte de oxigênio e nutrientes aos tecidos, combate/eliminação de infecções do organismo e controle de sangramentos (FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE, 2017).

A circulação sanguínea foi inicialmente descrita por William Harvey em 1627 e permitiu o desenvolvimento dos primeiros estudos sobre a prática transfusional com a utilização de sangue de animais. A primeira transfusão de sangue humano foi

realizada em 1818 por James Blundell e permitiu concluir que somente o sangue de humanos poderia ser utilizado em humanos. Porém, reações graves e até a morte de pacientes após a transfusão ainda ocorriam devido a problemas com a coagulação do sangue e reações adversas. Apenas no século XX, com a descoberta do sistema ABO e do citrato de sódio, como anticoagulante, as transfusões se tornaram mais seguras e foi possível armazenar o sangue (BRASIL, 2013a; FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE, 2017).

Dessa forma em 1918, durante a Primeira Guerra Mundial, foi possível realizar a primeira transfusão com sangue armazenado há 26 dias. A descoberta das soluções anticoagulantes e conservantes e aperfeiçoamento dos equipamentos de refrigeração permitiu a organização dos centros de armazenamento de sangue. Assim, o primeiro banco de sangue surgiu em Barcelona, em 1936, durante a Guerra Civil Espanhola (BRASIL, 2013a; FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE, 2017).

A bolsa plástica para sangue foi inventada em 1947, licenciada e introduzida no mercado na década de 60. Desenvolvida para substituir o frasco de vidro, permitiu o fracionamento do sangue e facilitou a armazenagem, além de reduzir a contaminação microbiana, a perda do sangue pela quebra dos frascos e o risco de embolia durante a transfusão (PROWSE et al 2014; SERRANO et al, 2015).

As bolsas de sangue são produtos para saúde que de acordo com a classificação de risco associado à utilização dos dispositivos médicos, são consideradas como produtos de classe III, pois oferecem alto risco à saúde do usuário (BRASIL, 2001b; ANVISA, 2017).

Como é um insumo essencial para a hemoterapia, as bolsas de sangue fazem parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados, criado pelo MS (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2017a). No Brasil, foram realizadas 3.720.867 doações de sangue em 2015 (BRASIL, 2017b). Portanto, a ocorrência de desvios da qualidade neste produto pode comprometer um grande número de pessoas, causando um grande impacto em saúde pública.

A coleta de sangue pode ser realizada por meio de coleta do sangue total, forma mais comum, ou por aférese³ e dá origem aos hemocomponentes e hemoderivados. As bolsas de sangue total (ST) obtidas na coleta são processadas

³Processo que consiste na obtenção de determinado componente sanguíneo de doador único, utilizando equipamento específico (máquina de aférese), com retorno dos hemocomponentes remanescentes à corrente sanguínea.

por meio de processos físicos (centrifugação, congelamento) para obtenção de um ou mais hemocomponentes (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015), conforme observado no Quadro 2.

Quadro 2 – Componentes obtidos a partir do sangue total

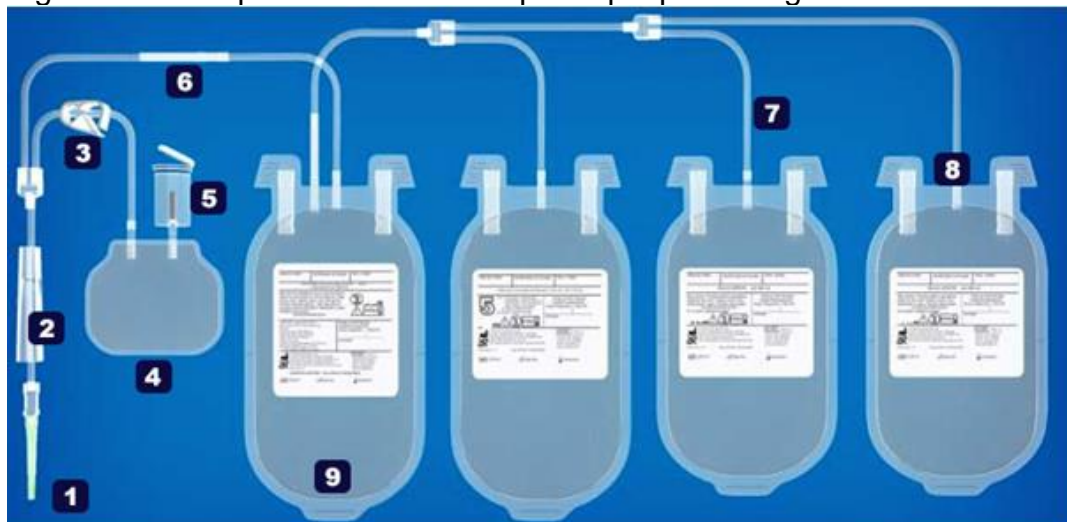
HEMOCOMPONENTES	COMPOSIÇÃO
Concentrado de hemácias (CH)	Hemácias, plasma em pequeno volume, leucócitos e plaquetas em pequena quantidade.
Plasma Fresco Congelado (PFC)	Plasma com todos os fatores de coagulação preservados
Concentrado de Plaquetas (CP)	Plaquetas, plasma em pequeno volume e leucócitos
Crioprecipitado	Fibrinogênio, fatores de coagulação VIII e XIII, plasma e fator von Willebrand.

Fonte: (BRASIL, 2015).

1.2.1 Tipos e características das bolsas de sangue

As bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano consistem em um sistema fechado formado por um recipiente estéril e apirogênico, com tubo de coleta, agulha e tubos de saída. De acordo com o modelo da bolsa, elas também podem conter soluções anticoagulantes e/ou preservadoras, tubos de transferência e recipientes associados (BRASIL, 2014). A Figura 3 apresenta as principais partes e componentes de uma bolsa para coleta de sangue.

Figura 3 – Componentes da bolsa quádrupla para sangue



- 1 - Agulha
- 2 - Protetor de agulha: sistema retrátil que recobre a agulha após a coleta
- 3 - Clamp: isola a bolsa para coleta de amostras
- 4 - Bolsa para coleta de amostra
- 5 - Link: dispositivo para coleta de amostra a vácuo
- 6 - Interruptor de tubo: impede o fluxo entre as bolsas
- 7 - Tubos
- 8 - Tear-off: protege o conector/himen da bolsa
- 9 - Bolsa

Fonte: (adaptado de JPFARMA, 2016).

Conforme observado na Figura 3, há dois tipos de bolsa para coleta de sangue, a bolsa coletora ou de transferência e a bolsa satélite. A bolsa de transferência é isenta de soluções anticoagulantes/preservadoras e destinada para transferência do sangue/componentes coletado do doador. Enquanto a bolsa satélite possui a função de armazenar os hemocomponentes após o processamento do sangue (BRASIL, 2014).

Os sistemas de bolsas sempre apresentam uma bolsa de transferência e podem também conter de 1 a 3 bolsas satélites. A escolha do tipo de bolsa está relacionada com o hemocomponente desejado, podendo ser: bolsa simples (para coleta de sangue total), bolsa dupla (para concentrado de hemácias e plasma), bolsa tripla (para concentrado de hemácias, plasma, plaquetas ou crioprecipitado) ou bolsa quádrupla (para concentrado de hemácias, plasma, plaquetas e crioprecipitado) (BRASIL, 2013a).

Em relação à embalagem, o PVC é o único tipo de plástico que pode ser empregado nos materiais médicos que utilizam sangue e seus componentes, pois é necessário um plástico transparente para permitir a avaliação visual e que seja forte o suficiente para suportar o processo de centrifugação e a pressão de infusão, além de ser resistente às temperaturas de esterilização e de congelamento do plasma (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013; PROWSE et al, 2014; SASTRI, 2014).

Atualmente, a formulação do plástico das bolsas de sangue deve atender aos limites da Farmacopeia Europeia (2013), sob o título “materiais para recipientes de sangue humano e de componentes do sangue” (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013; BRASIL, 2014), tendo como formulação até:

- 55% de PVC,
- 40% de DEHP ou tri-octil-trimelitato (TOTM),
- 10% de óleo de soja ou linhaça epoxidados,
- 1% de diacetilenodiamina,
- 1% de estearato cálcio ou zinco.

As bolsas plásticas são agrupadas por tipo de solução anticoagulante e/ou solução preservadora e por tipo de plástico (BRASIL, 2014). A composição da

solução e a permeabilidade do filme plástico interferem diretamente no tempo de armazenamento do sangue (BRASIL, 2013b).

O tipo de plastificante define a permeabilidade do filme de PVC aos gases. Devido ao alto consumo de oxigênio pelas plaquetas, é necessário um plastificante que aumente a permeabilidade do filme plástico, enquanto os glóbulos vermelhos tem sua viabilidade comprometida em presença de grandes quantidades de oxigênio, tornando-se inadequado para transfusão. Dessa forma, o filme de PVC produzido contendo DEHP é utilizado em bolsas para coleta de células vermelhas e componentes, enquanto o TOTM é usado somente em bolsa para coleta de plaquetas (ADORNI, 2008; PROWSE et al, 2014). O quadro 2 apresenta o tempo máximo de armazenamento permitido para os hemocomponentes:

Quadro 3 – Tempo máximo de armazenamento do hemocomponente

Hemocomponente	Prazo de validade
Concentrado de hemácias (CH)	21 dias em solução ACD/CPD/CP2D 35 dias em solução CPDA-1 42 dias em solução SAG-M (armazenados à temperatura de $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
Concentrado de hemácias congeladas	10 anos
Plasma fresco congelado (PFC)	12 meses (armazenado em temperatura entre -20°C e -30°C) 24 meses (armazenado à temperatura de -30°C ou inferior)
Plasma comum (PC) - (plasma não fresco, plasma normal ou plasma simples)	5 anos à temperatura igual ou inferior a -20°C (exclusivamente destinado à produção de hemoderivados)
Crioprecipitado (CRIO)	12 meses (armazenado em temperatura entre -20°C e -30°C) 24 meses (armazenado à temperatura de -30°C ou inferior)
Concentrado de plaquetas (CP)	3 a 5 dias (dependendo do plastificante da bolsa de conservação)

Fonte: (BRASIL, 2011).

1.2.2 Regulação das bolsas de sangue no Brasil

A utilização das bolsas plásticas deveria garantir maior segurança ao paciente do que os frascos de vidro utilizados anteriormente. Porém, como as fábricas nacionais funcionavam em condições muito precárias, ocorreram diversos problemas transfusionais por contaminação bacteriana ou química (até mesmo pelo material das bolsas) que resultaram na interdição de todas as fábricas de bolsas plásticas no Brasil em outubro de 1986 (SANTOS, MORAES e COELHO, 1992).

Isso evidenciou a necessidade de garantir a qualidade das bolsas para sangue humano e resultou na publicação de diversas portarias e resoluções. Entre

elas é preciso destacar a Portaria nº 950/MS/SVS de 1998⁴ e a Resolução/Anvisa nº 9 de 1999⁵ que estabeleceram, respectivamente, os requisitos mínimos que deveriam ser apresentados pelo produto e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 1998; BRASIL, 1999).

Estudos realizados por Fust (2009 e 2011) e Vale (2010 e 2012) no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) levaram à determinação de alguns parâmetros do controle da qualidade descritos na legislação vigente – RDC nº 35 de 2014. Essa resolução estabelece os requisitos e os ensaios para controle da qualidade das bolsas plásticas para sangue humano e suas frações, determinando as condições necessárias, inclusive em relação ao desempenho do plástico PVC plastificado com o DEHP, TOTM ou outros que venham a ser aprovados pela Anvisa (BRASIL, 2014).

De acordo com esse regulamento, as bolsas plásticas devem ser transparentes, sem pigmentos ou corantes, flexíveis, estéreis, apirogênicas, isentas de toxicidade, resistentes nas condições de uso e compatíveis com o conteúdo sob condições normais de estocagem, devem manter-se estáveis biológica, química e fisicamente em relação ao seu conteúdo durante o período de validade e não devem permitir a entrada de microrganismos. Além disso, não devem liberar qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante/preservadora ou para o sangue e suas frações (BRASIL, 2014).

As bolsas plásticas para sangue devem obrigatoriamente estar em conformidade com a RDC nº35/2014 para obtenção e revalidação do registro na Anvisa. A conformidade destes produtos deve ser comprovada por laudos técnicos emitidos pelo INCQS após análise prévia. Para fins de registro, as bolsas plásticas devem ser agrupadas por tipo de solução anticoagulante e/ou solução preservadora e por tipo de plástico (BRASIL, 2014).

1.3 Efeitos toxicológicos de aditivos plastificantes

O grande uso de DEHP levou à investigação sobre a toxicidade desse plastificante. Além disso, desde o início dos anos 1970, a segurança do DEHP em sistemas de bolsa de sangue passou a ser questionada, quando quantidades

⁴ Essa portaria foi revogada pela RDC nº 35 de 2014.

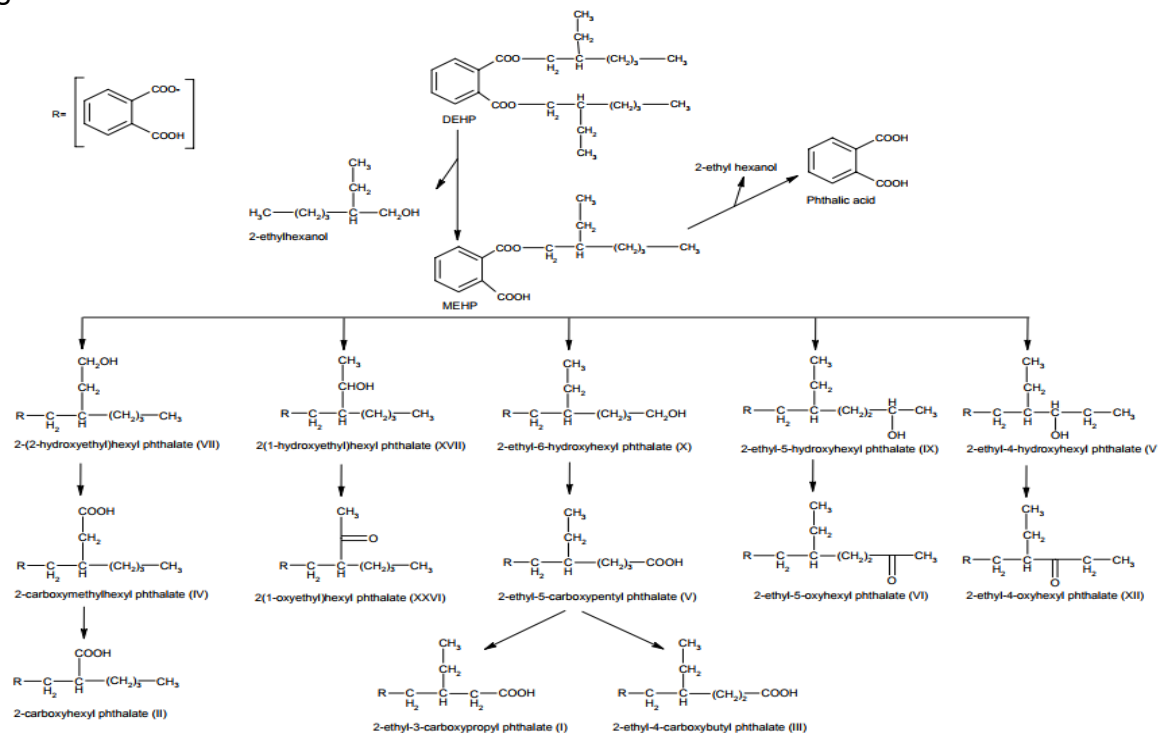
⁵ Regulamento técnico de BPF vigente.

consideráveis desse plastificante foram encontradas em tecidos de pacientes que receberam transfusão (PROWSE et al, 2014; SALLOUM et al, 2015).

A contaminação por DEHP pode ocorrer através das vias intravenosa, oral, dérmica e respiratória. Apesar da principal via de exposição para DEHP da população em geral ser através dos alimentos, o mais intenso grau de exposição ocorre no ambiente hospitalar, devido aos diversos materiais médicos produzidos com PVC plastificado com DEHP que são utilizados em procedimentos como diálise, terapia respiratória, transfusões de sangue ou terapia nutricional parenteral (ERYTHROPEL et al, 2014).

O metabolismo do DEHP envolve diversas reações e produz muitos metabólitos. A primeira etapa do metabolismo é a hidrólise de DEHP por esterases, formando mono(2-etilhexil-ftalato) (MEHP) (metabólito principal) e 2-etil-hexanol (Figura 4). Essas esterases estão presentes na mucosa intestinal, fígado, rins, pulmões, pele, plasma e, principalmente, no pâncreas. A maior parte do MEHP sofre reações de oxidação da cadeia lateral e após conjugação com ácido glicurônico são eliminados. O 2-etil-hexanol também é metabolizado por reações de oxidação e produz metabólitos semelhantes aos da via de β -oxidação, que são excretados na urina (ATSDR, 2002).

Figura 4 – Metabolismo do DEHP em humanos



Fonte: (ATSDR, 2002).

A farmacocinética complexa do DEHP pode ser a responsável variabilidade do metabolismo e o acúmulo extravascular de DEHP nos tecidos adiposos. Dessa forma, variações individuais nas funções hepáticas, devido à indução enzimática ou inibição competitiva das enzimas hepáticas por drogas podem modificar o metabolismo do DEHP (BUCHTA et al, 2005).

Estudos utilizando macacos analisaram a distribuição de DEHP após a administração parentérica. Após a administração intravenosa, a concentração de DEHP foi de 4,257 µg/g nos pulmões; 17 µg/g no fígado; 5 µg/g nos testículos; e 4 µg/g nos rins. Após a administração intraperitoneal, as concentrações de DEHP encontradas no pulmão, no fígado, nos rins e nos testículos foram aproximadamente 265, 80, 60, e 15 µg/g, respectivamente. Portanto, os pulmões foram os principais tecidos onde o DEHP ficou armazenado, possivelmente devido à obstrução dos capilares alveolares pela emulsão utilizada como veículo para administração do plastificante (ATSDR, 2002).

Nas bolsas de sangue, ocorre a formação de MEHP, assim, o paciente é exposto ao DEHP e MEHP. A exposição ao DEHP através da via parenteral não passa pelas esterases intestinais, fazendo com que entre na circulação sistêmica uma maior proporção de DEHP em vez de MEHP. Assim, inicialmente, há mais DEHP do que MEHP no sangue, porém, o nível de DEHP diminui rapidamente com uma meia-vida de 10 horas e o nível de MEHP aumenta. Entre as exposições, o DEHP e o MEHP desaparecem do sangue, enquanto as concentrações de ácido fólico aumentam, indicando que o tempo de exposição está mais correlacionado com a concentração de ácido fólico no sangue do que com os níveis de DEHP ou MEHP (ATSDR, 2002; FDA, 2014).

As principais vias de eliminação são a urina e a bile, mas o DEHP também é transferido para o leite materno. A eliminação desse plastificante é dependente da quantidade de DEHP administrada, da idade e do sexo do paciente (ATSDR, 2002).

A exposição ao DEHP no ambiente hospitalar não representa um grande risco para a população, pois geralmente é uma exposição aguda. Porém, pessoas com certas condições médicas que requerem tratamento regular, como neonatos, gestantes, pacientes em diálise e hemofílicos, estão em maior risco devido à exposição mais frequente a altos níveis de DEHP (FDA, 2014; ERYTHROPEL et al, 2014; PROWSE et al, 2014).

Os procedimentos médicos que causam elevada exposição ao DEHP são: hemodiálise em longo prazo em adultos (3,1 mg/kg/dia), transfusão de sangue a longo prazo em crianças (0,075 mg/kg/dia), transfusões em recém-nascidos (1,7 mg/kg/dia), e a oxigenação extracorporeal em crianças (EC, 2008).

Estudos demonstraram que durante a plaquetaférese, uma quantidade considerável de DEHP é liberada dos kits de aférese para o sangue do doador. O produto final é armazenado no plasma doador, levando à contaminação por DEHP. A carga de DEHP nos PCs é composta de contaminação primária, que ocorre durante a plaquetaférese, e contaminação secundária durante o armazenamento. (BUCHTA et al, 2005).

Alguns estudos demonstraram que a transfusão de plaquetas armazenadas em embalagens de PVC plastificado resultou em níveis sanguíneos de DEHP que caíram a uma taxa média de 2,83% por minuto e uma meia-vida de 28 minutos. Medições em pacientes submetidos a mais de 50 sessões de hemodiálise indicaram que a maior parte do DEHP presente no soro no final de uma sessão de diálise era eliminada em 5-7 horas (ASTDR, 2002).

O DEHP apresenta vantagens para o armazenamento de sangue, pois ele migra das bolsas e estabiliza a membrana dos eritrócitos, resultando em menores níveis de hemólise. Porém, a preocupação com a toxicidade desse plastificante não compensa os benefícios (PROWSE et al, 2014; SERRANO et al, 2015).

Muitos estudos investigaram a toxicidade do DEHP e observaram diversos efeitos tóxicos em humanos, principalmente, relacionados ao sistema reprodutivo, como alterações dos níveis de estradiol e testosterona, redução da contagem de espermatozoides e alterações histológicas nos testículos, levando a caracterização do DEHP como um possível desregulador endócrino (LIN et al, 2011; HAISHIMA et al, 2013).

Recentemente, Wen et al (2017) confirmaram os efeitos antiandrogênicos do DEHP ao observar que a exposição pré-natal e infantil está associada com a diminuição dos níveis de testosterona, testosterona livre, estradiol e progesterona. Além dos efeitos sobre os hormônios sexuais, a exposição precoce a ftalatos também foi associada à sensibilidade alérgica e ao aumento da prevalência de asma em crianças (KU et al, 2015).

Em 2008, a União Europeia (UE) classificou o DEHP como substância CMR 1B (carcinogênica, mutagênica ou tóxica para a reprodução). Devido a isso, a

França proibiu, em 2012, a utilização de DEHP em vários dispositivos médicos e a UE, em 2015, determinou que o DEHP seja banido dos equipamentos médicos elétricos e eletrônicos até 2021 (FRANÇA, 2012; EC, 2015; FRANÇA, 2015).

1.4 Métodos analíticos para determinação de plastificantes

Os plastificantes não são quimicamente ligados ao PVC, assim, durante a utilização do material médico ocorre a migração para o sangue, para substâncias lipofílicas e misturas de nutrição enteral/parenteral, levando à exposição indesejada e representando um risco para a saúde do paciente (EC, 2008; FDA, 2014).

A migração consiste na perda do plastificante por transferência entre duas superfícies que estão em contato (BRASKEM, 2002) e pode ser avaliada através de métodos analíticos para determinação da concentração de plastificante na matriz do produto, em solventes simulantes ou através da análise dos plastificantes/metabólitos em material biológico (BERNARD et al, 2014; ECKERT et al, 2015).

Os métodos analíticos para análise de plastificante na matriz de PVC são divididos em diretos e indiretos. Eles devem permitir a determinação e a quantificação do plastificante, além de apresentar sensibilidade o suficiente para detectar possíveis contaminantes que estejam presentes na resina polimérica (BERNARD et al, 2014).

Os métodos diretos geralmente não são sensíveis e dependem de características dos polímeros, como flexibilidade térmica, características espectrais e eletromagnéticas. São eles: análise termogravimétrica, calorimetria de varredura diferencial, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectroscopia de infravermelho (BERNARD et al, 2014).

Os métodos indiretos para a identificação de plastificantes são a CGAR e a CLAE, técnicas analíticas utilizadas no presente estudo. Essas técnicas são as mais utilizadas para determinação de ftalatos e são precedidas por diferentes procedimentos de extração que incluem a técnica de Soxhlet, a extração com solvente ou a dissolução do polímero (BERNARD et al, 2014; BERNARD et al, 2015a).

A extração com solvente é uma alternativa eficiente e simples com boas taxas de recuperação. O mecanismo deste procedimento de extração baseia-se em um

processo de transferência de solutos da fase sólida para a solução e depende de diversas propriedades físicas como difusão, viscosidade, coeficiente de partição, solubilidade e tensão superficial. Portanto, a escolha do solvente é um fator que determina a eficiência da extração (BRASKEM, 2002; BERNARD et al, 2015a).

1.4.1 Ensaio de migração

Os limites aceitáveis e a metodologia dos testes de migração para diversos aditivos utilizados em embalagens plásticas para alimentos já foram determinados. Porém, esses parâmetros ainda não foram estabelecidos para os produtos para a saúde, tornando a avaliação de risco mais difícil, já que não é possível avaliar a exposição dos pacientes a estes plastificantes durante o uso do material médico (BERNARD et al, 2015b; BERNARD et al, 2015c).

O teste de migração é baseado na simulação das condições reais de utilização, sendo importante utilizar condições semelhantes à prática clínica, a fim de avaliar os riscos associados a cada plastificante durante o uso específico de cada material médico (BERNARD et al, 2015b; BERNARD et al, 2015c). Devido à variedade de produtos e a dificuldade para realizar estudos em pacientes voluntários, os testes são realizados utilizando um meio de contato alternativo, chamado de solvente simulante (LUO et al, 2014).

Como alternativa para o sangue, a Farmacopeia Europeia adotou uma solução de água e etanol (com densidade entre 0,9373 a 0,9378 g/mL) como solvente simulante para extração do DEHP de bolsas de sangue. As bolsas de sangue devem ser preenchidas até metade do seu volume com esta solução e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 60 ± 1 minutos, após esse período, é realizada a determinação da quantidade de DEHP presente na solução utilizando um espectrofotômetro UV-vis (FARMACOPEIA EUROPEIA, 2013).

Existem vários métodos de análise que podem ser usados para determinar quantitativamente o DEHP extraído, incluindo espectrofotometria de absorção no UV-vis, CGAR e CLAE com diversos tipos de detectores. Devido aos diversos materiais médicos feitos com PVC no mercado, não há nenhum método de avaliação universal para todos esses produtos (LUO et al, 2014).

A RDC nº35/2014 determina que o ensaio de determinação do teor de DEHP em bolsas de sangue seja realizado por espectrofotometria UV, conforme a

metodologia descrita na Farmacopeia Europeia (BRASIL, 2014). Assim, não devem ser excedidos os seguintes limites para o DEHP extraível:

- I - até 10 mg/100 mL para recipientes de capacidade entre 300 mL e 500 mL;
- II - até 13mg/100 mL para recipientes de capacidade entre 150 mL e 300 mL;
- III - até 14 mg/100 mL para recipientes de capacidade menor que 150 mL.

1.4.2 Espectrofotometria de absorção no UV-vis

A técnica de espectrofotometria de absorção é baseada na quantidade de luz absorvida pelas moléculas em função do comprimento de onda, podendo ser utilizada como técnica de identificação e quantificação de substâncias. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho (SKOOG et al, 2006).

Restringindo esta abordagem para o detector envolvido neste estudo, temos a espectrofotometria de absorção na região do UV-vis.

As moléculas ao absorverem energia sofrem uma transição para um estado excitado (estado de maior energia). Na região do ultravioleta e visível, essas transições eletrônicas ocorrem em porções da molécula chamadas de cromóforos e são medidas por espectrofotômetros. Esses equipamentos são constituídos por fonte de radiação; seletor de comprimento de onda; celas de absorção (cubetas); detector de radiação e uma unidade de leitura e de processamento de sinal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

No caso da espectrofotometria UV-vis, a amostra é colocada na cubeta que é inserida no caminho óptico do aparelho e atravessada pela luz UV e/ou visível em determinado comprimento de onda. Então, o espectrofotômetro mede a transmissão, que é a medida da diminuição da intensidade da radiação em determinado comprimento de onda quando a radiação passa através da amostra. Em seguida, a transmissão é convertida em absorbância que é diretamente proporcional à concentração da espécie responsável pela cor (SKOOG et al, 2006).

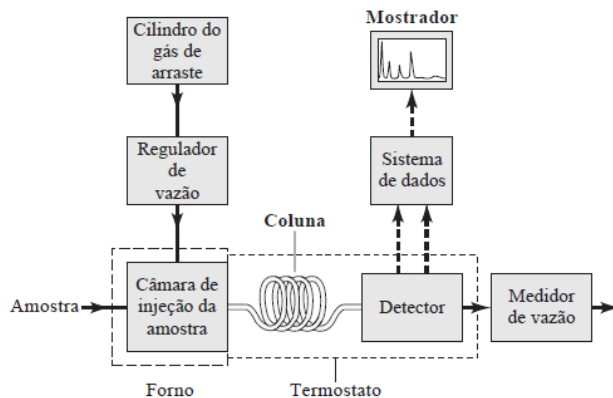
Para usar a absorbância com finalidade analítica, é necessário produzir uma curva de calibração através da medida da absorbância de várias soluções com concentrações conhecidas do analito (soluções-padrão). Essa curva é então utilizada para determinar a concentração das soluções desconhecidas (SKOOG et al, 2006).

1.4.3 Cromatografia a gás

A cromatografia gás-líquido é uma técnica de separação cromatográfica baseada na distribuição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel inerte (gás de arraste) e a fase estacionária presente na coluna, que permite a separação de substâncias relativamente voláteis e termicamente estáveis por um processo de distribuição contracorrente dinâmico, que resulta em uma retenção maior ou menor devido a fenômenos de sorção e desorção sobre a fase estacionária (SKOOG et al, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O cromatógrafo a gás consiste em sistema de gás de arraste, câmara de injeção de amostra, coluna cromatográfica contida em um forno, detector e sistema de aquisição de dados, conforme apresentado na Figura 5 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 5 - Componentes de um cromatógrafo a gás



Fonte: (SKOOG, 2006).

O sistema de gás de arraste controla a pressão e o fluxo do gás de arraste que circula pela coluna e segue para o detector. A amostra pode ser injetada diretamente na coluna ou vaporizada na câmara de injeção e misturada no gás de arraste antes de entrar na coluna. O processo de injeção da amostra influencia na eficiência da coluna e na qualidade da resolução dos sinais cromatográficos obtidos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Na cromatografia a gás, a coluna pode ser de dois tipos: colunas recheadas e colunas capilares, sendo as colunas capilares mais eficientes e rápidas. São construídas de aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou Teflon e apresentam diversas dimensões de comprimento e diâmetro interno (SKOOG et al, 2006). Na coluna, os

componentes da amostra são separados de acordo com o índice de retenção linear, que é dependente da pressão de vapor e do grau de interação com a fase estacionária (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O índice de retenção é temperatura-dependente e define a resolução, o tempo de retenção e a eficiência da coluna em relação aos componentes da amostra. Dessa forma, a coluna deve ser abrigada em um forno termostatizado, já que a temperatura da coluna é uma variável importante para obter boa precisão (SKOOG et al., 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O tempo de eluição é característico da substância e da resposta do instrumento. Ele é medido como a área ou a altura do sinal e é influenciado pela concentração do analito. De acordo com o tempo de retenção, os compostos saem separados da coluna e passam pelo detector, gerando um cromatograma, que consiste em uma série de sinais no eixo do tempo, onde cada sinal representa uma substância presente na amostra (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O tipo de detector a ser utilizado depende da natureza dos compostos a serem analisados. Limitando esta abordagem para detector envolvido neste estudo, temos o detector por ionização em chama (DIC).

Nesse detector, o efluente da coluna é direcionado para uma chama de ar/hidrogênio que realiza a pirólise da maioria dos compostos orgânicos, produzindo íons. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses íons, que é medida com um picoamperímetro. O número de íons produzidos é proporcional ao número de átomos de carbono reduzidos na chama, o que torna esse detector sensível à massa em vez da concentração (SKOOG et al, 2006).

Dessa forma, a cromatografia com fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (CGAR-DIC) exhibe vantagens como alta sensibilidade, larga faixa linear de resposta e baixo ruído. Porém, a destruição da amostra durante a etapa de combustão é uma desvantagem dessa técnica (SKOOG et al, 2006).

1.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

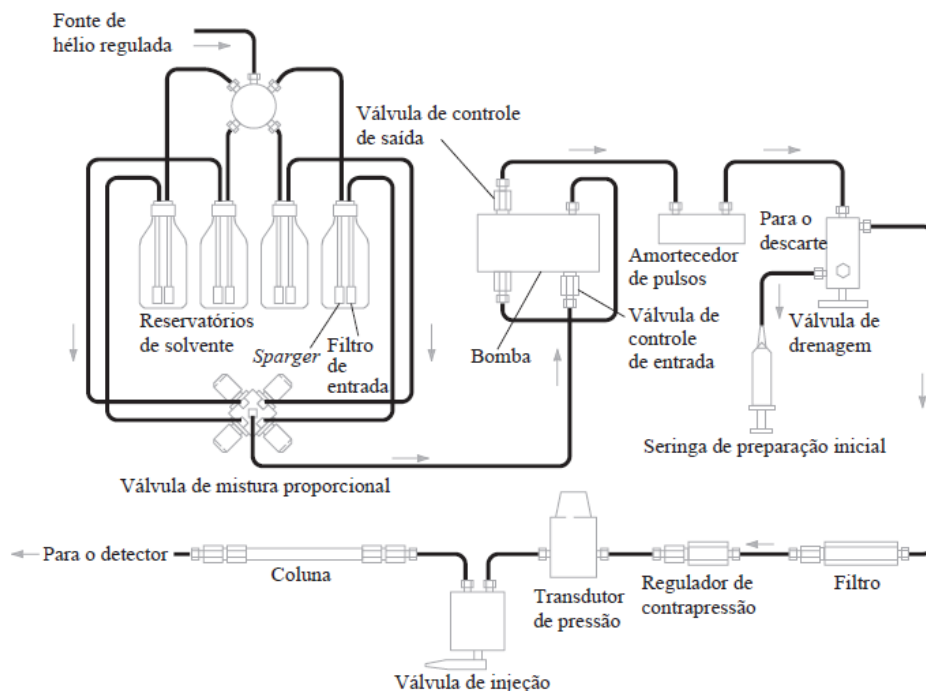
A CLAE é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma amostra entre uma fase estacionária e uma fase líquida móvel que permite separações por partição, adsorção, exclusão por tamanho ou troca

iônica, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária. A CLAE surgiu como uma alternativa para a cromatografia líquida tradicional, possibilitando a redução do tempo de análise. Além disso, a CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia a gás, pois permite a análise de amostras não voláteis e termolábeis (SKOOG et al, 2006).

Os componentes do cromatógrafo consistem em sistema de bombeamento de fase móvel, injetor de amostra, coluna cromatográfica com forno, detector e sistema de captura de dados (SKOOG et al, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010), conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Componentes de um sistema para CLAE



Fonte: (SKOOG, 2006).

O sistema de bombeamento realiza a pressurização e vazão de volumes programados da fase móvel presente nos reservatórios, enquanto a amostra é injetada no sistema cromatográfico manualmente ou por injeção automática. A separação ocorre na coluna cromatográfica que, normalmente, é feita de aço

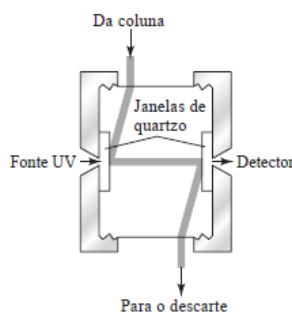
inoxidável e apresenta diversas dimensões de comprimento e diâmetro interno. A vida útil da coluna cromatográfica pode ser aumentada através da utilização de colunas de proteção ou pré-colunas que removem materiais particulados e contaminantes (SKOOG et al, 2006).

Restringindo esta abordagem para os métodos de detecção envolvidos neste estudo, temos a cromatografia com fase líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV) e a cromatografia com fase líquida de alta eficiência acoplada ao detector de aerossol carregado (CLAE-CAD).

1.4.4.1 Detecção por UV-Vis

O detector de UV-vis (Figura 7) apresenta uma célula de fluxo no término da coluna cromatográfica que permite a detecção de compostos com grupamento cromóforo. A radiação ultravioleta atravessa a célula de fluxo e é recebida no detector. Dessa forma, quando as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, resultando em alterações no nível de energia da molécula (CROMATOGRAFIA, 2010).

Figura 7 – Detector UV-Visível para CLAE



Fonte: (SKOOG, 2006).

O sistema de captura de dados recebe os sinais enviados pelo detector e gera os cromatogramas. A interpretação dos sinais cromatográficos deve considerar a avaliação de alguns parâmetros que asseguram um desempenho adequado do processo cromatográfico, como: tempo de retenção, fator de retenção, fator de assimetria (A), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e altura equivalente de prato teórico (CROMATOGRAFIA, 2010).

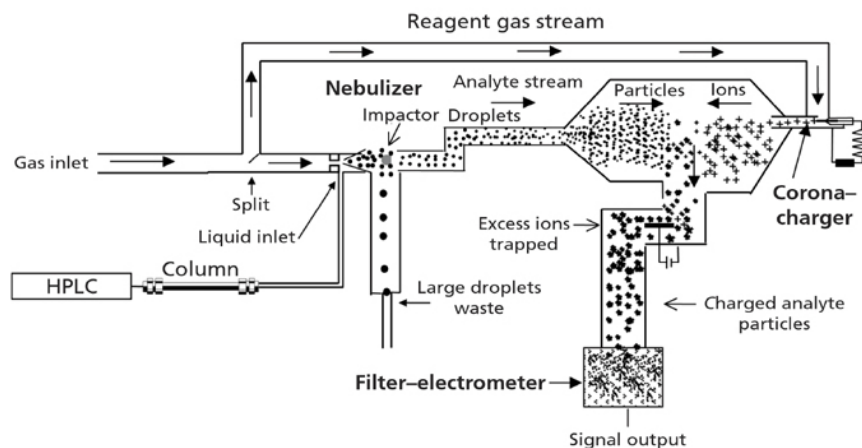
1.4.4.2 CLAE-CAD

A detecção UV-vis é sensível para muitos analitos na CLAE, mas sua sensibilidade é dependente da presença de grupos cromóforos, ou seja, da estrutura molecular das substâncias. Devido a essa limitação, o detector CAD é cada vez mais utilizado, por se tratar de um detector considerado universal, já que sua resposta é independente das propriedades químicas das substâncias (GORECKI et al, 2006).

O método de detecção desse equipamento consiste na detecção de partículas carregadas. O primeiro passo do processo de detecção é a nebulização pneumática do eluente em gotículas. O solvente é evaporado para formar um aerossol de partículas do analito. Uma segunda corrente de gás passa por uma descarga de corona de platina, produzindo íons positivos. Em seguida, ocorre a colisão desses íons com as partículas do analito, que resulta na transferência da carga dos íons para as partículas. No final, as partículas são transferidas para um coletor, onde a carga é medida por um eletrômetro (LIGOR et al, 2014), conforme observado na Figura 8.

O tamanho de partícula aumenta com a quantidade de substância, ou seja, com a concentração. A carga é transferida de acordo com o tamanho do analito: quanto maior a partícula, maior a carga. O sinal gerado é diretamente proporcional à quantidade de substância. Portanto, o CAD fornece uma resposta que é independente da estrutura química (LIGOR et al, 2014).

Figura 8 – Detector CAD para CLAE



Fonte: (Mc Carthy et al, 2005).

O CAD apresenta vantagens em relação à detecção por UV, como alta sensibilidade, capacidade de detectar diversas substâncias em nanogramas, inclusive analitos não-voláteis ou sem cromóforos, independente da estrutura química. Porém, como qualquer detector de aerossóis, o CAD tem resposta reduzida se o analito for volátil (HUTCHINSON et al, 2014; LIGOR et al, 2014).

1.5 Justificativa

As bolsas plásticas para sangue são insumos essenciais para a hemoterapia e fazem parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados do Ministério da Saúde (MS). Devido a isso, a ocorrência de desvios da qualidade neste produto pode causar um grande impacto em saúde pública.

A migração dos plastificantes da bolsa plástica para sangue pode representar um risco para a saúde do paciente se exceder os limites especificados na RDC nº 35 de 2014.

Portanto, a determinação do teor de plastificantes apresenta grande importância devido aos seus efeitos toxicológicos. Além disso, o desenvolvimento de metodologias analíticas para análise da migração é fundamental para avaliar a exposição dos pacientes aos plastificantes durante o uso das bolsas de sangue e contribuir para a redução dos riscos à saúde do usuário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar técnicas para análise de plastificantes em bolsas de sangue.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Analisar as notificações do sistema Notivisa (Anvisa) relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015;

2.2.2 Analisar o perfil e os resultados obtidos para as amostras submetidas ao ensaio de determinação do teor de DEHP no INCQS no período de 2011 a 2016;

2.2.3 Determinar o teor do plastificante DEHP por espectrofotometria no UV-vis (método farmacopeico) em amostras comerciais de bolsas de sangue enviadas ao INCQS;

2.2.4 Determinar o teor dos plastificantes DEHP e DEHA por cromatografia em fase gasosa com detecção de ionização por chama (CGAR-DIC), cromatografia em fase líquida com detecção de ultravioleta (CLAE-UV) e cromatografia em fase líquida com detecção de aerossol carregado (CLAE-CAD) em amostras comerciais de bolsas de sangue enviadas ao INCQS;

2.2.5 Comparar os resultados obtidos para o DEHP pelo método espectrofotométrico e pelos métodos cromatográficos.

3 METODOLOGIA

3.1 Análises crítica das notificações do sistema Notivisa relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015

Foi realizada busca das notificações de queixas técnicas (QT) relacionadas ao produto bolsas plásticas, recebidas pelo sistema de notificações para vigilância sanitária (Notivisa) (Figura 9) no período entre 2011 e 2015. O enfoque da busca foram “bolsas”, logo, os filtros utilizados para a busca foram: “queixa técnica”, “artigo médico-hospitalar” e “bolsas”.

Figura 9 – Tela de exportação de notificações do sistema Notivisa

Fonte: (ANVISA, 2016).

Os dados sobre as notificações foram exportados para uma planilha do Excel, classificados e quantificados de acordo com o tipo do produto. Para isso, foram

utilizadas como filtros as palavras: “nutrição”, que incluiu bolsas para soluções intravenosas, nutrição enteral e parenteral; “ostomia”, que possibilitou quantificar bolsas de colostomia, ileostomia e urostomia; “sangue”, que forneceu informações sobre bolsas de sangue; “urina”, que é referente às bolsas para coleta de urina. Considerando o risco associado, de acordo com a RDC nº 185/2001, aos tipos de produtos encontrados, foi definido o objeto de estudo. Em seguida, os motivos das QTs foram analisados e quantificados.

3.2 Avaliação retrospectiva dos resultados obtidos para as amostras de bolsas de sangue submetidas ao ensaio de ftalato no INCQS

Foi realizada uma análise retrospectiva do ensaio de determinação de DEHP, por espectrofotometria-UV, realizado nas bolsas de sangue submetidas ao INCQS no período de 2011 a 2016, utilizando o Sistema de Gerenciamento de Amostras do INCQS (Harpya). Os filtros utilizados foram: data, nome do produto (bolsas), detentor do registro, modalidade de análise (prévia), tipos de ensaio (determinação de plastificante) e avaliação final do resultado analítico. As marcas foram codificadas para preservar a identidade dos detentores do registro do produto. Os dados foram organizados e avaliados utilizando planilhas do Excel versão 2013.

3.3 Avaliação de plastificantes – materiais e métodos

Esta parte do estudo foi desenvolvida em três etapas:

- a) Utilização do método espectrofotométrico para determinação da concentração de DEHP em bolsa de sangue;
- b) Utilização de três diferentes métodos cromatográficos, empregando CGAR-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD, para determinação da concentração de DEHP e DEHA em bolsa de sangue;
- c) Comparação dos métodos estudados para determinação da concentração de plastificantes em bolsa de sangue.

3.3.1 Materiais

3.3.1.1 Amostras

Foram utilizadas no estudo amostras de bolsas de sangue enviadas ao INCQS para realização de análise prévia. Para seleção das amostras, foi realizada uma busca por produtos de lotes já analisados, que estivessem dentro do prazo de validade e possuíssem, no mínimo, 3 unidades lacradas. Após a avaliação da rotulagem desses produtos quanto à presença de DEHP, foram selecionadas aleatoriamente 3 unidades de cada lote para realização do ensaio.

3.3.1.2 Vidrarias

Foram utilizadas para o ensaio de determinação de plastificantes, as seguintes vidrarias: Erlenmeyers de vidro de 4000 mL; provetas de vidro de 100, 500 e 1000 mL; balões volumétricos de vidro de 100 e 200 mL calibrados; pipetas volumétricas de vidro de 3, 5, 10, 15 e 20 mL calibradas; picnômetro de vidro.

3.3.1.3 Gases utilizados para a técnica de cromatografia com fase gasosa

- Gás de arraste: Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Gás *make up*: Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- Hidrogênio 99,995% de pureza (White Martins, Brasil);
- Ar sintético

3.3.1.4 Padrões e solventes

- Água purificada (destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q[®]);
- Álcool etílico p.a. 95% (Merck, Alemanha) com pureza mínima igual a 99,9 %;
- DEHP (ChemService, Estados Unidos) com pureza igual a 99,5 ($\pm 0,5$)%;
- DEHA (ChemService, Estados Unidos) com pureza igual a 98,1 ($\pm 0,5$)%.

3.3.1.5 Equipamentos

Os seguintes equipamentos e materiais foram empregados no estudo:

- Espectrofotômetro de absorção molecular UV-visível Lambda 16, operando na faixa de 190 a 800 nm (Perkin-Elmer, Alemanha);
- CGAR: cromatógrafo a gás CP-3800 (Varian, EUA) equipado com:
 - Amostrador automático (autosampler 8400 Varian);
 - Injetor 1079, modo split/splitless, com insersor de vidro silanizado;
 - Coluna capilar DB-5 (5% fenilmetilsilicone) de sílica fundida, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 1,2 µm de espessura de filme (J&W Scientific, Estados Unidos);
 - Controlador eletrônico de fluxo;
 - Detector por ionização em chama (DIC);
 - Sistema de aquisição de dados: software Star® v. 6.5
- CLAE: cromatógrafo a líquido ULTIMATE 300 (Thermo Fisher, EUA) equipado com:
 - Coluna C18, 250 mm de comprimento x 4 mm de diâmetro interno x 5 µm de espessura (Phenomenex, Estados Unidos);
 - Detector por absorção molar nas regiões UV/VIS com arranjo de diodos e detector de aerossol carregado por efeito corona;
 - Sistema de aquisição de dados: software Chromeleon® v. 7.2
- Sistema de purificação de água Milli-Q® - resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹ (MilliPore®, EUA);
- Balança analítica de precisão com 5 casas decimais (Sartorius, Alemanha);
- Banho termostatizado com precisão (± 1) °C (Thermo Haake, Alemanha);

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Preparo do solvente de extração

O solvente de extração foi preparado diluindo cerca de 450 mL de etanol PA 95 a 100% com 570 mL de água destilada para obter uma densidade relativa de 0,9389 a 0,9395, medida com um picnômetro a temperatura ambiente de 25°C.

3.3.2.2 Ensaio de migração de plastificantes

O solvente de extração foi introduzido nas bolsas plásticas vazias (isentas de resíduo de solução anticoagulante e/ou preservadora), através de uma seringa de vidro conectada ao tubo de coleta, até ocupar metade do volume nominal da bolsa. Após expelir o ar contido na bolsa, o tubo de coleta foi fechado e todas as bolsas foram imersas na posição horizontal em um banho-maria mantido a (37 ± 1) °C por (60 ± 1) minutos. Em seguida, as bolsas foram removidas do banho-maria, invertidas dez vezes e seu conteúdo foi transferido para um frasco de vidro (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013; BRASIL, 2014).

3.3.2.3 Preparo da curva de calibração

A faixa de trabalho foi definida sendo observados os limites estabelecidos pela Farmacopeia Europeia 8ª edição. Para o preparo da curva analítica foi preparada uma solução estoque de cada plastificante medindo-se em balança analítica calibrada. Foi pesado 100,3 mg de ftalato padrão em um balão volumétrico de 100 mL calibrado, que foi avolumado com etanol 95%. Para o preparo das soluções padrão, foram pipetadas alíquotas de 3, 5, 10 e 20 mL da solução estoque em quatro balões volumétricos de 100 mL; em um balão volumétrico de 200 mL foi pipetada uma alíquota de 15 mL da solução estoque. Todos os balões foram avolumados com o solvente de extração. A Tabela 1 apresenta os dados referentes à obtenção das curvas analíticas.

Tabela 1 – Concentração das soluções de DEHP da curva de calibração e volumes medidos da solução estoque, para preparar 100 mL de cada solução de DEHP

Concentração (mg ftalato/100 mL)	Volumes medidos da solução estoque (mL)
2,9789	3
4,9649	5
7,4473	15
9,9297	10
19,8594	20

Fonte: (Do autor, 2018).

3.3.2.4 Condições espectrofotométricas

O comprimento de onda selecionado para este estudo foi 272 nm, o mesmo adotado pela Farmacopeia Europeia 8ª edição, empregando cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2013).

3.3.2.5 Condições cromatográficas

A solução extraída das bolsas foi injetada nos sistemas e condições abaixo:

– Sistema CGAR-DIC:

- Temperatura do injetor: 230°C;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 100 °C, com incremento de temperatura de 10 °C min⁻¹ até 300 °C
- Temperatura do detector: 300°C;
- Temperatura da coluna: 100°C;
- Volume de injeção: 1µL;
- Vazão da purga do septo: 3 mL min⁻¹ ;
- Vazão de split: 10:1
- Vazão do gás de *make up* (nitrogênio): 30 mL min⁻¹ ;
- Vazão do gás de arraste (nitrogênio) constante em 1,0 mL min⁻¹ ;
- Vazão dos gases do detector: Hidrogênio: 30 mL min⁻¹ ; Ar sintético: 300 mL min⁻¹ (ar 1) e 30 mL min⁻¹ (ar 2);

– Sistema CLAE-UV e CLAE-CAD:

- Fase estacionária: coluna C18
- Fase móvel: fluxo de 1 mL/min de solução A e B em modo gradiente (Tabela 2).

Tabela 2 – Programação do modo gradiente

Tempo (min)	Volume Sol. B (%)	Volume Sol. A (%)
0	40	60
20	85	15
20,5	40	60
30	40	60

Fonte: (Do autor, 2018).

Solução A – solução 0,1% v/v de ácido fórmico e Solução B – acetonitrila.

3.3.3 Técnicas analíticas

3.3.3.1 Avaliação dos plastificantes no extrato

Para determinar o tempo de retenção dos plastificantes, injetou-se uma solução analítica de DEHA e de DEHP na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, no CG e no CLAE nas condições cromatográficas do item 3.3.2.5.

3.3.3.2 Limite máximo estabelecido

De acordo com a RDC nº 35/2014, os resultados serão satisfatórios quando apresentarem um teor de DEHP de no máximo:

- a) 10 mg/100mL para recipientes de volume entre 300 mL e 500 mL;
- b) 13 mg/100mL para recipientes de volume entre 150 mL e 300 mL;
- c) 14 mg/100mL para recipientes de volume até 150 mL.

3.3.3.3 Avaliação da linearidade

Para as análises espectrofotométricas, realizou-se a medida de absorvância de cada solução padrão em espectrofotômetro UV-vis a 272 nm. As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do ftalato no eixo das abscissas e as absorvâncias obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft[®] Excel versão 7.0, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente de correlação (r), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) da curva analítica.

Para as análises cromatográficas, injetou-se no sistema cromatográfico um volume de 1 μL no CG e 5 μL no CLAE de cada solução padrão obtendo-se as áreas, no tempo de retenção pré-determinado para o CGAR-DIC, o CLAE-UV e o CLAE-CAD, nas condições cromatográficas definidas nos itens 3.3.2.5. As curvas analíticas foram obtidas colocando-se os valores de concentração do ftalato no eixo das abscissas e as áreas obtidas no eixo das ordenadas, com auxílio do programa Microsoft[®] Excel versão 7.0, o qual forneceu o coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente de correlação (r), o coeficiente angular (a) e o coeficiente linear (b) das curvas analíticas.

Através dos dados obtidos para a construção das curvas analíticas, na faixa de concentração apresentada na Tabela 1, verificou-se a linearidade de cada método.

3.3.4 Comparação entre os métodos espectrofotométrico e cromatográficos

Para a comparação e a análise dos resultados obtidos foi necessário verificar se as diferenças entre as concentrações de DEHP encontradas foram estatisticamente significantes. Para isso, foi aplicado o teste não paramétrico Mann-Whitney/Wilcoxon. Para aplicação desses testes foi utilizado o R-software (versão 3.1.3) (SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., 2006).

3.3.4.1 *Teste Mann-Whitney/Wilcoxon*

O teste t não é apropriado quando a amostra é pequena e a variável numérica não apresenta uma variação normal. Sendo indicado o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test) para comparação de dois grupos não pareados para verificar se pertencem ou não à mesma população. O teste de Mann-Whitney (U) testa a igualdade das medianas. Os valores de U calculados pelo teste avaliam o grau de entrelaçamento dos dados dos dois grupos após a ordenação. A maior separação dos dados em conjunto indica que as amostras são distintas, rejeitando-se a hipótese de igualdade das medianas. A estatística U foi calculada da seguinte maneira:

- foi formado um conjunto W, com todos os dados das duas amostras (A e B);
- o conjunto W foi ordenado de forma crescente;
- a ordem de cada elemento deste conjunto foi anotada;
- as amostras A e B foram separadas novamente;
- o valor de U é a soma das ordens da amostra A.

Quanto mais baixo for o valor de U, maior será a evidência de que as populações são diferentes. Isso se explica porque U é a soma de ordens, portanto seu valor será baixo se na categoria A estiverem os primeiros da ordem (obviamente em B estarão os dados de ordem superior). É claro então que neste caso se evidencia uma diferença entre as populações. Se as diferenças entre as situações forem aleatórias, como é postulado pela hipótese nula, então os resultados devem

ser aproximadamente os mesmos e, conseqüentemente, as ordens devem ser também aproximadamente as mesmas para as duas situações.

Utilizando o teste Mann-Whitney/Wilcoxon foram realizadas comparações entre todos os métodos para cada amostra (SIEGEL, S.; CASTELLAN JR., 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados baseando-se nos objetivos específicos. A análise das notificações do sistema Notivisa relacionadas às bolsas plásticas (item 2.2.1) possibilitou definir que as bolsas de sangue seriam o objeto de estudo, devido à sua importância em saúde pública. Já a análise do perfil e dos resultados obtidos para as amostras submetidas ao ensaio de determinação do teor de DEHP no INCQS (item 2.2.2) permitiu a seleção das amostras para a determinação do teor de plastificante (item 2.2.3 a 2.2.6) e a comparação dos métodos analíticos (item 2.2.7).

4.1 Análise crítica das notificações do sistema Notivisa relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015

As notificações referentes às QT de bolsas plásticas foram analisadas por ano e por tipo de bolsa (Tabela 3), para que fosse possível avaliar a situação dos produtos em cada ano. Foram considerados o número de notificações e a classificação de risco associado à utilização do produto (BRASIL, 2001b).

Tabela 3 – Quantidade de notificações por tipo de bolsa

Tipo	Risco	2011		2012		2013		2014		2015		Total	
		Nº QT	%	Nº QT	%	Nº QT	%	Nº QT	%	Nº QT	%	Nº QT	%
Drenagem	II	-	-	1	0,5	1	0,4	-	-	3	0,8	5	0,4
Enema	I	-	-	5	2,4	6	2,5	7	2,7	6	1,7	24	1,9
Nutrição	II	60	28,3	40	19,4	28	11,7	42	16,2	11	3,1	181	14,2
Ostomia	II	27	12,7	16	7,8	13	5,4	12	4,6	24	6,7	92	7,2
Sangue	III	57	26,9	33	16,0	44	18,3	82	31,5	143	39,8	359	28,1
Térmica	I	-	-	1	0,5	-	-	3	1,2	2	0,6	6	0,5
Urina	II	68	32,1	110	53,4	148	61,7	114	43,8	170	47,4	610	47,8
Total	-	212	100	206	100	240	100	260	100	359	100	1277	100

Fonte: (Do autor, 2018).

Entre 2011 e 2015, o sistema Notivisa recebeu 1277 notificações sobre QT de bolsas plásticas. Os produtos com maior número de notificações foram as bolsas para urina (610 notificações) e as bolsas para sangue (359 notificações), que juntas representam 75,9% das notificações.

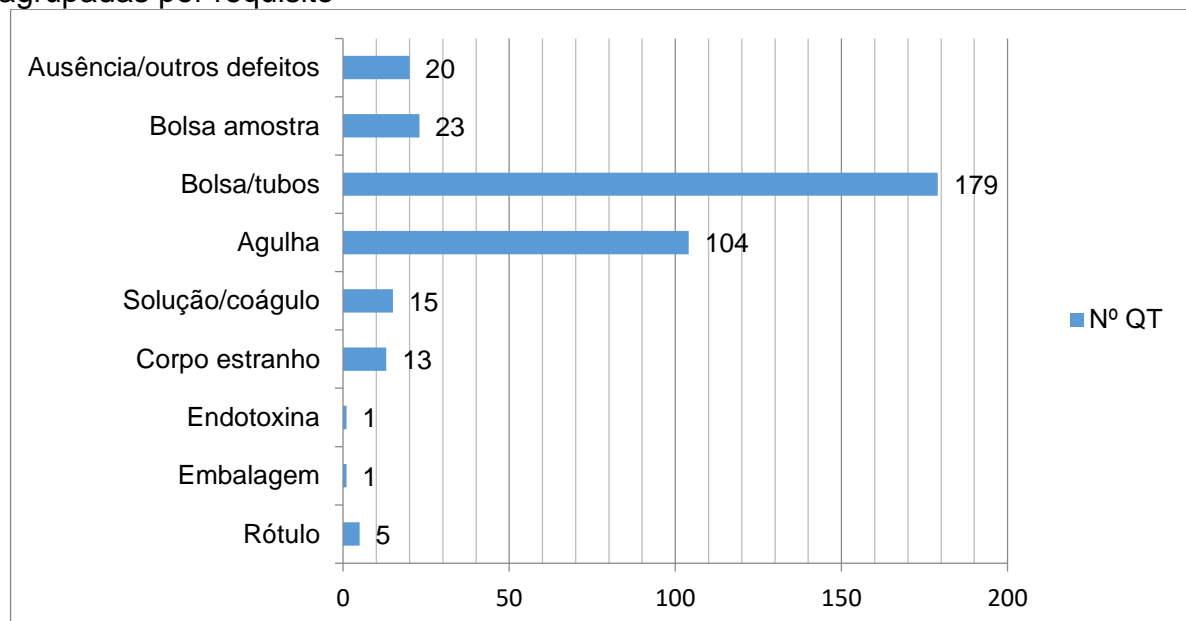
De acordo com a classificação de risco da Anvisa, as bolsas para enema e bolsas térmicas são produtos que oferecem baixo risco ao usuário (classe de risco I);

as bolsas para urina, nutrição, ostomia e drenagem oferecem médio risco (classe de risco II); e as bolsas de sangue apresentam alto risco (classe de risco III) (BRASIL, 2001b; ANVISA, 2017).

Apesar da bolsa para urina ser o tipo de bolsa plástica com maior número de notificações em todos os anos, buscou-se estudar o produto que apresenta maior impacto em saúde pública. Assim, a bolsa de sangue foi o produto selecionado para o estudo, pois além de ser o segundo tipo de bolsa com maior número de notificações, é o único que oferece alto risco para o usuário.

As notificações referentes às bolsas para sangue foram analisadas e agrupadas de acordo com os requisitos estabelecidos pela RDC nº 35 de 2014, conforme observado no Gráfico 1. As notificações ocorreram principalmente por problemas com as bolsas/tubos do produto e as agulhas. É importante destacar que o número de notificações não representa a quantidade de produtos com não conformidades e que muitas vezes uma única notificação foi referente a todo o lote de bolsas recebido pelo serviço de saúde.

Gráfico 1 – Notificações de bolsas de sangue recebidas entre 2011 e 2015 agrupadas por requisito



Fonte: (Do autor, 2018).

Em relação às agulhas, as notificações relataram a identificação de agulhas tortas, sem bisel, com problemas no sistema retrátil e agulhas quebradas ou desconectadas da bolsa de sangue. Essas não conformidades resultaram no

descarte do produto antes da coleta, causaram acidentes de trabalho com material biológico, dor e rejeição aos doadores.

Também foram identificadas bolsas com alteração na coloração da solução anticoagulante, o que impediu a utilização do produto. Além disso, foi notificada a ocorrência de alterações nos parâmetros de controle da qualidade do sangue armazenado e a presença de coágulos de sangue nas bolsas durante a transfusão.

Na categoria corpo estranho, estão as notificações que relataram a presença de partículas e sujidades dentro das bolsas. Além disso, uma das notificações foi devido à presença de endotoxina bacteriana. Esses problemas são extremamente graves, tendo em vista que esse tipo de contaminação pode causar a morte do paciente (ANSEL, POPOVICK, LOYD, 2000; BRASIL, 2014).

Os problemas envolvendo embalagem e rotulagem resultaram em um pequeno número de notificações. Apesar disso, é importante destacar que as legislações que apresentam os requisitos para embalagem e rotulagem foram publicadas em 2001 e, portanto, não deveriam existir notificações por esse motivo (BRASIL, 2001b).

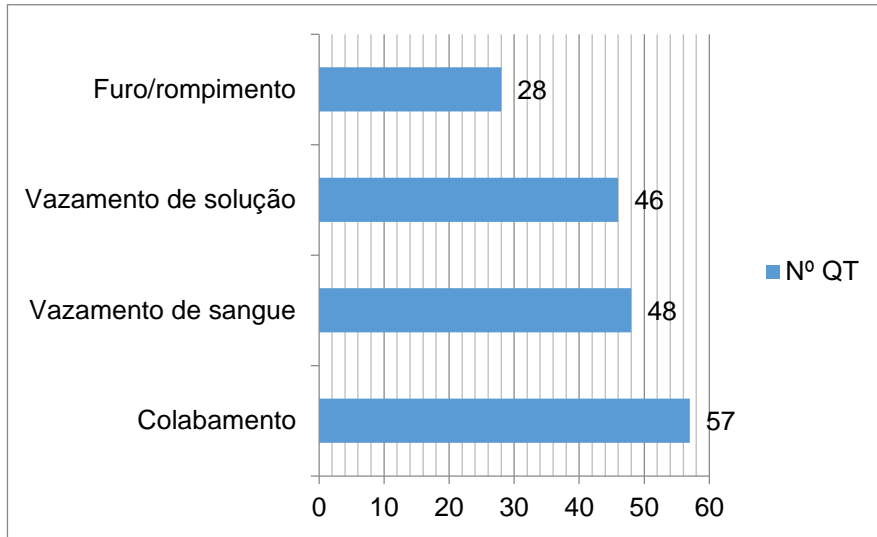
Na categoria “outros defeitos”, estão as notificações relacionadas à ausência de alguma parte do produto, como ausência da agulha de coleta, da solução anticoagulante e componentes desconectados. Esses problemas provavelmente ocorreram por alguma falha no controle de qualidade final do produto.

As notificações envolvendo a bolsa para coleta de amostras de sangue (bolsa para realização de exames laboratoriais presentes no sistema bolsa de sangue) relataram a presença de um defeito que impediu a coleta das amostras, fazendo com que o sangue coletado fosse descartado.

As notificações relacionadas às bolsas e aos tubos do produto relataram a ocorrência de furo/rompimento, vazamento de sangue e de solução anticoagulante e colabamento⁶ de partes das bolsas e tubos. Assim, como o principal motivo das notificações está relacionado ao filme plástico, estas foram analisadas separadamente no Gráfico 2.

⁶ Ato de comprimir uma estrutura tubular, fazendo com que suas paredes se toquem.

Gráfico 2 – Não conformidades presentes no sistema bolsa de sangue entre 2011 e 2015



Fonte: (Do autor, 2018).

Como alguns componentes do sangue realizam trocas gasosas, as bolsas para coleta de sangue precisam ter determinada topografia, rugosidade e porosidade, frente à permeabilidade aos gases adequados durante a conservação do sangue e suas frações (ADORNI, 2008).

A RDC 35/2014 determina que no ensaio de permeabilidade ao vapor, as bolsas não devem apresentar perda de massa maior que 1,0%. Verceze (1996) estudou as características que afetam o desempenho dos filmes de PVC na conservação de plaquetas e mostrou que a permeabilidade é resultado não apenas dos plastificantes, mas também do processo de obtenção dos filmes, incluindo o efeito da gravação do filme, realizada após a extrusão. Portanto, a presença de produtos com vazamento de solução pode indicar uma alteração em alguma dessas etapas do processo produtivo.

Além da permeabilidade aos gases, as bolsas para sangue precisam ser resistentes às alterações de temperatura durante o processo de esterilização (115° a 120°C) e de armazenamento do plasma (-70°C) e também a sucessivas centrifugações de até 5000 rpm a 4°C (ADORNI, 2008).

A ocorrência de rompimentos e de vazamento de sangue pode estar relacionada com o fato da área definida como solda ou costura entre os filmes plásticos ser considerada como o principal ponto vulnerável das bolsas às rupturas durante o processamento do sangue.

Devido a isso, Verceze (2006) verificou o comportamento físico e físico-químico do filme plástico de 5 marcas de bolsas de sangue disponíveis no mercado brasileiro, utilizando o corpo da bolsa e a solda ou costura. A absorção no infravermelho indicou que todas as bolsas apresentaram o mesmo critério de composição, que deve ser o recomendado pela Farmacopeia Europeia. Porém, a análise mecânica das bolsas revelou que existem diferenças nas propriedades viscoelásticas quanto à deformação. Isso indica uma possível correlação entre os espectros de infravermelho com o comportamento das bolsas nos ensaios de tensão/alongação até ruptura, fazendo com que algumas bolsas apresentem maior resistência à ruptura, tanto no meio de seus filmes quanto nas suas soldas ou costuras.

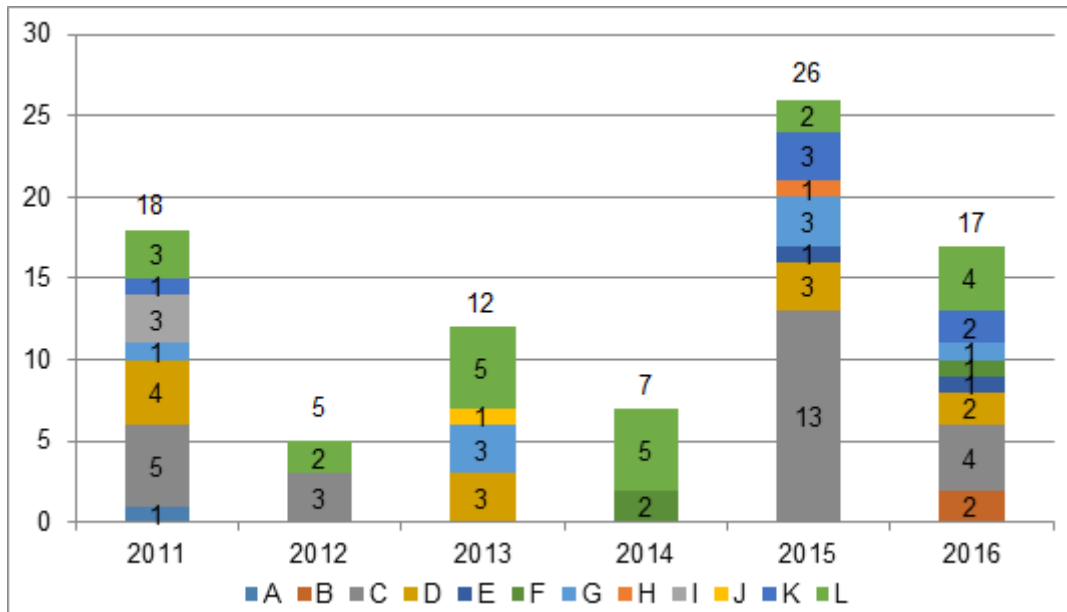
Com isso, é possível concluir que se o plástico utilizado nas bolsas para sangue apresentar alguma alteração em seu estado ou em sua resistência, poderá haver ruptura da bolsa e a perda do conteúdo (ADORNI, 2008).

Portanto, conforme relatado nas notificações, essas não conformidades resultaram em acidentes, danos ao usuário e perda do sangue doado. Além de impactar no serviço, também ocorreu desperdício de recursos públicos, já que as bolsas de sangue são produtos com valor agregado alto e a presença de defeitos fez com que o produto fosse segregado.

4.2 Avaliação retrospectiva dos resultados obtidos para as amostras de bolsas de sangue submetidas ao ensaio de DEHP no INCQS (2011-2016)

Os resultados do ensaio de determinação de DEHP em bolsas de sangue realizados no INCQS foram obtidos pelo sistema Harpya e analisados de acordo com o fabricante (Gráfico 3) e pelo tipo de bolsa (Tabela 4) para que fosse possível selecionar as amostras para a determinação do teor de plastificante.

Gráfico 3 – Bolsas de sangue analisadas no INCQS no período de 2011-2016 (N = 85)



Fonte: (Do autor, 2018).

No período entre 2011 e 2016, 85 lotes de bolsas de sangue de 12 diferentes detentores de registro foram submetidos ao ensaio de determinação de DEHP. Os produtos registrados pelo detentor C foram os mais analisados nesse período. Devido ao processo de certificação de boas práticas farmacêuticas do detentor C, 2015 foi o ano com o maior número de bolsas de sangue analisadas no INCQS.

Foram analisados 53 lotes de bolsa seca e 32 lotes de bolsa com solução. A Tabela 4 apresenta todos os tipos de bolsas analisados e permite observar que os produtos mais analisados foram os kits para aférese e as bolsas para coleta e transferência.

Tabela 4 – Bolsas de sangue analisadas no INCQS por tipo de produto

Tipo de bolsa		Tipo de produto	Nº de bolsas
Seca		Aférese	13
		Autotransusão	8
		Bolsa de plaquetas	2
		Bolsa de transferência	13
		Coleta de medula	5
		Criopreservação	3
		Filtro de leucócitos	9
Total			53
Solução	CPDA	Coleta	13
		Cordão umbilical	1
	CPD	Cordão umbilical	1
	ACD	Aférese	2
	CPD SAG M	Coleta	12
		Filtro de leucócitos	3
Total			32

Fonte: (Do autor, 2018).

ACD - citrato ácido dextrose; CPD - citrato fosfato dextrose; CPDA - citrato fosfato dextrose adenina; CPD SAG M - citrato de sódio, ácido cítrico, glicose, fosfato de sódio, adenina, cloreto de sódio e manitol.

O produto bolsa de sangue também pode ser classificado pela quantidade de bolsas que apresenta (Tabela 5) e que são destinadas para o armazenamento dos hemocomponentes.

Tabela 5 – Bolsas de sangue analisadas no INCQS por quantidade de bolsas em cada produto

Quantidade de bolsas no produto	Nº de lotes
Uma	33
Duas	22
Três	16
Quatro	7
Cinco	4
Seis	2
Sete	1

Fonte: (Do autor, 2018).

Cada bolsa presente no produto foi analisada em triplicata e foi emitido um laudo com a concentração de DEHP em cada bolsa. Todas as amostras submetidas ao ensaio de determinação de DEHP no INCQS entre 2011 e 2016 apresentaram resultados satisfatórios. Mas, devido à diversidade de produtos (contendo até 7 bolsas em um único produto) e à ausência de informações sobre a finalidade de alguns recipientes, não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de DEHP determinada pelo ensaio farmacopeico com o tipo do produto e com o fabricante.

Conforme observado na Tabela 5, o produto bolsa simples (contendo uma única bolsa plástica) foi o produto mais analisado no INCQS. Foram analisados no INCQS 33 lotes do produto bolsa simples de 9 fabricantes diferentes e com diferentes finalidades. Entre esses produtos, apenas 3 amostras de bolsa seca estavam dentro do prazo de validade e apresentavam pelo menos 3 unidades com a embalagem lacrada.

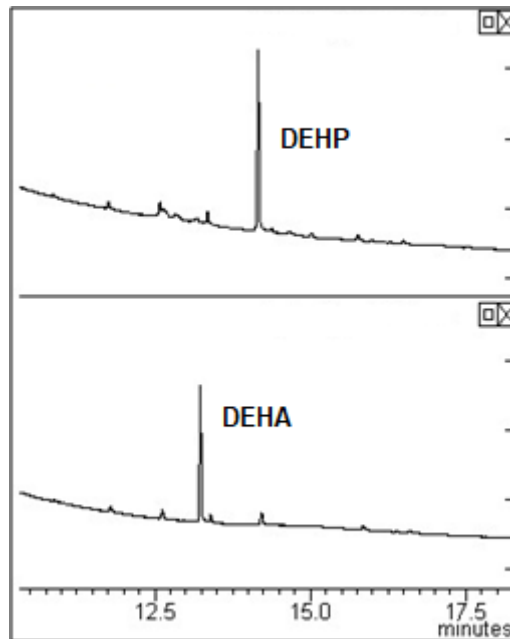
4.3 Determinação do teor dos plastificantes DEHP e DEHA de amostras comerciais submetidas ao INCQS

Devido à variedade de bolsas de sangue e à necessidade de realização do ensaio de determinação do DEHP em triplicata, foram escolhidos para este estudo os produtos chamados de bolsa simples, que contém apenas uma bolsa de sangue, para minimizar a quantidade de álcool etílico P.A. utilizado no preparo da solução de extração, tendo em vista que este trabalho é um estudo inicial para escolha de uma nova técnica para determinação de DEHP em bolsas de sangue.

4.3.1 Otimização das condições cromatográficas

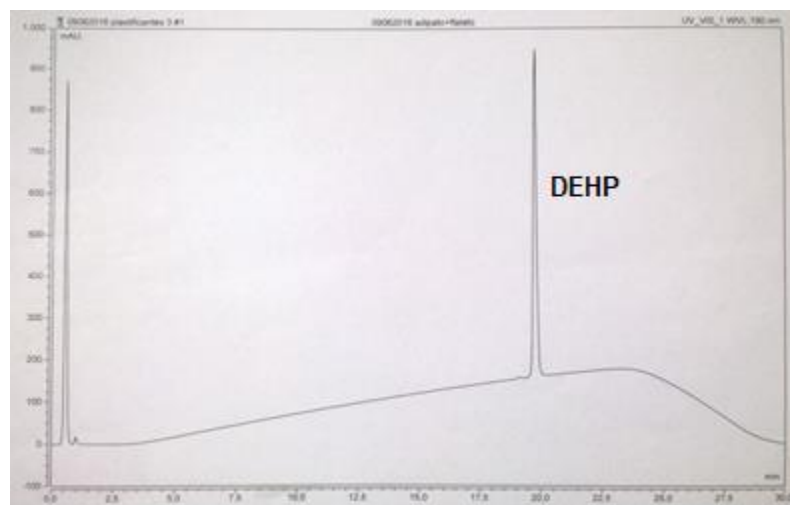
Para determinar o tempo de retenção dos plastificantes, analisou-se uma solução padrão de DEHA e DEHP na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, nas condições cromatográficas do item 3.3.2.5. Para os sistemas CGAR-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD não se encontrou nenhum outro sinal no tempo de retenção do DEHA e do DEHP. Conforme observado nas Figuras 10, 11 e 12.

Figura 10 – Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CGAR-DIC. Condições do item 3.3.2.5.



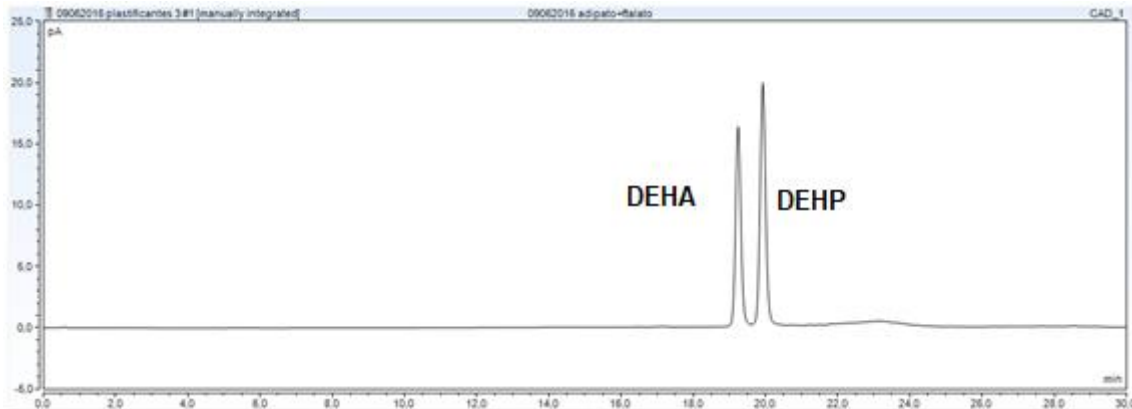
Fonte: (Do autor, 2018).

Figura 11 – Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CLAE-UV. Condições do item 3.3.2.5.



Fonte: (Do autor, 2018).

Figura 12 – Cromatograma DEHP e DEHA obtido por CLAE-CAD. Condições do item 3.3.2.5.

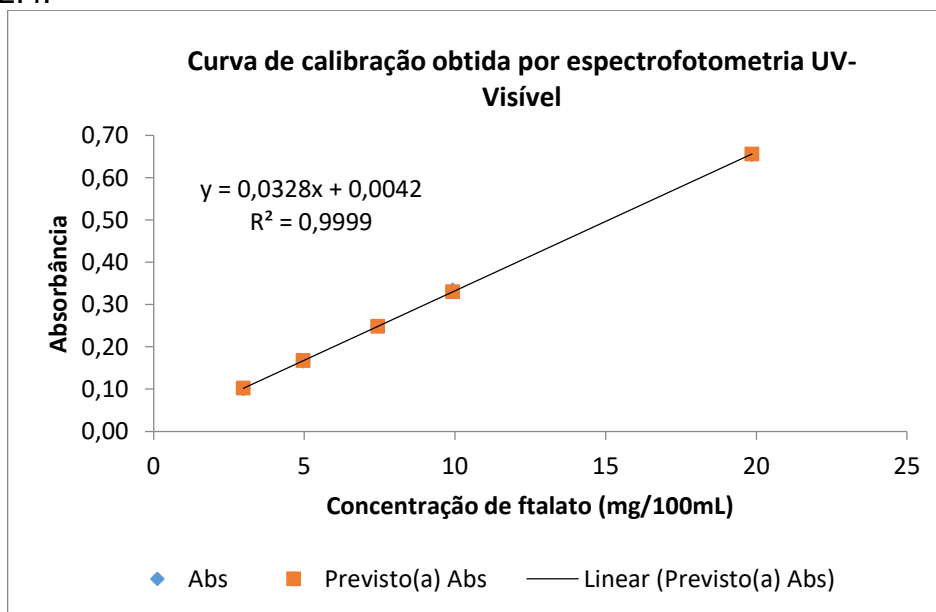


Fonte: (Do autor, 2018).

4.3.2 Curvas de calibração e linearidade

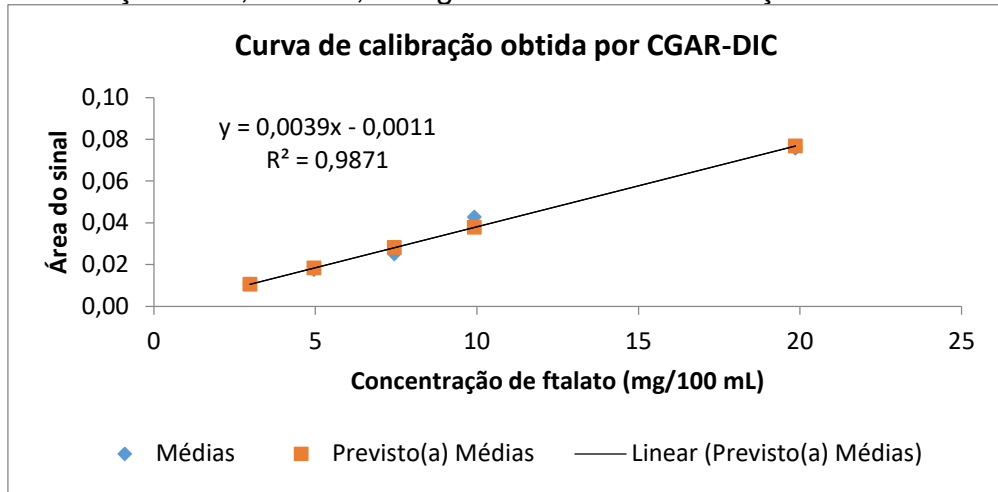
Todos os métodos estudados foram lineares nas faixas de concentração estudadas. As Figuras 13, 14, 15 e 16 representam as curvas de calibração obtidas para o método espectrofotométrico e para os sistemas CGAR-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD, respectivamente. Os cromatogramas encontram-se nos Apêndices A, B e C.

Figura 13 – Curva de calibração obtida por espectrofotometria UV-Vis para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL. Condições do item 3.3.2.4.



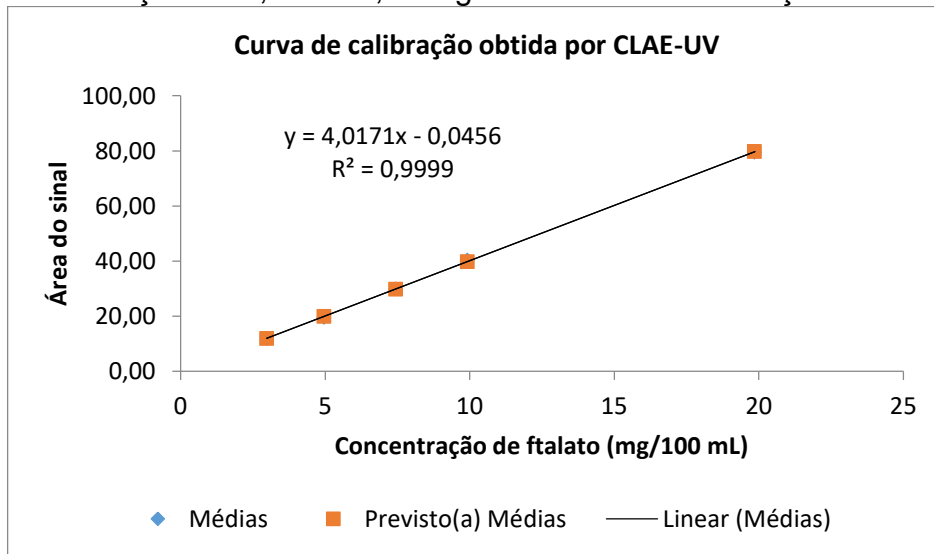
Fonte: (Do autor, 2018).

Figura 14 – Curva de calibração obtida por CGAR-DIC para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL. Condições do item 3.3.2.5.



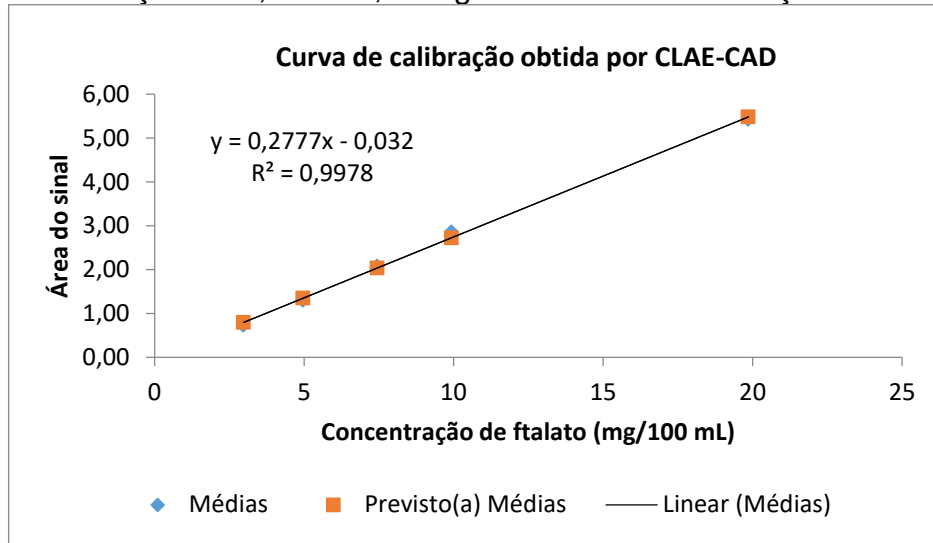
Fonte: (Do autor, 2018).

Figura 15 – Curva de calibração obtida por CLAE-UV para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL. Condições do item 3.3.2.5.



Fonte: (Do autor, 2018).

Figura 16 – Curva de calibração obtida por CLAE-CAD para soluções analíticas na faixa de concentração de 2,97 a 19,85 mg DEHP/100mL. Condições do item 3.3.2.5.



Fonte: (Do autor, 2018).

A Tabela 6 apresenta a inclinação (a), a interseção (b), o coeficiente de determinação (r^2) e o coeficiente de correlação (r) das curvas de calibração, obtidas para as soluções analíticas de concentração 2,97; 4,96; 7,44; 9,92 e 19,85 mg DEHP/100mL analisadas por espectrofotometria UV, CGAR-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD.

Tabela 6 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas no intervalo de 2,97 a 19,85 mg DEHP, nas condições espectrofométricas e cromatográficas. Condições dos itens 3.3.2.4 e 3.3.2.5.

Método	a	b	r^2	r
Espectrofotômetro	0,0042	0,0328	0,9999	0,9999
CGAR-DIC	-0,0011	0,0039	0,9871	0,9935
CLAE-UV	-0,0456	4,0171	0,9999	0,9999
CLAE-CAD	-0,0320	0,2776	0,9976	0,9988

Fonte: (Do autor, 2018).

De acordo com as equações obtidas para as curvas de calibração, os métodos apresentaram resposta linear, pois o coeficiente de correlação (r) é maior que 0,990. Os valores de *p-valor* observados para o desvio da linearidade das curvas foram superiores a 0,05 indicando que não interferiram na determinação da significância da regressão e desvio da linearidade, com um nível de confiança de 95% (BRASIL, 2017c). Portanto, as condições estabelecidas para os métodos espectrofotométrico e cromatográficos foram satisfatórias para a determinação do DEHP.

4.3.3 Limite de Detecção

Os valores de Limite de Detecção (LOD) foram estimados a partir dos dados das amostras de bolsas de sangue analisadas. O LOD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O LOD dos métodos foram calculados por 3 vezes o sinal do ruído, considerando-se a razão sinal/ruído $\geq 2:1$ (BRASIL, 2017c). Os valores de LOD obtidos estão na Tabela 7.

Tabela 7 – LOD estimado para os métodos analíticos

Analito	CLAE-CAD	CG-DIC
DEHA	80 ppb	100 ppb
DEHP	50 ppb	80 ppb

Fonte: (Do autor, 2018).

4.3.4 Avaliação da concentração de migração de DEHA e DEHP em amostras de bolsas de sangue

Foram avaliadas três amostras de bolsa de sangue do tipo seca de três lotes e fabricantes diferentes. Essas bolsas foram enviadas ao INCQS para realização de análise prévia para comprovar a conformidade do produto para fins de registro do produto na Anvisa. As amostras foram analisadas conforme o método descrito na Farmacopeia Europeia (2013).

Todas as amostras foram consideradas satisfatórias em relação à quantidade de DEHP extraível (BRASIL, 2014), conforme observado na Tabela 8. Além disso, com as novas propostas de metodologia para detecção de DEHA, foi possível comprovar que as amostras de bolsa de sangue analisadas não apresentaram DEHA.

Em relação às amostras analisadas neste trabalho, os espectros de massas de alta resolução em modo positivo de varredura permitiram concluir somente a presença de DEHP como plastificante, já que nos cromatogramas de íons totais das amostras, o sinal cromatográfico com $m/z \sim 515$, muito provavelmente, é oriundo de alguma outra substância extraída das bolsas pelo etanol. O cromatograma encontra-se nos Apêndice D.

Tabela 8 – Concentração de DEHP em mg/100mL determinadas nas soluções de migração provenientes das amostras ensaiadas, através dos diferentes métodos

Amostra	Espectrofotômetro	CLAE- CAD	CLAE-UV	CGAR-DIC
447/15 A	7,67	6,88	6,87	8,50
447/15 B	7,09	6,11	6,22	6,30
447/15 C	7,36	6,32	6,40	6,05
4696/15 A	0,97	0,53	0,44	0,77
4696/15 B	1,03	0,82	0,77	0,77
4696/15 C	0,92	0,57	0,61	0,66
1328/16 A	6,55	5,23	5,53	6,31
1328/16 B	6,42	5,42	5,56	6,34
1328/16 C	6,32	5,44	5,56	6,87

Fonte: (Do autor, 2018).

Aparentemente as concentrações de DEHP detectadas por espectrofotometria foram bem semelhantes aos valores detectados pelos métodos cromatográficos. Porém outras substâncias com grupos funcionais absorventes também poderiam ter sido detectadas pela espectrofotometria, assim as absorbâncias no comprimento de onda utilizado seriam somadas. Devido a isso, os métodos cromatográficos são mais apropriados para esse tipo de análise (SKOOG, 2006).

Por isso, nas avaliações de substâncias migratórias, a determinação da migração específica de cada substância deve ser associada à determinação de todos os migrantes presentes no produto (migração global), ou seja, a quantidade de outros aditivos presentes no PVC também deveria ser quantificada. Já que além dos componentes da formulação, também podem ser encontradas substâncias formadas durante o processo de fabricação ou durante o uso do produto (BERNARD et al, 2015b; ECKERT et al, 2015).

Al Salloum et al (2016) também analisaram a migração de DEHP em bolsas de sangue utilizando espectrofotometria UV e constatou que houve migração contínua do DEHP para a solução de extração mesmo após 4 semanas de armazenamento. Esse resultado é importante para o armazenamento de sangue, tendo em vista a diversidade de produtos sanguíneos e suas diferentes datas de validade.

A CG é frequentemente utilizada na análise de ftalatos em embalagens de alimentos, brinquedos infantis, produtos cosméticos e produtos médicos, através da detecção por espectrometria de massas (EM) e por DIC. O equipamento CG-EM

apresenta elevados custos de aquisição e manutenção, enquanto o CG-DIC é versátil, simples e facilmente acessível para a maioria dos laboratórios analíticos. Devido a isso, o CG-DIC é uma técnica de rotina para quantificação de substâncias conhecidas em uma matriz de PVC e a melhor opção para a determinação de ftalatos (BERNARD et al, 2014).

Abrantes e Duarte (1992) também utilizaram CG-DIC para determinação de DEHP e DEHA em bolsas de sangue e no presente trabalho não foi encontrada a presença de adipato nas amostras analisadas.

Bernard et al (2015a) também utilizaram CG-DIC para identificar e quantificar os plastificantes (DEHP, DEHT, TOTM e DINCH) em 9 tubos de infusão feitos de PVC, provenientes de 10 fabricantes diferentes e, assim como Gimeno et al (2014), observaram uma grande discrepância entre as quantidades de plastificantes nos produtos, confirmando que os fabricantes introduzem plastificantes nesses produtos sem qualquer limite regulado. Esse resultado tem grande importância para o controle da qualidade das bolsas de sangue, tendo em vista os diversos tubos de transferência presentes nesse produto e que não são submetidos ao ensaio de determinação de plastificantes.

A CLAE-UV é uma técnica muito utilizada para quantificar plastificantes, apesar das limitações para detecção de substâncias com estruturas químicas semelhantes, como os isômeros DEHP e DEHT, e que não apresentam cromóforo, como ATBC, DEHA e DINCH (BERNARD et al, 2014).

Genay et al (2011) utilizaram CLAE-UV para quantificar o DEHP em nove dispositivos médicos rotulados como livre de DEHP e produzidos com plastificantes alternativos (TOTM, DINCH e DEHT) e constatou que apenas 2 produtos dos 9 testados eram realmente livres de DEHP. Um deles mostrou resíduos de DEHP que excederam o limite de 0,1% em massa plástica estabelecida pelos regulamentos europeus. Os traços de DEHP inferiores ao limite de quantificação foram encontrados nas câmaras de gotejamento de conjuntos de infusão (esta parte do produto é feita de poliestireno e copolímero de estireno-butadieno e não de PVC plastificado), indicando que o DEHP pode ser encontrado em componentes diferentes da tubulação, possivelmente devido à contaminação da linha de produção ou das matérias-primas.

Isso mostra que a referência à rotulagem é insuficiente para garantir a ausência do DEHP. Esse resultado é importante, tendo em vista que as bolsas

rotuladas como livre de DEHP não são submetidas ao ensaio de determinação de DEHP. Além disso, na RDC nº 35/2014, regulamento técnico vigente, não há exigência para a realização desse ensaio nos tubos conectados às bolsas de sangue.

Devido à limitação do detector UV na determinação de substâncias que não possuem um cromóforo adequado, como o DEHA, o detector Corona-CAD foi considerado o mais adequado para este estudo, pelo fato de ser um detector quase universal, pois detecta todas as substâncias semivoláteis e não-voláteis e produz uma resposta proporcional à massa dos componentes (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Matsuyama, Kinugasa e Ohtani (2014) utilizaram o detector CAD para quantificar 9 tipos de ésteres de ftalato, inclusive DEHP, e verificaram que a intensidade do sinal de uma substância e a sensibilidade variam de acordo com a composição da fase móvel.

Comparando com os outros métodos de detecção utilizados nesse estudo, a CLAE acoplada ao detector CAD apresenta vantagens consideráveis, como a possibilidade de analisar amostras sem informações estruturais dos componentes, resposta independente da estrutura do analito e possui boa sensibilidade (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; HUTCHINSON et al, 2014).

O CAD apresenta vantagens em relação ao detector por absorção molecular na região UV-vis quando os analitos tem baixas absortividades molares ou quando somente possuem cromóforo com elétrons desemparelhados, como no caso do DEHA, não absorvendo em regiões mais seletivas do espectro eletromagnético. Outra vantagem é que em determinações de teor em amostras multicomponentes não há necessidade da construção de curva de calibração para cada analito. Só há necessidade de se obter uma única curva. O teor dos outros analitos podem ser calculados através do fator de resposta (HUTCHINSON et al, 2014).

No cromatograma obtido através do detector de aerossol carregado, os parâmetros de adequação do sistema estão em conformidade com os valores preconizados nos compêndios oficiais. Os resultados obtidos para o número de pratos teóricos (N), resolução (R) e assimetria (A), foram, respectivamente 83121; 2,71 e 1,07 (USP, 2016).

Até o momento não foram publicados estudos sobre a determinação da concentração de DEHA utilizando o detector CAD e nem sobre a utilização desse

detector na determinação de DEHP em bolsas de sangue. Portanto, o presente trabalho apresenta uma inovação tecnológica.

É preciso ressaltar que apesar de todas as amostras terem sido consideradas satisfatórias no ensaio de determinação de DEHP, é importante simular parâmetros e condições adaptados para representar todas as situações clínicas em que a bolsa de sangue ou o produto médico é usado. Para esse modelo de migração clínica, é necessário levar em consideração as condições clínicas de exposição, como o tempo de contato entre o conjunto de infusão (bolsa de sangue e tubos) e o sangue ou hemocomponente, a temperatura de armazenamento, de infusão e do ambiente do paciente internado, além da natureza da solução infundida (BERNARD et al, 2015c).

Apesar de não ter sido considerada no desenvolvimento desse estudo, a temperatura é um fator que favorece a liberação de plastificantes do PVC e deve ser levada em consideração para pacientes pediátricos. Tendo em vista que a população neonatal pode estar em incubadoras que mantém as condições que reproduzem o ambiente uterino (38-39 °C) (BERNARD et al, 2015c).

4.4 Comparação entre os métodos espectrofotométrico e cromatográficos

Através dos resultados apresentados nesse trabalho os métodos cromatográficos e o espectrofotométrico foram comparados com as concentrações encontradas. Conforme pode ser observado na Tabela 9, na comparação dos métodos pelo teste de Mann-Whitney/Wilcoxon, verifica-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) a um nível de significância de 0,05, ou seja, não houve diferenças significativas entre os métodos.

Tabela 9 – Teste de Mann-Whitney/Wilcoxon

Wilcoxon signed rank test		
447/15	Espectro X CAD	W = 9, p-value = 0.1
	Espectro X UV	W = 9, p-value = 0.4
	Espectro X Gás	W = 6, p-value = 0.7
	CAD x UV	W = 5, p-value = 0.8571
	CAD x Gás	W = 5, p-value = 1
	UV x Gás	W = 7, p-value = 0.8571
4696/15	Espectro X CAD	W = 9, p-value = 0.1
	Espectro X UV	W = 9, p-value = 0.1
	Espectro X Gás	W = 9, p-value = 0.07652
	CAD x UV	W = 5, p-value = 1
	CAD x Gás	W = 3, p-value = 0.6579
	UV x Gás	W = 1, p-value = 0.184
1328/16	Espectro X CAD	W = 9, p-value = 0.1
	Espectro X UV	W = 9, p-value = 0.1
	Espectro X Gás	W = 5, p-value = 1
	CAD x UV	W = 0, p-value = 0.1
	CAD x Gás	W = 0, p-value = 0.1
	UV x Gás	W = 0, p-value = 0.1

Fonte: (Do autor, 2018).

Portanto, através dos resultados obtidos no estudo, pode-se concluir que todos os métodos são apropriados para determinar a concentração de DEHP extraível de bolsas de sangue.

Os métodos cromatográficos apresentam vantagens em relação ao método espectrofotométrico, como elevada sensibilidade e rapidez, o que permite a análise de um grande número de amostras simultaneamente. Sendo o detector CAD considerado o mais adequado para a análise de plastificantes.

5 CONCLUSÕES

A análise das notificações do sistema Notivisa relacionadas às bolsas plásticas no período de 2011 a 2015 permitiu identificar que a bolsa para sangue foi o segundo produto com o maior número de notificações, principalmente devido à ocorrência de problemas relacionados ao filme plástico.

A avaliação retrospectiva dos resultados do INCQS revelou que amostras de 85 lotes de bolsas de sangue foram submetidas ao ensaio de determinação de DEHP e todas apresentaram resultados satisfatórios.

Não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de DEHP determinada pelo ensaio farmacopeico com o tipo de produto ou fabricante.

As bolsas de sangue simples foram escolhidas para o estudo da determinação do teor de plastificante pelos métodos espectrofotométrico e cromatográficos (CGAR-DIC, CLAE-UV e CLAE-CAD). Todos os métodos foram lineares na faixa de concentração estudada (2,97 a 19,85 mg DEHP/100 mL) e todas as amostras foram consideradas satisfatórias em relação à quantidade de DEHP extraível. Além disso, não foi detectada a presença de DEHA nas amostras analisadas, considerando o limite de detecção dos métodos analíticos.

A técnica CLAE-CAD apresenta vantagens em relação aos outros métodos pela possibilidade de analisar amostras sem informações estruturais dos componentes, por detectar substâncias não voláteis e que não possuem cromóforos. Portanto, a utilização desse tipo de detecção para determinação de DEHP em bolsas de sangue é uma inovação tecnológica.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância da utilização de dois métodos cromatográficos eficientes para determinação de DEHP em bolsa de sangue, tendo em vista que essa substância é um disruptor endócrino. Porém, ainda é necessário realizar estudos futuros que comprovem a robustez e a reprodutibilidade, além da validação do novo método.

Além do enfoque físico-químico, vale ressaltar a importância da realização desse estudo no INCQS, que é referência para as análises de vigilância sanitária do produto bolsa de sangue e se torna cada dia mais um ente imprescindível para a atualização regulatória do produto no país.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, S.; DUARTE, J. Determinação de cloreto de vinila, ftalato de di-(2-etilhexila) e adipato de di-(2-etilhexila) em bolsa de sangue e em sua solução anticoagulante. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 228-230, jul.1992.

ADORNI, C. A. **Metodologia para automação de inspeção visual de bolsas para coleta de sangue**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 50-63, out. 2012.

AL SALLOUM, H. et al. Studying DEHP migration in plasticized PVC used for blood bags by coupling Raman confocal microscopy to UV spectroscopy. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 56-62, dez. 2015.

_____. **Classificação de Materiais**. Brasília: ANVISA, 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/produtos-para-a-saude/produtos/classificacao-de-materiais>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

ANSEL, H. C; POPOVICK, N. G; LOYD, Jr. A. V. Medicamentos parenterais e líquidos estéreis. In: FORMAS Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000, cap. 8, p. 317-372.

ATSDR. **Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate**. Georgia, 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2017.

BERNARD, L. et al. Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: A review. **Talanta**, v.129, p. 39-54, maio 2014.

BERNARD, L. et al. Analysis of plasticizers in poly(vinyl chloride) medical devices for infusion and artificial nutrition: comparison and optimization of the extraction procedures, a pre-migration test step. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 6, p. 1651-1659, fev. 2015a.

BERNARD, L. et al. Migrability of PVC plasticizers from medical devices into a simulant of infused solutions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 485, p. 341–347, mar. 2015b.

BERNARD, L. et al. Migration of plasticizers from PVC medical devices: Development of an infusion model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, p. 136-145, ago. 2015c.

BOURDEAUX, D. et al. Analysis of PVC plasticizers in medical devices and infused solutions by GC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 118, p. 206-213, out. 2016.

BRASIL. Portaria nº 950/MS/SVS, de 26 de novembro de 1998. Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de nov. 1998.

_____. Resolução nº 9, de 21 de outubro de 1999. Aprova o “Regulamento Técnico para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Bolsas de Sangue” e Anexos, contendo normas técnicas e condições necessárias para garantir a qualidade das bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 de out. 1999.

_____. Resolução RDC/Anvisa nº 56, de 6 de abril de 2001. Os produtos para saúde devem atender aos requisitos essenciais de segurança e eficácia aplicáveis a estes produtos, referidos no Regulamento Técnico anexo a esta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de abr. 2001a.

_____. Resolução RDC/Anvisa nº 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de out. 2001b.

_____. Portaria nº 1353/MS/SVS, de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de jun. 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. **Técnico em hemoterapia: livro texto**/Ministério da Saúde, Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação

na Saúde, Departamento de Gestão da Educação na Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2013a. 292 p.

_____. Portaria nº 2.712, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2013. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 de nov. 2013b.

_____. Resolução RDC/Anvisa nº 35, de 12 de junho de 2014. Dispõe sobre bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de jun. 2014.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Guia para uso de hemocomponentes. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Especializada e temática**. – 2. ed., 1. reimpr. Brasília, 2015. 136 p.

_____. **Portal Saúde - apresentação**. Brasília: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1132-sctie-raiz/daf-raiz/cgafme/l1-cgafme/11722-apresentacao>>. Acesso em: 01 set. 2017a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Caderno de informação: sangue e hemoderivados: dados de 2015**/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – 1. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 118 p. 2017b.

_____. Resolução RDC/Anvisa nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de jul. 2017c.

BRASKEM. **Tecnologia do PVC**. São Paulo, 2006. 450p. Disponível em: <http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/Download/Upload/Tecnologia%20do%20PVC%20a%20edi%C3%A7%C3%A3o_22.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2017.

BUCHTA, C. et al. Transfusion-related exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in patients receiving plateletpheresis concentrates. **Transfusion**, v. 45, p. 748-802, maio 2005.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos polímeros**: um curso básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006. v. 1. 289p.

EC. **European Union Risk Assessment Report Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP), CAS-No. 117-81-7**, Luxembourg, v. 80, 2008. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/documents/10162/e614617d-58e7-42d9-b7fb-d7bab8f26feb>>. Acesso em: 05 set. 2017.

EC. **Amending Annex II to Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council as regards the list of substances subject to restriction**. Brussels, 2015. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/transparency/regdoc/rep/3/2015/PT/3-2015-2067-PT-F1-1.PDF>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

ECKERT, E. et al. Comparative study on the migration of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and tri-2-ethylhexyl trimellitate (TOTM) into blood from PVC tubing material of a heart-lung machine. **Chemosphere**, v. 145, p. 10-16, dez. 2015.

ERYTHROPEL, H.C. et al. Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 9967-9981, nov. 2014.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 8.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 1 v.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. **Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices**. 2014.

Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm080457.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2017.

FRANÇA. Lei nº 2012-1442, de 24 de dezembro de 2012. A suspensão da fabricação, importação, exportação e colocação no mercado de qualquer empresa especializada em embalagens alimentares contendo bisfenol A. **Jornal Oficial da República Francesa**, nº 300, 26 de dezembro de 2012, página 20395.

_____. Emenda nº 1610 à lei francesa nº 2012-1442 de 24 de dezembro de 2012, votada em 10 de abril, 10 2015. **Jornal Oficial da República Francesa**, 2015.

FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE HEMOCENTRO DE SÃO PAULO. **O que é sangue?** Disponível em <<http://www.prosangue.sp.gov.br/artigos/estudantes>>. Acesso em: 01 set de 2017.

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

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

GENAY, S. et al. Experimental study on infusion devices containing polyvinyl chloride: To what extent are they di(2-ethylhexyl)phthalate-free? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, p. 47-51, abr. 2011.

GIMENO, P. et al. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 949-950, P. 99-108, jan. 2014.

GORECKI, T. et al. Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3186-3192, mar. 2013.

HAISHIMA, Y. et al. A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration. **Journal of Biomedical Materials Research. Part A**. v. 101A, p. 2630-2643, fev. 2013.

HUTCHINSON, J. P. et al. Universal response model for a corona charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7418-7427, set. 2010.

INOUE, K. et al. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. **Clinica Chimica Acta**, v. 358, p. 159-166, mai. 2005.

INSTITUTO DO PVC. **A fabricação do PVC**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://pvc.org.br/o-que-e-pvc>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

KASTNER, J. et al. Aqueous leaching of di-2-ethylhexyl phthalate and “green” plasticizers from poly(vinyl chloride). **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 357-364, jul. 2012.

KU, H. Y. et al. Prenatal and Postnatal Exposure to Phthalate Esters and Asthma: A 9-Year Follow-Up Study of a Taiwanese Birth Cohort. **Plos One**, v. 10, n. 4, abr. 2015.

LIGOR, M. et al. Corona-Charged Aerosol Detection: An Analytical Approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 64-78, fev. 2013.

LIN, L. C. et al. Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. **Chemosphere**, v. 83, p. 1192–1199, jan. 2011.

LUO, H. et al. Evaluation of the di(2-ethylhexyl)phthalate released from polyvinyl chloride medical devices that contact blood. **Springer Plus**, v. 3, p. 58-66, jan. 2014.

MATSUYAMA, S.; KINUGASA, S.; OHTANI, H. HPLC analysis of phtalates using corona charged aerossol detector. **Bunseki Kagaku**, v. 63, n.10, p. 817-823, nov. 2014.

PROWSE, C. V. et al. Commercially available blood storage containers. **Vox Sanguinis**, v. 106, p. 1-13, jan. 2014.

PLASTICISERS INFORMATION CENTRE. **Medical Applications**. Bruxelas, 2018. Disponível em: <<http://www.plasticisers.org/applications/medical-applications/>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

PLASTICS EUROPE. **How Plastics Are Made**. Bélgica, 2018. Disponível em: <<https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/what-are-plastics/how-plastics-are-made>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

PVCMED ALLIANCE. **PVC Healthcare Applications**. Bélgica, 2018. Disponível em: <<http://pvcmed.org/pvc-in-healthcare/pvc-medical-devices/>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

RAHMAN, M.; BRAZEL, C. S. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 12, p. 1223-1248, dez. 2004.

SAILLENFAIT, A. M. Les phtalates. Point sur la réglementation en vigueur. **Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement**, v. 76, p. 32-35, out. 2015.

SANTOS, L. A. C.; MORAES, C.; COELHO, V. S. Os Anos 80: a politização do Sangue. **PHYSIS - Revista de Saúde Coletiva**, v. 2, n. 1, p. 107-149, 1992.

SASTRI, V. R. **Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements, and Applications**. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/book/9781455732012>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

SERRANO, K. et al. An investigation of red blood cell concentrate quality during storage in paediatric-sized polyvinylchloride bags plasticized with alternatives to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). **Vox Sanguinis**, v. 110, p. 227-235, dez 2015.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR, N. J. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 448p

SKOOG, S. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 39.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

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

_____. **Otimização e validação da determinação do teor de glicose, frutose e manitol em bolsas de sangue por cromatografia em fase líquida**. 2012. 161 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

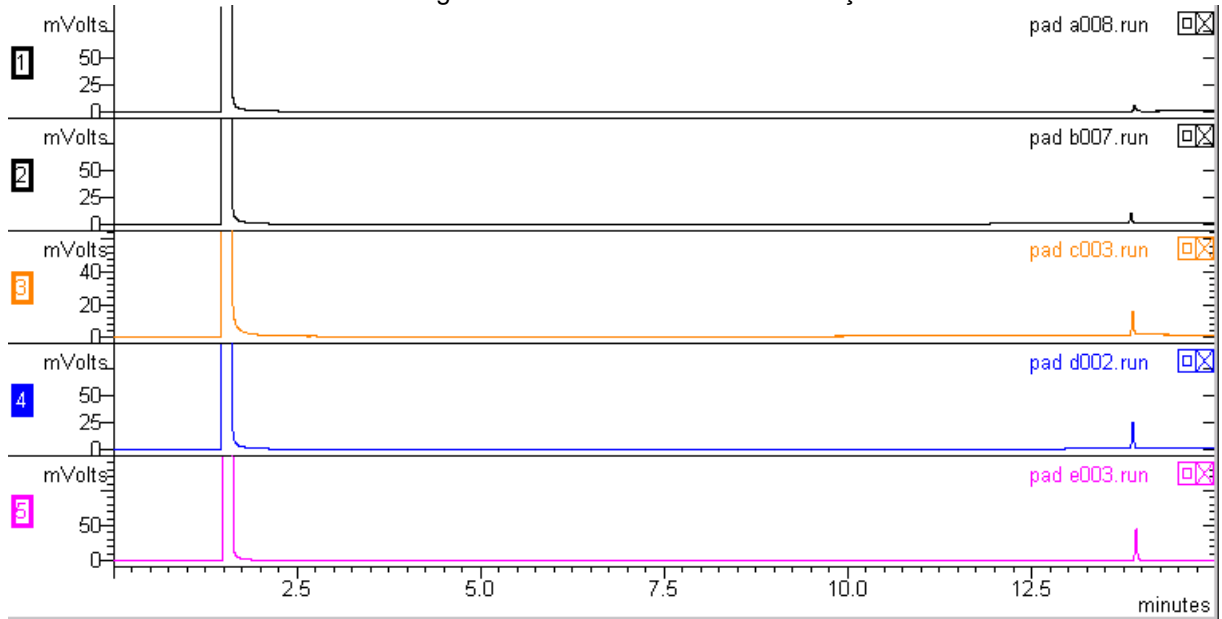
VERCEZE, A. V. **Avaliação do desempenho de filmes de PVC plastificado utilizados na fabricação de bolsas de sangue**. 1996. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 1996.

_____. Estudo físico e físico-químico de diferentes filmes de bolsas de sangue visando a segurança frente ao processamento hemoterapêutico. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 28, n. 2, p. 139-143, mai. 2006.

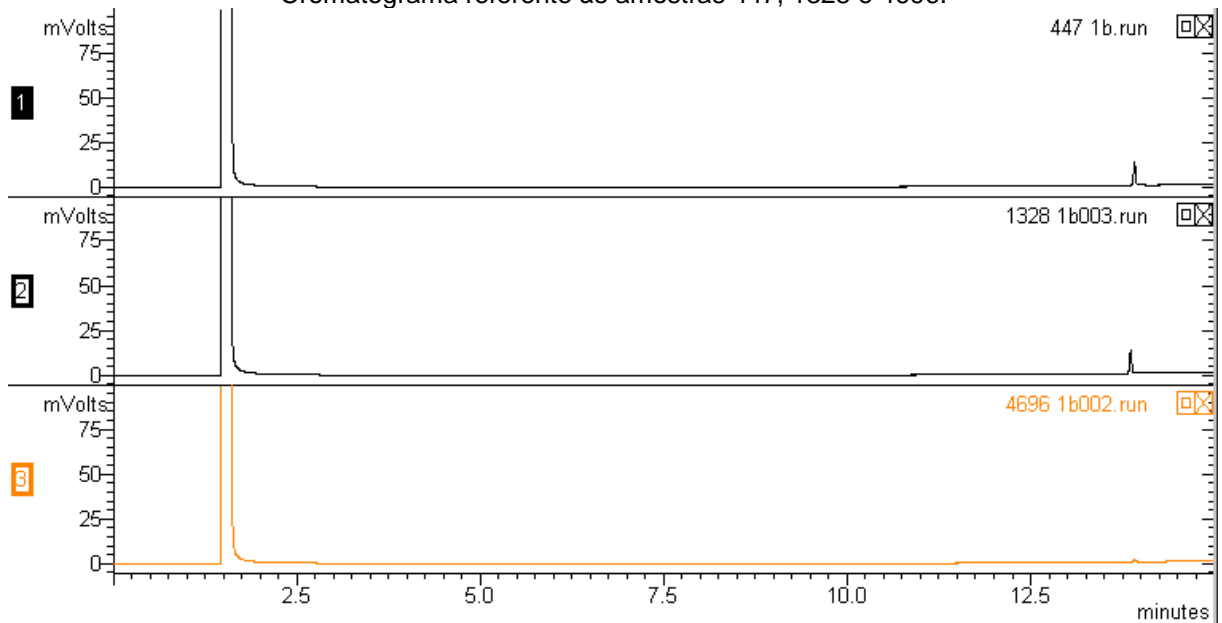
WEN, H. J. et al. Prenatal and childhood exposure to phthalate diesters and sex steroid hormones in 2-, 5-, 8-, and 11-year-old children: A pilot study of the Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. ***Journal of Epidemiology***, v. 27, n. 11, p. 516-523, mar. 2015.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CGAR-DIC

Cromatograma referente à curva de calibração.

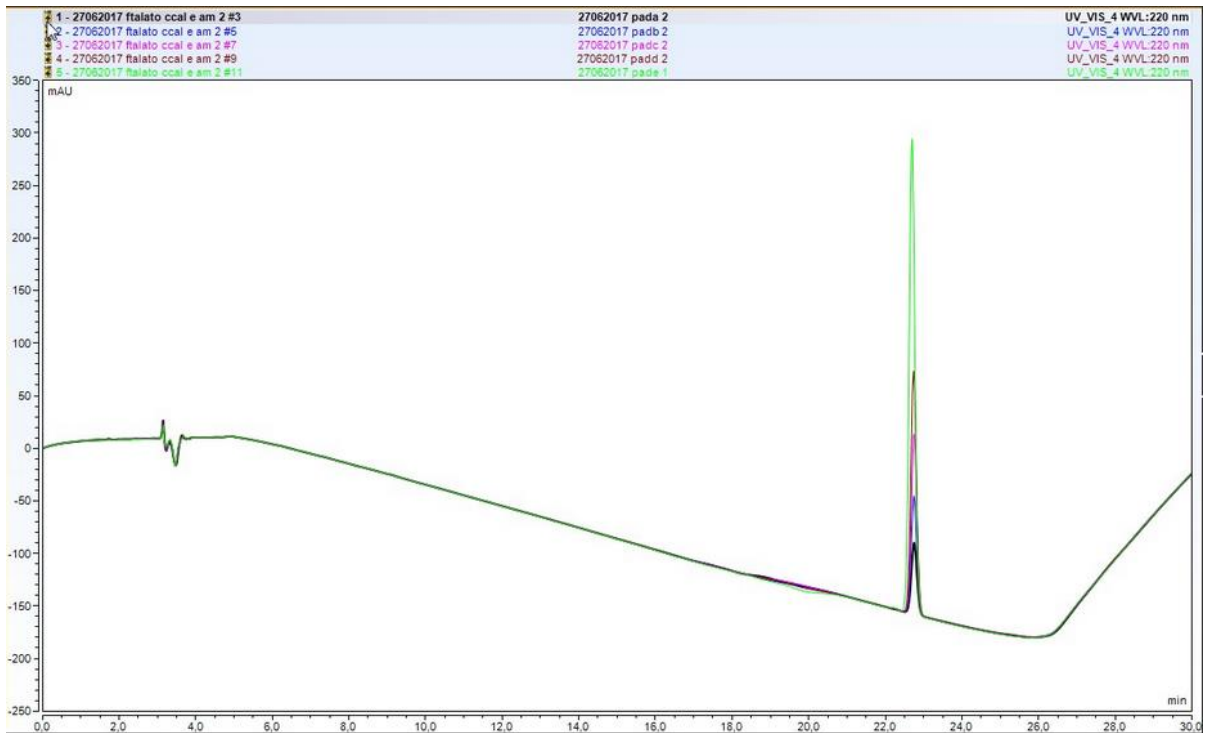


Cromatograma referente às amostras 447, 1328 e 4696.

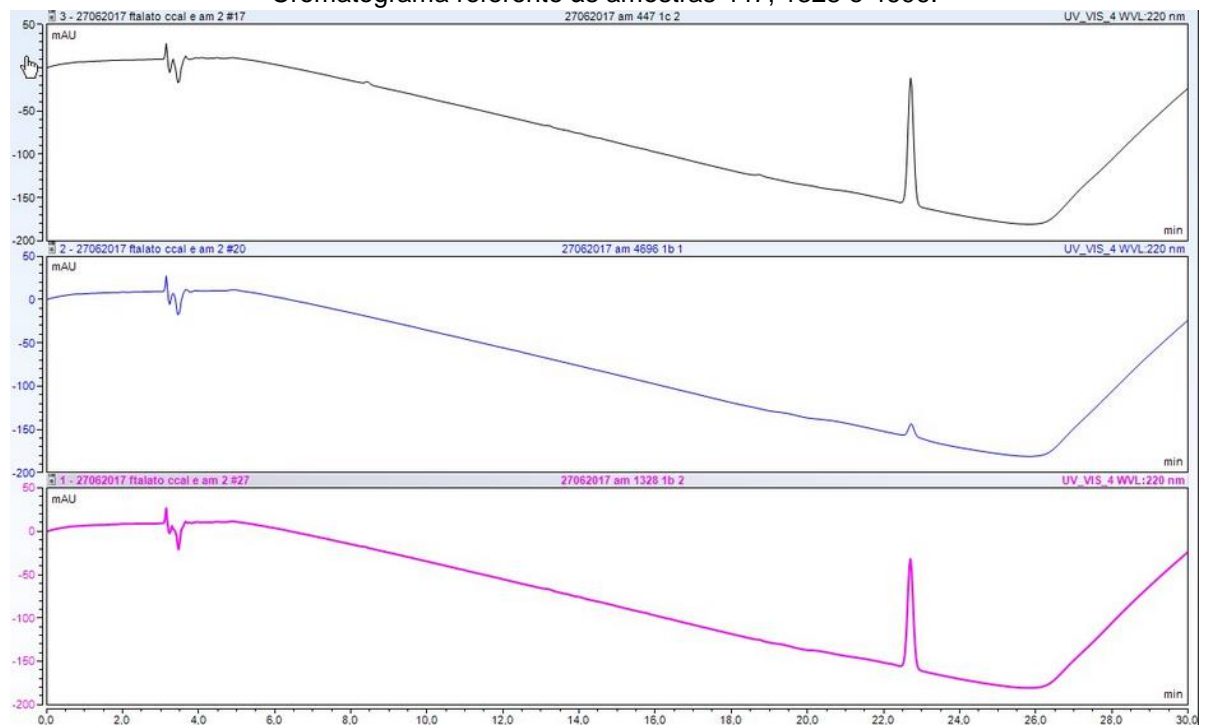


APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CLAE-UV

Cromatograma referente à curva de calibração.

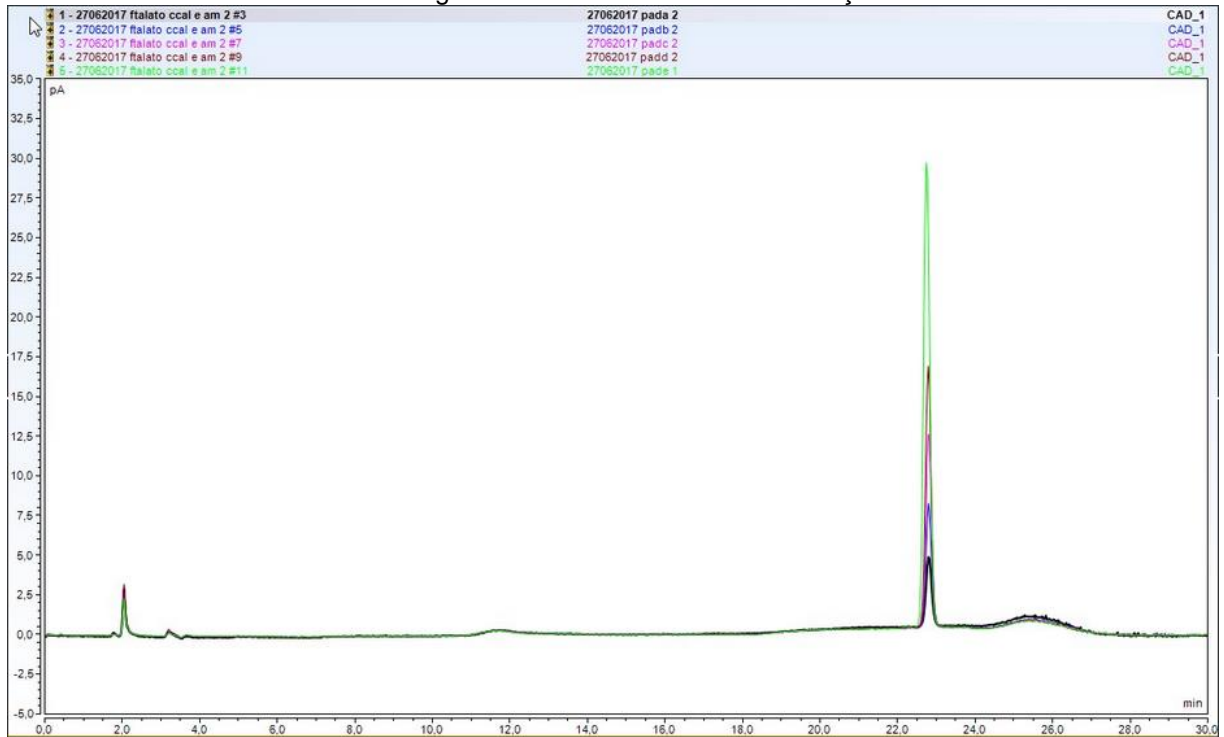


Cromatograma referente às amostras 447, 1328 e 4696.

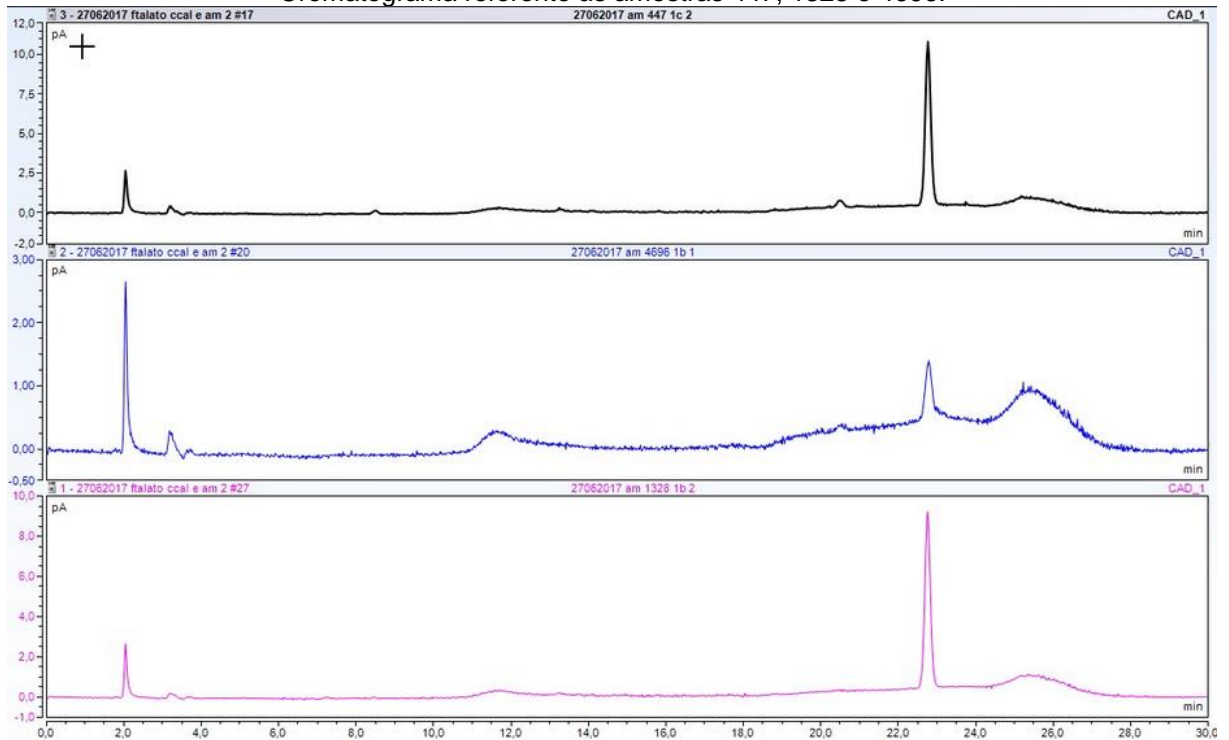


APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS DO DEHP OBTIDOS POR CLAE-CAD

Cromatograma referente à curva de calibração.

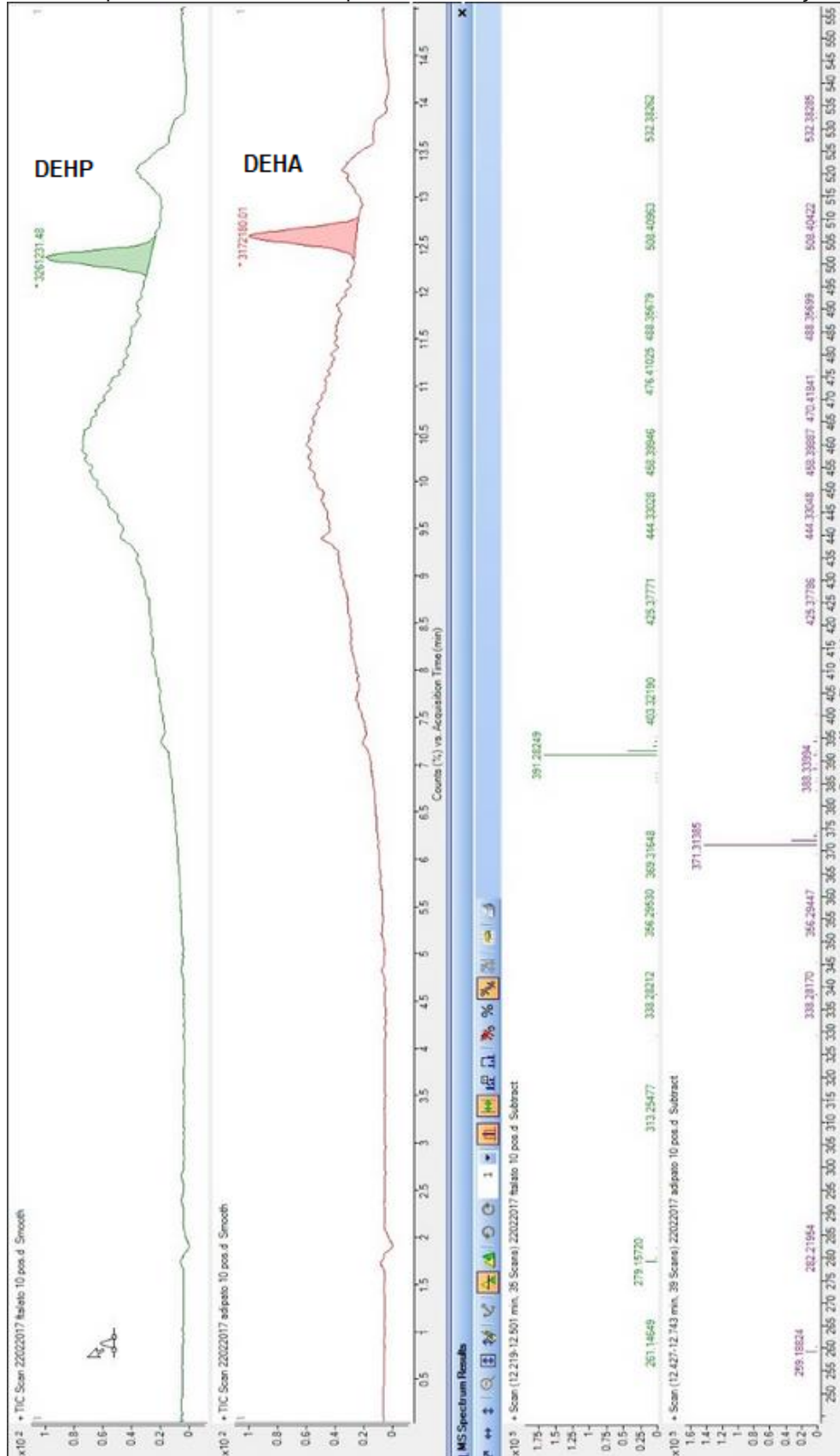


Cromatograma referente às amostras 447, 1328 e 4696.

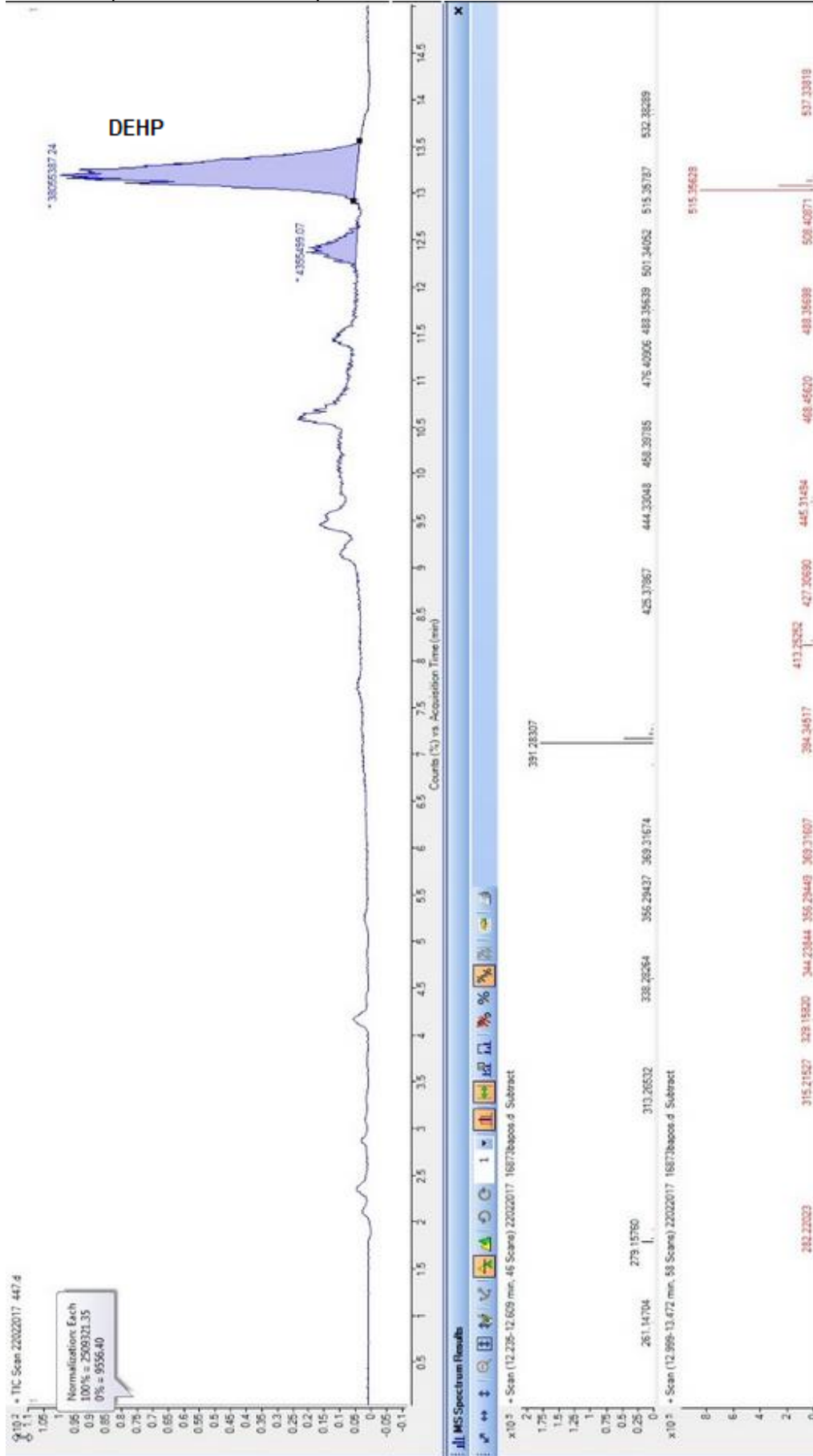


APÊNDICE D – ESPECTROS DE MASSAS DO DEHA E DEHP OBTIDOS POR CLAE-EM

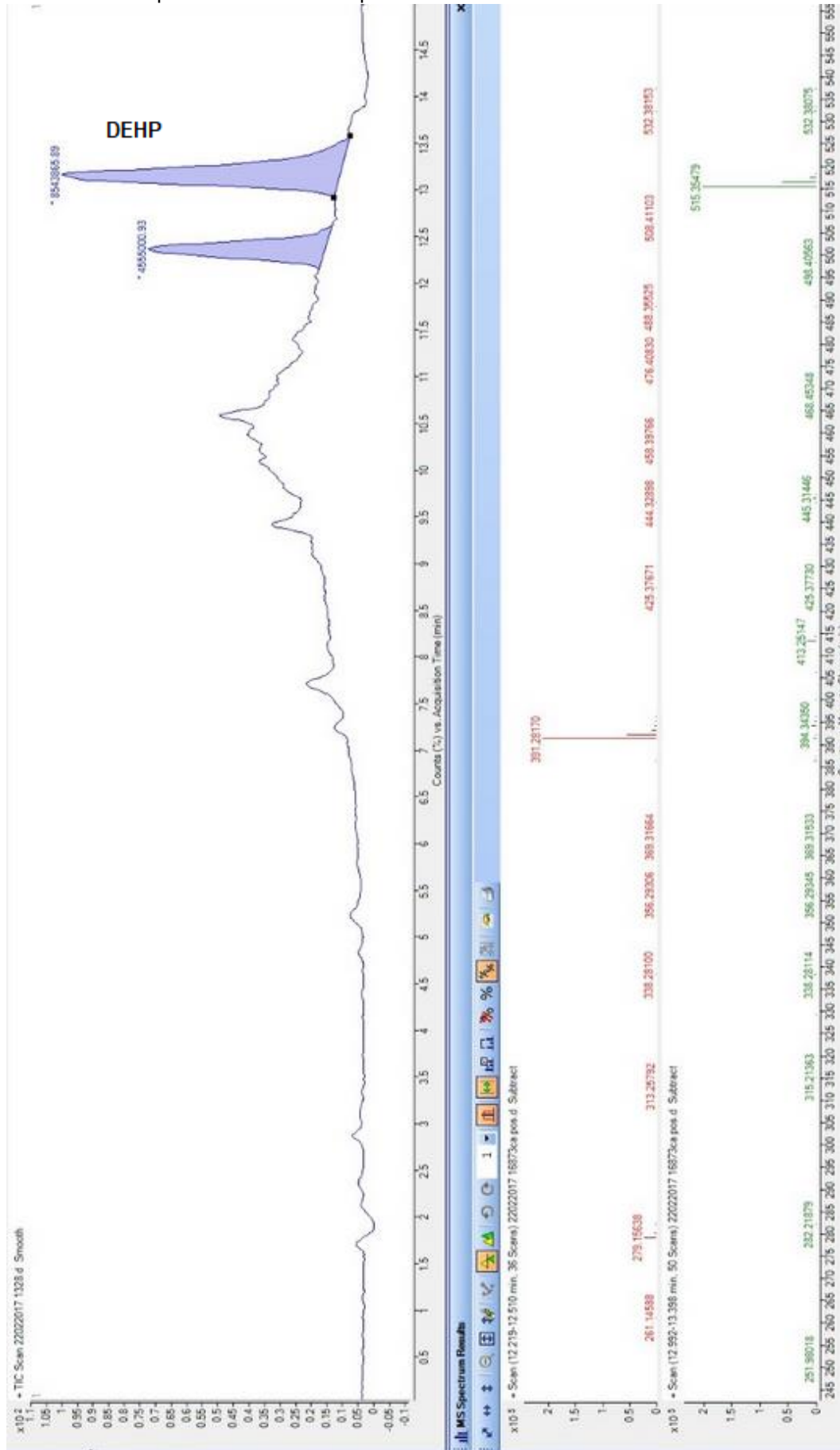
Espectros de massas dos plastificantes DEHP e DEHA referente à solução padrão.



Espectro de massas do plastificante DEHP referente à amostra 447.



Espectro de massas do plastificante DEHP referente à amostra 1328.



Espectro de massas do plastificante DEHP referente à amostra 4696.

