

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

Gleyce Carolina Santos Cruz

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE CITRATO E FOSFATO EM SOLUÇÕES ANTICOAGULANTES
DE BOLSAS DE SANGUE POR CLAE

Rio de Janeiro

2018

Gleyce Carolina Santos Cruz

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CITRATO E FOSFATO EM SOLUÇÕES
ANTICOAGULANTES DE BOLSAS DE SANGUE POR CLAE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Preceptora: Lilian de Figueiredo Venâncio

Tutora: Michele Feitoza Silva

Rio de Janeiro

2018

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

Cruz, Gleyce Carolina Santos

Otimização e validação de método analítico para determinação simultânea de citrato e fosfato em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue por CLAE. / Gleyce Carolina Santos Cruz. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

92 f. : il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.

Tutora: Michele Feitoza Silva.

Preceptora: Lilian de Figueiredo Venâncio.

1. Bolsas Plásticas para Preservação de Sangue. 2. Anticoagulantes. 3. Ácido Cítrico. 4. Fosfato diácido de sódio monohidratado. 5. Cromatografia Líquida de Alta Pressão. I Título

Gleyce Carolina Santos Cruz

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CITRATO E FOSFATO EM SOLUÇÕES
ANTICOAGULANTES DE BOLSAS DE SANGUE POR CLAE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Lucia Helena Pinto Bastos (Doutor)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Anna Maria Barreto Silva Fust (Mestre)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Kátia Christina Leandro (Doutor)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Renata de Freitas Dalavia Vale (Mestre)
Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

A minha família e ao meu marido
Gledson, por sempre me apoiarem e
incentivarem os meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me guiado nesta trajetória, orientado os meus passos e ter me concedido os dons da sabedoria para que eu pudesse concluir mais esta etapa na minha vida;

A minha mãe, Marilza, minha heroína, pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, por tornar tudo isso possível, por todo amor, paciência, confiança e apoio incondicional e por ser essencial em minha vida;

Ao meu pai Orlando, pelo apoio em todos os momentos e pela compreensão da minha ausência;

Ao meu marido, Gledson, pela paciência, pelo carinho, pela compreensão e pelo apoio, quando eu sempre precisei;

A todos os meus familiares e amigos, especialmente, minhas tias e meus primos, agradeço pelo carinho, pelo incentivo no decorrer desta caminhada, pela força e colaboração em todos os momentos, pela torcida e por compreender a minha ausência em alguns momentos;

A minha tutora, Dra. Michele Feitoza, por ter me recebido em seu laboratório e acreditado em mim, pelo seu apoio e por estar sempre à disposição compartilhando seus conhecimentos e suas ideias brilhantes. Agradeço por toda ajuda, pela amizade, por me incentivar e contribuir inestimavelmente para a minha formação profissional e pessoal;

A minha preceptora, Lilian Venâncio pela confiança, por contribuir imensamente para a realização desse trabalho. Além de seus ensinamentos e dedicação à elaboração deste trabalho;

Ao Dr. Filipe Quirino, inicialmente, meu tutor, pela confiança e apoio na realização deste trabalho;

A Anna, Renata e Lilian agradeço por terem me acolhido, pelo convívio, pela confiança, pelo carinho, pela amizade e por toda torcida;

Às amigas que já passaram pelo Setor de Artigos de Saúde: Fernanda (pelo auxílio na realização dos experimentos) e, também, Carolina, Lívia e Mary. Obrigada;

Aos amigos do curso de Residência que fiz nesta jornada de dois anos, especialmente, Paulinha, Taís, Natália, Pablo e Luiza, que estiveram comigo em

todos os momentos. Obrigada pelos ensinamentos, risadas e carinho, por existirem e se fazerem presentes. Agradeço pela amizade;

As minhas amigas que sempre torceram por mim e que estão comigo desde sempre;

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

Ao Ministério da Saúde, Fiocruz e o INCQS pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho;

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e contribuíram para a realização desta pesquisa, o meu muito obrigada.

Importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou
sobre algo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

As bolsas de sangue são produtos de alta complexidade, classificados como risco III, essas se destinam a coletar, armazenar e transferir o sangue de forma eficiente e segura. A referência nacional para análises deste produto é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), responsável pelas análises prévias ao registro e controle destes produtos. A Resolução RDC nº 35 de 2014 fixa as condições exigíveis para bolsas de sangue com soluções anticoagulantes e/ou preservadoras. O citrato total e o fosfato diácido de sódio monohidratado, presentes nas soluções anticoagulantes e/ou preservadoras, possuem grande importância na manutenção da viabilidade do sangue coletado. O método proposto utiliza a cromatografia de íons e permite a determinação simultânea do teor de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado nas soluções anticoagulantes, reduzindo o tempo de análise. Neste contexto o objetivo deste estudo foi realizar a otimização e a validação do método analítico para a determinação simultânea de citrato e fosfato em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando a detecção iônica. Sendo este estudo dividido em quatro etapas: a avaliação retrospectiva das amostras, a comparação dos métodos analíticos, o planejamento da validação analítica compreendendo a adequação do sistema e a otimização da metodologia e a validação analítica. A seleção das amostras de trabalho foi realizada considerando a avaliação retrospectiva das amostras submetidas ao INCQS no período de 2012 a 2016. Foram avaliadas as condições analíticas dos métodos de análise individual e concomitante destas substâncias. A otimização da metodologia analítica, segunda etapa, foi avaliada o fluxo da fase móvel e a diluição das amostras e padrões permitindo a redução do tempo de análise e o custo operacional com eficiência de separação comprovada pelos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico. A validação analítica, terceira etapa do estudo, foi realizada conforme os parâmetros recomendados pela Anvisa, na RE nº 899 de 2003 e a Resolução nº 166 de 2017, e pelo Inmetro, no manual orientativo DOQ-CGCRE-008 de 2016. Na comparação dos métodos, a avaliação estatística demonstrou que não há diferença significativa entre os dois métodos para as análises realizadas. Na etapa de validação analítica, a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e quantificação, a precisão, a exatidão e a robustez

apresentaram resultados satisfatórios que comprovaram a confiabilidade do método, indicando que este é reproduzível. O estudo permitiu comparar as condições analíticas e apresentar os aspectos relevantes da implementação do método alternativo, principalmente, por permitir determinar simultaneamente os analitos de interesse. A validação deste método alternativo, atende aos critérios tanto da Anvisa quanto do Inmetro, o novo método possibilita a diminuição do custo das análises e a possível alteração da legislação vigente no que se refere à normatização de bolsas de sangue utilizadas no Brasil. Além disso, sugere novos avanços no controle da qualidade deste produto e reitera a participação do INCQS em aspectos regulatórios de âmbito sanitário.

Palavras-chave: Bolsas de sangue. Citrato total. Fosfato diácido de sódio monohidratado. Validação analítica. CLAE.

ABSTRACT

Blood bags are products of high complexity, classified as risk III, which are designed to collect, store and transfer blood in an efficient and safe manner. The national reference for analyzes of this product is the National Institute of Quality Control in Health (INCQS / FIOCRUZ), responsible for the pre-registration and control of these products. Resolution RDC n° 35 of 2014 establishes the conditions required for blood bags with anticoagulant and / or preservative solutions. Total citrate and diacid sodium phosphate monohydrate, present in the anticoagulant and / or preservative solutions, are of great importance in maintaining the viability of the collected blood. The proposed method uses ion chromatography and allows the simultaneous determination of the total citrate and sodium diacid phosphate monohydrate contents in the anticoagulant solutions, reducing the analysis time. In this context, the objective of this study was to perform the optimization and validation of the analytical method for the simultaneous determination of total citrate and sodium diacid phosphate monohydrate in anticoagulant solutions of blood bags by high performance liquid chromatography using ionic detection. This study is divided into four stages: the retrospective evaluation of the samples, the comparison of the analytical methods, the planning of the analytical validation, the adequacy of the system and the optimization of the methodology and the analytical validation. The selection of the work samples was performed considering on the retrospective evaluation of the samples submitted to the INCQS in the period from 2012 to 2016. The analytical conditions of the individual and concomitant analysis of these substances were evaluated. The optimization of the analytical methodology, second stage, was evaluated the flow of the mobile phase and the dilution of the samples and standards allowing the reduction of the time of analysis and the operating cost with efficiency of separation proved by the parameters of suitability of the chromatographic system. The analytical validation, the third stage of the study, was performed according to the parameters recommended by Anvisa, in RE n° 899 of 2003 and Resolution n° 166 of 2017, and by Inmetro, in the guideline DOQ-CGCRE-008 of 2016. In the comparison of methods, the statistical evaluation showed that there is no significant difference between the two methods for the analyzes performed. In the analytical validation stage, the selectivity, linearity, limits of

detection and quantification, precision, accuracy and robustness presented satisfactory results that proved the reliability of the method, indicating that the alternative method is reproducible. The study allowed to compare the analytical conditions and to present the relevant aspects of the implementation of the alternative method, mainly, to allow to simultaneously determine the analytes of interest. The validation of this alternative method meets the criteria of both Anvisa and Inmetro, the new method allows a reduction of the cost of exports and the measure of current legislation is not a reference in blood bags not in Brazil. In addition, it suggests new advances without product quality control and reiterates INCQS participation in sanitary quality regulations.

Key-words: Blood bags. Total citrate. Sodium acid phosphate monohydrate. Analytical validation. HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia da bolsa de sangue múltipla	25
Figura 2 - Estrutura química do citrato de sódio.....	28
Figura 3 - Estrutura química do ácido cítrico	28
Figura 4 - Estrutura química do fosfato diácido de sódio monohidratado.....	29
Figura 5 - Cromatógrafo iônico do fabricante Thermo Scientific.....	34
Figura 6 - Cromatograma referente ao padrão de citrato e fosfato na avaliação da adequação do sistema cromatográfico.....	68
Figura 7- Cromatograma da seletividade da (a) amostra comercial CPD, (b) amostra simulada CPD autoclavada e (c) amostra simulada CPD não autoclavada	71
Figura 8 - Cromatograma da seletividade da amostra (a) placebo autoclavado e amostra (b) placebo não autoclavado	72
Figura 9 - Representação gráfica da curva analítica do padrão de ácido cítrico anidro resultante da avaliação da linearidade	73
Figura 10 - Representação gráfica da curva analítica do padrão de fosfato diácido de sódio monohidratado resultante da avaliação da linearidade.....	74
Figura 11 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de citrato total	79
Figura 12 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de fosfato diácido de sódio monohidratado	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos tipos de solução anticoagulante e/ou preservadora.....	27
Tabela 2 - Parâmetros de adequação do sistema.....	36
Tabela 3 - Categorias dos ensaios analíticos de acordo com sua finalidade segundo a Anvisa e a Farmacopeia Americana.....	39
Tabela 4 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa	40
Tabela 5 - Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro.....	40
Tabela 6 - Comparação dos parâmetros de validação recomendados pela Anvisa e Inmetro para os ensaios analíticos.....	41
Tabela 7 - Intervalo de recuperação do analito em função de sua concentração na amostra	48
Tabela 8 - Identificação dos padrões analíticos ácido cítrico anidro e fosfato diácido de sódio monohidratado.....	53
Tabela 9 - Condições cromatográficas para verificação da adequação do sistema utilizando o cromatógrafo Dionex.....	55
Tabela 10 - Parâmetros de avaliação da robustez na validação do método de determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado.....	61
Tabela 11 - Combinações de variações segundo a adaptação do teste de Youden para avaliação da robustez	61
Tabela 12 - Comparação dos métodos analíticos do citrato total.....	64
Tabela 13 - Comparação dos métodos analíticos do fosfato diácido de sódio monohidratado	64
Tabela 14 - Resultado comparativo da amostra de citrato total	66
Tabela 15 - Resultado comparativo da amostra de fosfato diácido de sódio monohidratado	66
Tabela 16 - Resultados obtidos na adequação do sistema cromatográfico para a determinação de citrato e fosfato utilizando coluna Ionpac AS11	69
Tabela 17 - Avaliação do preparo da amostra/padrões.....	69
Tabela 18 - Avaliação do fluxo da fase móvel para a determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado.....	70
Tabela 19 - Resultados da avaliação da repetibilidade em relação ao DPR do citrato total	75

Tabela 20 - Resultados da avaliação da repetibilidade em relação ao DPR do fosfato diácido de sódio monohidratado.....	75
Tabela 21 - Resultados da avaliação da precisão intermediária em relação ao DPR do citrato total.....	76
Tabela 22 - Resultados da avaliação da precisão intermediária em relação ao DPR do fosfato diácido de sódio monohidratado.....	76
Tabela 23 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão na determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado	77
Tabela 24 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de citrato total.	78
Tabela 25 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de fosfato diácido de sódio monohidratado.	79

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da recuperação.....	47
Equação 2 - Determinação do efeito normal.....	62
Equação 3 - Determinação do efeito da variação	62
Equação 4 - Determinação do efeito	62

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DPR	Desvio Padrão Relativo
CV	Coeficiente de variação
EA	Evento adverso
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Harpya	Sistema de Gerenciamento de Amostras Laboratoriais
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INT	Instituto Nacional de Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
MS	Ministério da Saúde
NBR	Norma Brasileira
Notivisa	Sistema de Notificação em Vigilância Sanitária
OMS	Organização Mundial de Saúde
QT	Queixa técnica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
Sinmetro	Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
Vigipós	Vigilância pós-comercialização
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Vigilância sanitária de produtos para a saúde	20
1.2 Tecnovigilância no Brasil	21
1.3 Bolsas de sangue	23
1.3.1 Solução anticoagulante e/ou preservadora	25
1.3.2 A importância do ensaio para a determinação do teor de citrato total expresso em ácido cítrico anidro	28
1.3.3 A importância do ensaio para a determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado	29
1.4 Métodos cromatográficos	30
1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
1.4.1.1 <i>Princípios básicos da Cromatografia Lônica</i>	31
1.5 Controle da qualidade atual do citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado presente nas soluções anticoagulantes das bolsas de sangue	32
1.5.1 Citrato total por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	32
1.5.2 Fosfato diácido de sódio monohidratado por Espectrofotometria.....	33
1.6 Validação de método alternativo para determinação simultânea do teor citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado presentes nas soluções anticoagulantes das bolsas de sangue	33
1.7 Otimização da separação cromatográfica	34
1.7.1 Fatores que afetam o resultado de adequação do sistema	35
1.8 Validação analítica	36
1.8.1 Parâmetros de validação analítica.....	41
1.8.1.1 <i>Seletividade e/ou Especificidade</i>	42
1.8.1.2 <i>Linearidade e faixa de trabalho ou intervalo da curva de calibração</i>	42
1.8.1.3 <i>Limite de Detecção e Limite de Quantificação</i>	44
1.8.1.4 <i>Precisão</i>	44
1.8.1.5 <i>Exatidão, Tendência ou Recuperação</i>	46
1.8.1.6 <i>Robustez</i>	48

1.9 Justificativa	49
2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Material, equipamentos e acessórios	52
3.1.1 Preparo dos padrões analíticos	53
3.1.2 Preparo da amostra	54
3.1.3 Preparo da fase móvel.....	54
3.2 Métodos	54
3.2.1 Condições cromatográficas	54
3.3 Avaliação retrospectiva e seleção das amostras submetidas ao INCQS	55
3.4 Comparação dos métodos analíticos	56
3.5 Planejamento da validação analítica	56
3.5.1 Adequação do sistema cromatográfico.....	56
3.5.2 Otimização da metodologia analítica	57
3.5.2.1 <i>Avaliação da diluição da amostra e padrões</i>	57
3.5.2.2 <i>Avaliação do fluxo da fase móvel</i>	57
3.6 Validação analítica	58
3.6.1 Avaliação da seletividade	58
3.6.2 Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção.....	59
3.6.3 Avaliação da precisão.....	59
3.6.4 Avaliação da exatidão.....	60
3.6.5 Avaliação da robustez	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Avaliação retrospectiva e seleção das amostras submetidas ao INCQS	63
4.2 Comparação dos métodos analíticos	63
4.3 Planejamento da validação analítica	67
4.3.1 Adequação do sistema cromatográfico.....	67
4.3.2 Otimização da metodologia analítica	69
4.3.2.1 <i>Avaliação da diluição da amostra e padrões</i>	69
4.3.2.2 <i>Avaliação do fluxo da fase móvel</i>	70

4.4 Validação da metodologia analítica	71
4.4.1 Avaliação da seletividade	71
4.4.2 Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção.....	72
4.4.3 Avaliação da precisão.....	74
4.4.4 Avaliação da exatidão.....	76
4.4.5 Avaliação da robustez	77
5 CONCLUSÃO	82
6 PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO A - PLANILHA DE LINEARIDADE DO CITRATO TOTAL	92
ANEXO B - PLANILHA DE LINEARIDADE DO FOSFATO DIÁCIDO DE SÓDIO MONOHIDRATADO	93

1 INTRODUÇÃO

Os produtos para saúde, quando utilizados nas condições e para as finalidades previstas, devem atuar de forma a não comprometer a saúde dos pacientes e dos operadores do produto. No Brasil, a vigilância pós-comercialização de produtos para saúde é conhecida como tecnovigilância. A Unidade de Tecnovigilância (UTVIG) da Anvisa consiste em um sistema de vigilância de eventos adversos (EA) e queixas técnicas (QT) de produtos para saúde na fase de pós-comercialização, sendo coordenada pelo Núcleo de Gestão do Sistema Nacional de Notificação e Investigação em Vigilância Sanitária (NUVIG/ANVISA). Esse tem o objetivo de verificar a segurança e o desempenho, para assim, garantir a proteção e a promoção da saúde (BRASIL, 2010).

O Sistema de Notificação em Vigilância Sanitária (Notivisa) foi desenvolvido com o propósito de fortalecer a vigilância pós comercialização e pós-uso permitindo receber as notificações de EA e QT relacionadas ao uso de produtos e de serviços sob vigilância sanitária (VISA).

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

O grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas mais robustas possibilitaram a detecção e identificação de novas substâncias em faixas de concentração mais baixas, contribuindo, assim, para o melhor aperfeiçoamento das análises de controle (BELLI, 2006).

O controle da qualidade das bolsas de sangue segue os parâmetros descritos na legislação vigente, a Resolução RDC nº 35, de 12 de junho de 2014 que substituiu a Portaria nº 950 de 26 de novembro de 1998, apresentando as metodologias, as quais, foram avaliadas, otimizadas e validadas (VALE, 2010). Esta consiste no principal instrumento que está relacionado com os compêndios oficiais e às normas técnicas internacionais (BRASIL, 2014).

Esta legislação preconiza uma avaliação inicial de aspectos gerais pela verificação de parâmetros de transparência, flexibilidade, resistência, compatibilidade com o conteúdo sob condições normais de estocagem, dimensão,

embalagem e rotulagem. Além da verificação de tubos de coleta, agulha para coleta e tubos de saída. A avaliação dos aspectos específicos é recomendada por ensaios físicos, biológicos e físico-químicos (BRASIL, 2014).

A bolsa de sangue é um produto que consiste em bolsas plásticas e estéreis, completas com tubo de coleta, tubos de saída, tubos de transferência, agulha para coleta e recipientes associados, no qual, depende da sua finalidade (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003). São produtos de alta complexidade, classificados como produtos de risco III, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 185, de 22 de outubro de 2001 (BRASIL, 2014). Este produto se destina a coleta armazenamento, processamento, separação, administração e transporte do sangue e seus componentes de forma eficiente e segura.

As bolsas de sangue podem ser do tipo seca, ou seja, bolsas de sangue sem solução anticoagulante e/ou preservadora ou com solução anticoagulante e/ou preservadora. A referência nacional para análises deste produto é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz, responsável pelas análises prévias ao registro e controle (VALE, 2010).

1.1 Vigilância sanitária de produtos para a saúde

Os produtos para a saúde também, definidos como "correlatos" pela Lei nº 6.360/76 e o Decreto nº 79.094/77 são classificados conforme o risco associado ao seu uso, de acordo com a RDC nº 185 de 2001. Esta classificação ocorre em 4 classes, seguindo a criticidade do produto. Uma situação crítica com os produtos para a saúde é a dificuldade em detectar o problema do produto no mercado (BRASIL, 1976; BRASIL, 1977; BRASIL, 2001; ANVISA, 2010; ANVISA, 2015b).

O processo de fabricação possui um critério de exigências para a qualidade e segurança do produto, no entanto, isso não permite que o produto seja totalmente isento de causar algum dano ao paciente ou usuário. Portanto, existem riscos e possibilidades da ocorrência de desvios da qualidade, incluindo os EA durante a utilização de produtos para saúde. A ocorrência de EA e de QT relacionadas a estes pressupõe a existência de riscos e pode representar ameaça à saúde da população, usuários e pacientes desses produtos (ANVISA, 2010; BRASIL, 2010).

A exposição ao sistema de saúde pode gerar danos, e, com isso não só proporcionar benefícios, sendo uma incumbência inevitável a ser paga pelos avanços tecnológicos da medicina, que prevê a incorporação de tecnologias em saúde, dentre as quais, a diversidade de equipamentos e artigos médico-hospitalares.

Assim, as inúmeras tecnologias que foram implementadas ao atendimento das necessidades de saúde da população são consideradas como questões críticas no cuidado, havendo modificação dos espaços e serviços de assistência. A maioria desses avanços tecnológicos incorporados necessita de um alto grau de conhecimento, tanto para a produção adequada da assistência específica, como para a sua correta manutenção e manipulação. Considerando que o uso de produtos para saúde pode acarretar algum tipo de risco ao paciente, é importante o acompanhamento da utilização desses produtos na pós-comercialização (ANVISA, 2010; BRASIL, 2010).

Nesta etapa, a Tecnovigilância reveste-se de importância e representa uma ferramenta fundamental para garantir que a população tenha segurança na utilização dos produtos médicos disponibilizados pela rede de atenção à saúde. Desse modo, é essencial o monitoramento do uso dos produtos para saúde, a fim de se conhecer seu desempenho, adotar estratégias de prevenção, de minimização ou de contenção dos riscos e, conseqüentemente, evitar que riscos equivalentes possam ser reproduzidos em outros locais, pelas mesmas causas (BRASIL, 1976; BRASIL, 2010; BRASIL, 2015).

1.2 Tecnovigilância no Brasil

Os produtos para saúde, quando utilizados nas condições aceitáveis e para as finalidades previstas, devem atuar de forma a não comprometer a saúde dos pacientes e dos operadores do produto (BRASIL, 2001; ANVISA, 2010; ANVISA, 2015b).

O produto para saúde após receber a aprovação da Anvisa/Ministério da Saúde (MS) para ser comercializado, inicia a fase de pós-comercialização, onde podem ser observados problemas inesperados durante a avaliação do registro/cadastro. É de suma importância reunir e avaliar as informações recebidas sobre um determinado produto, ou seja, realizar a vigilância pós-comercialização,

pois, a proteção e a promoção da saúde da população são atribuições da VISA (BRASIL, 1976; BRASIL, 2010).

No Brasil, a vigilância pós-comercialização de produtos para saúde é designada como tecnovigilância. A Unidade de Tecnovigilância (UTVIG) consiste em um sistema de vigilância de EA e QT de produtos para a saúde na fase de pós-comercialização, sendo coordenada pelo Núcleo de Gestão do Sistema Nacional de Notificação e Investigação em Vigilância Sanitária (NUVIG/ANVISA), no qual, tem por objetivo verificar a segurança e o desempenho, para assim, garantir a proteção e a promoção da saúde (BRASIL, 2010). Segundo o Manual de Tecnovigilância da Anvisa (2010), EA é “um efeito não desejado, em humanos, decorrente do uso de produtos submetidos à VISA”, e QT consiste em uma reclamação de “suspeita de alteração/irregularidade de um produto relacionada a aspectos técnicos ou legais, que poderá ou não causar dano à saúde” (ANVISA, 2010; BRASIL, 2010).

A UTVIG criada em 2001, tornou a Anvisa responsável por receber os relatos obrigatórios dos profissionais de saúde e detentores de registro de produtos para a saúde, com a finalidade de submeter a publicação de alertas, a retirada de produtos do mercado e o acompanhamento dos processos de revalidação de registros (BRASIL, 2010; ANVISA, 2015a).

Com o propósito de fortalecer a vigilância pós-uso, foi desenvolvido o Notivisa (Sistema de Notificação em Vigilância Sanitária) sistema informatizado nacional no portal da Anvisa, que permite receber as notificações de EA e QT relacionadas ao uso de produtos e de serviços sob VISA, realizadas pelos hospitais da Rede Sentinela, que funciona como observatório no âmbito dos serviços para o gerenciamento de riscos à saúde, em atuação conjunta e efetiva com o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), empresas detentoras de registro, dos profissionais de saúde e dos cidadão, que visa minimizar os riscos e problemas associados ao produto (BRASIL, 2013; ANVISA, 2015a).

A Portaria nº 1.660, de 22 de julho de 2009, que instituiu o Sistema de Notificação e Investigação em VISA – Vigipós representou um marco na vigilância de EA e QT, possibilitou obter melhores informações dos EA e QT dos produtos comercializados no país e subsidiou a regulação no âmbito sanitário, pois, integrou a VISA e epidemiológica ao sistematizar e integrar os mecanismos de notificação, monitoramento e investigação de EA relacionados a serviços e produtos para a saúde (BRASIL, 2009; MORAIS, 2011).

Com o objetivo de facilitar e agilizar à obtenção de informações sobre o desempenho dos produtos em uso, a Anvisa implantou em 2002 a Rede Brasileira de Hospitais Sentinela, formada por hospitais de ensino e/ou alta complexidade, para atuar como observatórios do desempenho e da segurança de produtos para saúde, permitindo incentivar as notificações de EA e QT (BRASIL, 2010; ANVISA, 2015a).

A investigação é realizada pela Anvisa, de acordo com os critérios utilizados para cada produto e com a gravidade dos casos. Conforme haja confirmação do caso, é necessária uma ação da empresa detentora do registro, envolvendo a geração de alertas de segurança e a divulgação para os serviços de saúde e população, a fim de impossibilitar ou minimizar a probabilidade de ocorrência de danos à saúde da população exposta ao produto (BRASIL, 2010; ANVISA, 2015a).

Em 2009, foi publicada a Resolução da Anvisa nº 67 que dispõe sobre as normas de tecnovigilância aplicáveis aos detentores de registro de produtos para saúde no Brasil e, assim, obrigou os detentores a notificar as ocorrências envolvendo seus produtos. Isso revelou a preocupação com o monitoramento dos produtos na pós-comercialização, representando extrema importância para o SNVS, pois, permite o recolhimento de dados, contribuindo para as ações fiscalizadoras e a evolução regulatória (BRASIL, 2009; FEITOZA-SILVA, 2014).

1.3 Bolsas de sangue

As bolsas plásticas de sangue foram desenvolvidas para substituir os frascos de vidro. Isso permitiu a fabricação de componentes estéreis, facilitando a sua armazenagem após o fracionamento e reduzindo a contaminação, a ruptura e as embolias provocadas quando o sangue era armazenado em recipientes de vidro (VALE, 2010; FUST, 2011).

A bolsa plástica para armazenamento do sangue foi inventada em 1947, licenciada e introduzida no mercado na década de 1960 (VALE, 2010).

Novas descobertas tecnológicas continuaram no século XX onde os primeiros bancos de sangue apareceram nos Estados Unidos por volta da década de 30 com o armazenamento do sangue pelo período de até 21 dias em frascos reutilizáveis. Esta forma de coleta apresentava grande risco de contaminação por corresponder a um sistema aberto (VALE, 2010; FUST, 2011).

As técnicas transfusionais foram aperfeiçoadas durante as duas guerras e após a 2ª Guerra Mundial iniciou-se o uso de bolsas plásticas para substituir o uso dos frascos de vidro, o que permitiu a redução do risco de contaminação pelo sistema fechado de coleta. Com isso, surgiram também as centrífugas destinadas ao fracionamento do sangue para obtenção dos hemocomponentes (hemácias, plasma, plaquetas e crio-precipitado). Entretanto, o grande aperfeiçoamento veio na década de 80, com o acréscimo de bolsas satélites, o que permitiu um fracionamento do sangue mais seguro (VALE, 2010; PROWSE, 2014; HARMENING, 2015; SERRANO et al, 2015; BRASIL, 2016).

As bolsas plásticas deveriam produzir menor índice de contaminação do sangue comparando aos frascos de vidro utilizados anteriormente. Porém, como as fábricas nacionais que abasteciam o mercado interno funcionavam em condições muito precárias, ocorreram diversos problemas transfusionais por contaminação bacteriana ou química (com o próprio material das bolsas). Isso culminou com a interdição de todas as fábricas de bolsas plásticas em outubro de 1986 e levou a escassez de bolsas, impedindo a coleta de sangue em alguns serviços (SANTOS, 1992; VALE, 2010).

Em comparação com o armazenamento em vidro, a bolsa plástica reduziu a hemólise dos glóbulos vermelhos em quatro vezes, reduzindo também as taxas de contaminação bacteriana e de reações pirogênicas. Além de permitir a viabilidade de 84% do sangue armazenado por 20 dias e 72% do sangue armazenado por 28 dias, contrastando com o armazenamento em frascos de vidro que permitia a viabilidade de cerca de 70% do sangue armazenado após 21 dias (VALE, 2010; FUST, 2011).

Sendo um insumo essencial para a hemoterapia, as bolsas de sangue fazem parte do programa estratégico de sangue e hemoderivados, criado pelo MS (BRASIL, 2013; BRASIL, 2016).

No Brasil, foram realizadas 3.720.867 doações de sangue em 2014. Ao ano, cerca de 3,5 milhões de pessoas realizam transfusões de sangue. No total, existem no país 27 hemocentros e 500 serviços de coleta (BRASIL, 2017a). Portanto, a ocorrência de desvios da qualidade neste produto pode comprometer um grande número de pessoas, causando um grande impacto em saúde pública.

A Figura 1 demonstra uma bolsa de sangue, que nas condições ideais para uso, são transparentes, incolores, flexíveis, estéreis, apirogênicas, isentas de toxicidade, resistentes e compatíveis com o conteúdo sob condições normais de

estocagem. Esse produto apresenta como requisitos de controle da qualidade, a avaliação de aspectos gerais e avaliação de aspectos específicos.

Figura 1 - Fotografia da bolsa de sangue múltipla



Fonte: (Do autor, 2016).

Estudos realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) levaram a determinação de novos parâmetros no controle da qualidade do produto, que levaram à publicação da RDC nº 35 de 2014. Essa resolução estabelece os requisitos e os ensaios para o controle da qualidade das bolsas plásticas para sangue humano e suas frações, determinando as condições necessárias (FUST, 2009; VALE, 2010; BRASIL, 2014).

De acordo com esse regulamento, as bolsas plásticas devem manter-se estáveis biologicamente, quimicamente e fisicamente em relação ao seu conteúdo durante o período de validade e não devem permitir a entrada de micro-organismos. Além disso, não devem liberar qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante e/ou preservadora, sangue ou componentes, quer por interação química ou dissolução física (BRASIL, 2014).

As bolsas plásticas para sangue devem obrigatoriamente estar em conformidade com a legislação vigente para obterem o registro e revalidação de registro na Anvisa. A conformidade destes produtos deve ser comprovada através de análise prévia em laudos técnicos emitidos pelo INCQS.

1.3.1 Solução anticoagulante e/ou preservadora

As soluções anticoagulantes e/ou preservadoras presentes em bolsas de sangue tem como finalidade: manter a qualidade do sangue e suas frações; durante o período de armazenamento de forma eficiente e segura (VALE, 2010).

A viabilidade do sangue estocado apresenta-se dependente da técnica da coleta, do anticoagulante, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos e da frequência de homogeneização durante o armazenamento.

A principal característica da bolsa de sangue consiste no tipo de solução anticoagulante e/ou preservadora que apresentam. Os tipos de soluções anticoagulante e/ou preservadora diferem nos componentes que possuem e no tempo de conservação do sangue (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003; VALE, 2010).

Conforme descrito na Farmacopeia Americana, o sangue e suas frações podem ser utilizados logo após a coleta ou num período de até 42 dias se conservado à temperatura de 1 a 6 °C no tipo de solução anticoagulante e/ou preservadora adequada. Assim, obedecendo a temperatura recomendada, o período de armazenamento do sangue dependerá do tipo de hemocomponente a ser extraído ou utilizado e, da solução anticoagulante e/ou preservadora.

A composição da solução interfere diretamente no tempo de armazenagem do sangue, seus componentes apresentam finalidades distintas e em conjunto possibilitam sua conservação. Por exemplo, o citrato e o fosfato contribuem para a estabilização da membrana celular mantendo o controle do pH, o citrato ainda atua na anticoagulação (VALE, 2010).

Para fins de registro, as bolsas plásticas devem ser agrupadas por tipo de solução anticoagulante e/ou solução preservadora e por tipo de plástico, não requerendo a liberação de qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante e/ou preservadora, sangue ou suas frações (BRASIL, 1998; BRASIL, 2014).

Na tabela 1 estão descritos os tipos de soluções anticoagulantes e/ou preservadoras que existem e o tempo de armazenamento.

Tabela 1 - Composição dos tipos de solução anticoagulante e/ou preservadora.

Tipo de Solução	Componente	Tempo de armazenamento
Solução ACD	Citrato total, expresso em ácido cítrico anidro - (C ₆ H ₈ O ₇)	Até 21 dias
	Glicose monoidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	
Solução CPD	Fosfato diácido de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	Até 21 dias
	Glicose monoidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	
	Citrato total, expresso em ácido cítrico anidro - (C ₆ H ₈ O ₇) Sódio	
Solução CPDA	Fosfato diácido de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	Até 35 dias
	Glicose monoidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	
	Citrato total, expresso em ácido cítrico anidro - (C ₆ H ₈ O ₇) Sódio	
	Adenina (C ₅ H ₅ N ₅)	
	Glicose monoidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O)	
Solução SAG-M	Manitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	Até 42 dias
	Adenina (C ₅ H ₅ N ₅)	
	Cloreto de sódio - (NaCl)	

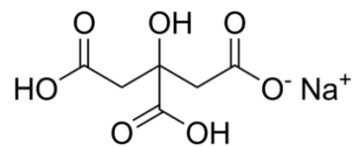
Fonte: (ADAPTADO DE BRASIL, 2014).

1.3.2 A importância do ensaio para a determinação do teor de citrato total expresso em ácido cítrico anidro

A associação do citrato de sódio (Figura 2) com o ácido cítrico (Figura 3) atua como uma solução tampão, tendo como função prevenir mudanças bruscas no pH de modo a manter a viabilidade de cada constituinte sanguíneo. Esta combinação está presente em bolsas de sangue contendo soluções do tipo: CPD que apresenta na sua composição citrato-fostato-dextrose; CPDA de composição citrato-fostato-dextrose-adenina e ACD, de composição citrato-dextrose (VALE, 2010; FERNANDES, 2016).

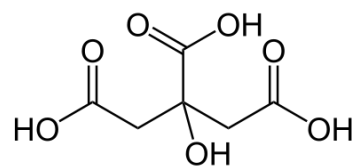
O citrato de sódio é um quelante de cálcio que reage com o cálcio livre do sangue formando sais insolúveis. A ausência de cálcio livre impede a efetivação do mecanismo de coagulação sanguínea. O citrato de sódio não preserva os eritrócitos, portanto, o sangue deve ser utilizado em até 24 horas após a coleta. É o anticoagulante mais utilizado (HOFFBRAND, 2013).

Figura 2 - Estrutura química do citrato de sódio



Fonte: (HOFFBRAND, 2013).

Figura 3 - Estrutura química do ácido cítrico



Fonte: (HOFFBRAND, 2013).

A determinação do teor de citrato total apresenta-se em termos de ácido cítrico anidro, pois, conforme recomendação da RDC nº 35/2014, a metodologia do teor de citrato total é expressa em ácido cítrico anidro (BRASIL, 2014).

O teor de citrato total deve se apresentar na faixa estabelecida pela legislação vigente (RDC nº 35/2014) de acordo com o tipo de solução. O método para

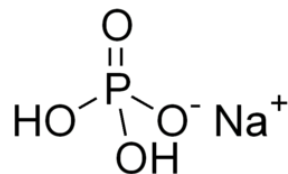
determinação desse teor utiliza a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE/UV) (BRASIL, 2014).

A necessidade de revisão do método apresenta-se evidente nesta abordagem onde atualizações proporcionarão um controle mais efetivo, visto que, a análise do citrato é de suma importância para manter a qualidade das bolsas de sangue (VALE, 2010; BRASIL, 2014; FERNANDES et al, 2016). A proposta de um novo método em uma nova abordagem propiciará alternativas ao setor regulado, já que a análise do citrato e os estudos relacionados a esta substância são de grande relevância.

1.3.3 A importância do ensaio para a determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado

O fosfato (Figura 4), além de ser substrato para formação do 2,3 - difosfoglicerato (2,3-DPG) atua como um tampão ligando-se aos íons H^+ produzidos durante a glicólise e impedindo a queda do pH do sangue que é o principal fator relacionado com a degradação do 2,3-DPG. Conseqüentemente tem-se uma menor taxa de hemólise e uma maior viabilidade celular (HOFFBRAND, 2013).

Figura 4 - Estrutura química do fosfato diácido de sódio monohidratado



Fonte: (HOFFBRAND, 2013).

A RDC nº 35/2014 recomenda a utilização da metodologia descrita na Farmacopeia Americana. A Portaria nº 950/1998 (revogada) recomendava a técnica de espectrofotometria até a 29ª edição e nas edições seguintes (30ª, 31ª e 32ª) passou a recomendar a técnica de cromatografia iônica para esta determinação. A metodologia por cromatografia em fase líquida utiliza como padrão fosfato diácido de sódio monohidratado, fase móvel solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio sob o fluxo de 2,0 mL por minuto, temperatura do forno em 30 °C, coluna de troca iônica e detector condutométrico. A determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado é realizada pela comparação de áreas (amostra e padrão) e

expresso em termos de fosfato diácido de sódio monohidratado. A análise do fosfato é de extrema importância para o controle deste produto e para sua função que é de manter o sangue viável (BRASIL, 1998; VALE, 2010; BRASIL, 2014; FERNANDES, 2016).

1.4 Métodos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica que envolve processos de separação de misturas e identificação de substâncias, ou seja, tem por finalidade a identificação, separação e a purificação de misturas. A interação das substâncias na mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iônica, bipolar, apolar, efeitos de afinidade e solubilidade (LEITE, 2008; ALEXANDRE, 2010; MICHALSKI, 2012).

Esta pode ser utilizada para a identificação das substâncias, na comparação com padrões. Purificação de substâncias, separando-se as indesejáveis e para a separação das substâncias de uma mistura e determinação de teores pela comparação com curvas padrões (ALEXANDRE, 2010; MICHALSKI, 2012).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios: a classificação pela forma física do sistema cromatográfico (coluna ou planar); classificação pela fase móvel empregada (gás, líquido ou fluido supercrítico); classificação pela fase estacionária utilizada (líquida, sólida ou líquido ligado) e a classificação pelo modo de separação (adsorção, partição, troca iônica, tamanho molecular) (ALEXANDRE, 2010).

1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método físico-químico, e está estabelecida na migração diferencial dos componentes de uma mistura, devido a interações entre duas fases, sendo estas: a fase móvel e a fase estacionária. Possui grande aplicação por ser uma técnica bastante versátil (ALEXANDRE, 2010; KLEIN, 2010).

A cromatografia iônica pertence ao grupo da cromatografia líquida em que a fase estacionária é um sólido e a fase móvel é um líquido. A cromatografia por troca iônica é um processo dinâmico, no qual, utilizamos gradientes de concentração para

a eluição de diferentes íons e sua respectiva separação com a eficiência requerida. As modelagens apresentadas com as simplificações são utilizadas com maior rigor e melhores resultados em cromatografia gasosa e CLAE, onde temos a fase móvel sem a utilização de um gradiente de concentração (MARQUES, 1999; ALEXANDRE, 2010; KARTHIKEYAN, 2011; MICHALSKI, 2012).

É uma técnica bastante difundida, sua aplicabilidade apresenta resultados confiáveis e reproduzíveis. A técnica cromatográfica possui uma fase estacionária sendo esta os trocadores iônicos (catiônicos ou aniônicos) formados a partir de polímeros de estireno-divinilbenzeno ou de sílicas.

A troca iônica é a permuta de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido insolúvel. É usada uma resina de troca iônica acondicionada em tubos de vidro ou aço inox (colunas), por onde é passada a solução contendo os íons a separar (LEITE, 2008; KARTHIKEYAN, 2011; MICHALSKI, 2012).

As resinas de troca iônica são polímeros contendo íons ativos que permutam reversivelmente de posição com outros íons contidos na solução passante. Estas trocam íons da solução por cátions de hidrogênio ou ânions hidroxilas.

Podem ser regeneradas por soluções ácidas ou alcalinas, conforme o tipo de resina. A maioria das resinas, atualmente, empregadas são sintéticas, baseadas em um copolímero de estireno-divinilbenzeno, tratado apropriadamente para agregar grupos funcionais. A sulfonação dá lugar a resinas catiônicas e resinas aniônicas (LEITE, 2008; ALEXANDRE, 2010; KARTHIKEYAN, 2011).

1.4.1.1 *Princípios básicos da Cromatografia Iônica*

O processo de troca iônica é estequiométrico, isto é, os íons são trocados em quantidades equivalentes. A mobilidade de troca dos íons determina a taxa de difusão. Conforme já mencionado a fase estacionária é constituída de uma matriz onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis (catiônicos ou aniônicos). A fase móvel é, geralmente, uma solução iônica com propriedades escolhidas de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado (MARQUES, 1999; ALEXANDRE, 2010; KARTHIKEYAN, 2011; MICHALSKI, 2012). As resinas de troca iônica podem ser classificadas como: ácidas e básicas fortes; ácidas e básicas fracas e ácidas e básicas intermediárias.

Após a interação dos íons da amostra com a resina, uma solução eluente é passada pela coluna de cromatografia liberando assim os íons que estavam interagindo com a resina.

A cromatografia é um processo essencialmente dinâmico, porém podemos considerar como a existência de um “equilíbrio”, em uma troca iônica, o que simplifica muito o tratamento teórico. As ligações dos íons com a resina são lábeis. Quanto maior a resolução da coluna mais estreita deve ser o alargamento da banda passante.

Em sistemas bem projetados os sinais cromatográficos tendem a forma gaussiana estreita, porém dependendo da resina, do tipo de analito e do solvente, podem aparecer caudas.

1.5 Controle da qualidade atual do citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado presente nas soluções anticoagulantes das bolsas de sangue

1.5.1 Citrato total por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O método atual para determinação do teor de citrato total se baseia pela CLAE por detecção ultravioleta. A determinação do teor de citrato total expresso em ácido cítrico anidro, seguindo a RDC nº 35/2014, fundamenta-se na partição dos componentes de uma mistura entre a fase estacionária (coluna) e a fase móvel (fluxo de solventes). As substâncias mais solúveis na fase estacionária são seletivamente mais retidas, enquanto as mais solúveis na fase móvel eluem mais rapidamente. Após a migração diferencial das substâncias da mistura na coluna, os analitos são detectados e registrados na forma de sinais. Possui como vantagens a capacidade de separação bem elevada, rapidez e reprodutibilidade das análises (MARQUES, 1999; ALEXANDRE, 2010).

Um dos cuidados a serem observados, está relacionado à fase móvel, ausente de partículas para evitar danos à bomba, injetor e coluna, deve ser filtrada antes de ser armazenada no reservatório e deve ser degaseificada para eliminar bolhas (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

Neste sistema temos, a bomba que controla o fluxo e a pressão da fase móvel. Pode trabalhar em regime isocrático ou em gradiente, o injetor que permite

com precisão e exatidão a injeção do padrão e da amostra, a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação, feita em aço e preenchida com a fase estacionária, que pode estar dentro do forno e o detector que é um módulo onde indica um sinal dos componentes separados pela coluna cromatográfica.

1.5.2 Fosfato diácido de sódio monohidratado por Espectrofotometria

A RDC nº 35/2014 recomenda a utilização da metodologia para determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado descrita na Farmacopeia Americana. Embora seja recomendada a metodologia pela técnica de cromatografia em fase líquida desde a 30ª edição desta farmacopeia, a legislação considera que a metodologia descrita na 29ª edição pela técnica de espectrofotometria apresenta excelentes vantagens.

A determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado na RDC nº 35/2014 é realizada pela comparação das absorvâncias obtidas (amostra e padrão) e expresso em termos de fosfato diácido de sódio (THE UNITED, 2016). Nesta metodologia é realizada medição da absorvância da solução anticoagulante, utilizando os padrões e a amostra no comprimento de onda de 660 nm.

1.6 Validação de método alternativo para determinação simultânea do teor citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado presentes nas soluções anticoagulantes das bolsas de sangue

Analisando o produto bolsa de sangue, torna-se de extrema importância o cuidado na escolha do método empregado, e a cromatografia iônica pela criticidade do produto, trata-se de um método analítico de determinação precisa e exata, e ainda, permite uma análise simultânea de citrato e fosfato.

O método alternativo se dá pela cromatografia iônica por detecção condutométrica baseada na condutância elétrica, uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução. A supressão após a passagem pela coluna melhora a alta condutância do eluente.

Os componentes do cromatógrafo consistem em sistema de bombeamento, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados (registrador) conforme apresentado na figura 5.

Figura 5 - Cromatógrafo iônico do fabricante Thermo Scientific



Fonte: (Do autor, 2017).

O mecanismo que rege o processo de separação é o da interação eletrostática entre os íons presentes na amostra e os contra-íons da fase estacionária, com grupos de carga. Os grupos derivados do ácido sulfônico e do ácido carboxílico são utilizados para a troca de cátions, enquanto os sais de amônio quaternário e aminas são utilizados como trocadores de ânions (THERMO SCIENTIFIC, 2013).

A avaliação dos resultados cromatográficos baseia-se nos critérios estabelecidos pelos principais compêndios oficiais e compreendem os parâmetros de eficiência de separação.

A avaliação completa e segura de uma metodologia é realizada pelo processo de validação. A Farmacopeia Americana conceitua validação de um procedimento analítico como processo pelo qual se estabelece as características de desempenho para satisfazer os requisitos necessários para sua aplicabilidade (VALIDATION, 2009).

1.7 Otimização da separação cromatográfica

A separação cromatográfica é otimizada pela variação das condições experimentais para que se possa obter a eficiência de separação sob condições

analíticas de menor consumo de fase móvel e redução do tempo de análise (MARKMAN, 2007; TEIXEIRA, 2008; HELENO, 2010; FUST, 2011; VALE, 2012). A determinação das condições analíticas ideais de reprodução possibilita a redução de tempo da análise, dos custos envolvidos e a obtenção de resultados confiáveis pela diminuição de sua variabilidade durante a etapa de validação analítica e na implementação do método na rotina (MARKMAN, 2007; TEIXEIRA, 2008; HELENO, 2010).

O processo de otimização pode ser realizado por diferentes técnicas de planejamento experimental, no qual, envolve diversas análises estatísticas. A avaliação do efeito de cada variável, isoladamente, é representada numa dessas técnicas sendo realizada por testes consecutivos para determinar a influência da variável no processo buscando a eficiência da separação analítica (MILLER, 2005; FUST, 2011; VALE, 2012).

Os fatores fundamentais que determinam a eficiência da separação estão relacionados diretamente com as características da fase móvel e da fase estacionária. A verificação dos sistemas cromatográficos consiste em um conjunto de testes aplicados, denominados de adequação do sistema. A adequação é avaliada por vários parâmetros como fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de assimetria, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas da amostra e do padrão. Os valores aceitáveis para cada um dos parâmetros são preconizados pelos principais compêndios oficiais de análise cromatográfica (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005; FUST, 2011; VALE, 2012; USP, 2016).

1.7.1 Fatores que afetam o resultado de adequação do sistema

A resolução do sistema pode ser alterada por vários fatores que afetam a seletividade (α), a retenção (K) e a eficiência (N) e, conseqüentemente, alteram a resolução do sistema.

A seletividade (α) além de ser controlada pelas características químicas da fase móvel, é também afetada pelo pH da fase móvel e pela característica química da fase estacionária. O fator de retenção (K) além de ser afetado pela polaridade da fase móvel, também é afetado pela polaridade da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária

(densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna (RIBANI, 2004; MARKMAN, 2007; HELENO, 2010; FUST, 2011; VALE, 2012).

A eficiência da coluna representada pelo número de pratos teóricos (N) é determinada pelo tamanho médio das partículas da fase estacionária e pela forma destas partículas (esférica ou irregular), a uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade e fluxo da fase móvel, volume de injeção, carga (massa) de amostra injetada, tempo de retenção do sinal, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extra coluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc.) (RIBANI, 2004; FUST, 2011; VALE, 2012).

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados para garantir a adequação do sistema de acordo com a International Conference on Harmonisation (ICH) e a United States Pharmacopeia (USP) são apresentados na Tabela 2 (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005; USP, 2016).

Tabela 2 - Parâmetros de adequação do sistema.

Parâmetros de adequação	Critério de aceitabilidade
Fator de retenção (K)	$1 < K < 10$
Nº. de pratos teóricos (N)	Em geral $N > 2000$
Resolução (Rs)	$R > 2$
Fator de assimetria (Tf)	$Tf < 2$
Repetitividade (DPR)	$DPR < 2\%$

Fonte: (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2005; USP, 2016).

1.8 Validação analítica

De forma a garantir que um método analítico forneça informações confiáveis e reprodutíveis, além da adequação do sistema cromatográfico e da otimização do método, este deve ser submetido a uma avaliação denominada validação analítica que após documentada, deve disponibilizar evidências claras e objetivas de que o método e os sistemas são adequados para o uso desejado. Portanto, a validação analítica é definida legalmente como o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados verdadeiros (RIBANI, 2004; FUST, 2011; VALE, 2012).

Segundo Vale (2010), a validação analítica surgiu nos anos 80 representando desde então uma grande cooperação entre diversas organizações internacionais, com o propósito da harmonização de protocolos de forma a contemplar informações, características e desempenho de métodos de análise.

As organizações responsáveis para que o método atenda ao seu propósito às normas estabelecidas, temos as agências reguladoras e órgãos de fiscalização nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Organização Mundial de Saúde (OMS), International Standardization on Organization (ISO), International Conference on Harmonisation (ICH), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e Food and Agriculture Organization (FAO) (; FUST, 2011; VALE, 2012).

A validação analítica no Brasil denotou sua devida relevância a partir da Resolução nº 391 de 1999 publicada pela Anvisa que regulamentava os critérios para registro de medicamentos qualificando a validação analítica como pré-requisito (LOWEN, 2003).

A legislação vigente no Brasil para validação analítica é a resolução RDC nº 166 de 2017 da Anvisa, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, funcionando como guia para procedimento de validação de métodos analíticos. Esta substituiu a RE nº 899 de 29/05/2003 da Anvisa. Uma nova publicação já era requerida pela comunidade científica, pois a revogada estava bastante desatualizada e não apresentava nada em termos de informações e orientações técnicas. Portanto, diante desta necessidade, a Anvisa disponibilizou a RE nº 899/03 em consulta pública e publicou, recentemente, em julho de 2017 a RDC nº 166/17 com novas diretrizes de forma a conduzir as validações analíticas. Existindo ainda, o documento de orientação do INMETRO DOQCGCRE-008 de agosto de 2016, elaborado pelo Inmetro e apresentado sob constantes atualizações (BRASIL, 2003; MARKMAN, 2007; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; BRASIL, 2017b).

Os métodos analíticos são identificados como normalizados e não normalizados. Os métodos não normalizados são os métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, ou adaptados a partir de métodos normalizados e requerem a validação analítica (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; FUST, 2011; VALE, 2012).

Os métodos normalizados apresentam-se descritos em compêndios devidamente reconhecidos ou recomendados em formulários oficiais e são considerados métodos validados (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; FUST, 2011; VALE, 2012; BRASIL, 2017b).

No entanto, a adequação de métodos normalizados e sua aplicação sob condições reais de uso devem ser avaliadas e testadas para verificar se as características de desempenho estabelecidas podem ser obtidas e, sendo que em determinada situação, necessária a revalidação do método (MARKMAN, 2007; TEIXEIRA, 2008; VALE, 2012; FUST, 2011).

As orientações sobre a revalidação estabelecem que alterações na síntese da substância ativa, na composição do produto acabado e no procedimento analítico, neste caso extrapolando os limites permitidos, requerem nova validação (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; FUST, 2011; VALE, 2012; USP, 2016; BRASIL, 2017b).

A validação pode ser apresentada como intralaboratorial e interlaboratorial. A validação intralaboratorial está relacionada com estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método para analisar a mesma amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo determinado e a validação interlaboratorial envolve estudos em outros laboratórios estabelecendo a reprodutibilidade (FUST, 2011; VALE, 2012).

Segundo Vale (2012), a validação deve compreender quatro etapas: planejamento das análises, a realização das análises, a interpretação dos resultados e a documentação dos dados obtidos. A etapa de planejamento é importante para que todos os materiais e equipamentos sejam calibrados (RIBANI, 2004; MARKMAN, 2007; FUST, 2011; VALE, 2012).

A realização das análises e a interpretação dos resultados obedecem aos parâmetros recomendados de acordo com o tipo de ensaio analítico envolvido e, embora os parâmetros sejam os mesmos, existem variações de indicações segundo a abordagem da Anvisa e do Inmetro (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; BRASIL, 2017b).

Conforme determinado pela Anvisa na RE nº 899 de 2003, na Resolução RDC nº 166 de 2017 e, também pela Farmacopeia Americana na monografia USP (2016), os ensaios são classificados nas categorias descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Categorias dos ensaios analíticos de acordo com sua finalidade segundo a Anvisa e a Farmacopeia Americana.

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

Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2003; USP, 2016; BRASIL, 2017b).

Baseado na tabela acima, a Anvisa recomenda os parâmetros da validação analítica conforme a classificação descrita na tabela 4, onde S corresponde à indicação do parâmetro e N ausência desta indicação. O Inmetro (2016), assim como a Anvisa recomenda parâmetros de validação de acordo com o tipo de ensaio analítico envolvido, classificando-os conforme descrito na tabela 5, onde S corresponde à indicação do parâmetro e N ausência desta indicação (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2003; BRASIL 2017b).

Para cada categoria de elaboração de métodos analíticos desenvolvidos, um conjunto de ensaios é exigido. Nas tabelas 4 e 5 são mostradas as exigências feitas pela Anvisa e pelo Inmetro, respectivamente. Apesar das diferenças de nomenclatura, os parâmetros são muito semelhantes, com a exceção de ensaios limites que não são preconizados no documento do Inmetro (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b).

Tabela 4 - Parâmetros de validação analítica recomendados pela Anvisa

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

A – Ensaio quantitativo B – Ensaio limite

* dependendo da natureza do ensaio específico pode ser necessário

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

Fonte: (Adaptado de BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b)

Tabela 5 - Parâmetros de validação analítica recomendados pelo Inmetro.

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

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

Fonte: (Adaptado de Inmetro, 2010)

A necessidade da harmonização entre os documentos da Anvisa e Inmetro é notório pela diferença de abordagens realizadas em seus guias orientativos (Inmetro). A tabela 6 apresenta uma comparação da identificação dos parâmetros de validação recomendados por ambos.

Tabela 6 - Comparação dos parâmetros de validação recomendados pela Anvisa e Inmetro para os ensaios analíticos.

ANVISA RDC nº 166/2017	INMETRO DOQ-CGCRE-008/2016
Seletividade	Seletividade
Linearidade	Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Precisão (Repetibilidade / Precisão Intermediária)	Precisão (Repetibilidade / Precisão Intermediária)
Exatidão	Tendência / Recuperação
Robustez	Robustez*

*parâmetro opcional

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

Os compêndios se diferenciam na classificação de categorias dos ensaios analíticos, na recomendação dos parâmetros de validação a serem avaliados e em algumas metodologias.

A rastreabilidade é garantida na finalização do processo de documentação dos dados obtidos - protocolo de validação. Este deve compreender todas as etapas envolvidas descrevendo minuciosamente a avaliação dos parâmetros de desempenho e contribuindo para a elaboração de um procedimento operacional possibilitando a implementação do método (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

A seguir serão apresentados os principais parâmetros avaliados nos métodos analíticos para a determinação dos constituintes de interesse.

1.8.1 Parâmetros de validação analítica

Segundo a Anvisa e o Inmetro, os principais parâmetros de análise avaliados no processo de validação são: especificidade ou seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

1.8.1.1 *Seletividade e/ou Especificidade*

A seletividade (pureza do sinal) e a especificidade (resolução) consistem na capacidade do método em determinar um componente na presença de outras espécies como outra substância ativa, excipiente, impureza, produto de degradação ou substância com propriedades semelhantes (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b). Apesar da seletividade e a especificidade estarem associadas com a detecção, podem ser diferenciadas conceitualmente: o método que produz resposta para uma única substância é denominado de específico e o método que produz resposta para várias substâncias com propriedades semelhantes, porém permite distinguir a resposta de um analito é denominado de seletivo (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

Este consiste no primeiro passo do desenvolvimento da validação analítica e apenas após realizado e avaliado seu resultado, os demais parâmetros poderão ser verificados (RIBANI, 2004).

Segundo recomendação da Anvisa (2017b), as comparações realizadas na matriz devem considerar amostras sob condições de estresse, como por exemplo calor, luz e umidade, na tentativa de promover a degradação do analito de interesse e a formação de interferentes (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b).

Além das avaliações de seletividade e/ou especificidade apresentadas, o método de adição padrão também pode ser aplicado em situações de impossibilidade de obtenção da matriz isenta do analito de interesse. Esta avaliação, denominada de efeito matriz, apresenta-se relacionada com a atuação de reagentes, matriz da amostra ou outros interferentes.

1.8.1.2 *Linearidade e faixa de trabalho ou intervalo da curva de calibração*

Segundo a Anvisa e o Inmetro, a linearidade consiste em um dos parâmetros de validação. Esta corresponde à capacidade do método em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na faixa analítica especificada (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

A linearidade apresenta sua avaliação expressa graficamente através da construção de uma curva analítica que relaciona os resultados com os níveis de

concentração dos analitos. Conforme especificado pela Anvisa (2017b) e pelo Inmetro (2016), esta curva deve ser construída para no mínimo 5 (cinco) níveis de concentração (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

Pode ser obtido pelo gráfico dos ensaios (relação entre a leitura e a concentração), ou seja, em função da concentração do analito ou calculado a partir da regressão. Este último utilizado em maior frequência permite obter coeficiente de correlação (r) que indica se a equação da reta pode ser considerada um modelo matemático e os coeficientes angular (b) e linear (a) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

A Anvisa e o Inmetro recomendam a avaliação da linearidade através da determinação do coeficiente de correlação (r) da curva analítica. Ribani (2004) em seu estudo indica este coeficiente como parâmetro de estimativa de qualidade referindo-se que quanto mais próximo de 1 for este valor, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. São observadas diferentes orientações sobre o coeficiente de correlação e, segundo a Anvisa, deve ser superior a 0,99 e ao Inmetro, superior a 0,90 (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; TEIXEIRA, 2008; BRASIL, 2016; BRASIL, 2017b). Entretanto, segundo MARKMAN (2007), esta estatística não se apresenta adequada, indicando apenas um grau de ajuste dos dados à curva podendo corresponder apenas a pontos bem ajustados a um modelo não linear.

A planilha de avaliação da linearidade de curva analítica denominada “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), consiste em uma planilha para identificação e tratamento de valores outliers e verificação da adequação ao modelo linear, uma ferramenta estatística de avaliação da linearidade pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Esta avaliação verifica inicialmente a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, a normalidade e a autocorrelação de resíduos, indicando a regressão e o desvio de linearidade e fornecendo também o limite de detecção e o limite de quantificação (BRASIL, 2003; SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; BAZILIO, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

O método proposto por Bazilio e colaboradores (2012) para avaliação da linearidade consiste em uma série de testes que avaliam a resposta da metodologia (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; BAZILIO, 2012).

Esta avaliação é iniciada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e permite obter, além da regressão linear, as seguintes informações: verificação da homocedasticidade; significância da regressão e o desvio de linearidade; verificação da normalidade dos resíduos; autocorrelação dos resíduos; normalidade dos resíduos; limite de detecção e o limite de quantificação.

Embora uma avaliação preliminar da metodologia pelo parâmetro de linearidade indique suas características de desempenho, estudos posteriores nos demais parâmetros de validação devem ser realizados para uma completa avaliação da eficiência da metodologia.

1.8.1.3 *Limite de Detecção e Limite de Quantificação*

O limite de detecção representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado qualitativamente, porém não necessariamente quantificado, apenas sob as condições experimentais do método (BRASIL, 2003). Esta determinação é importante para métodos destinados à análise de traços (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

O limite de quantificação consiste na menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado quantitativamente com precisão e exatidão sob as condições experimentais do método (BRASIL, 2003; BRASIL; 2017b).

1.8.1.4 *Precisão*

É realizada através da avaliação da dispersão dos resultados obtidos em ensaios mutuamente independentes de uma mesma amostra, sendo estas amostras semelhantes ou padrões sob condições específicas do método e é geralmente expressa em termos de desvio padrão. A precisão pode ser estimada em três níveis: repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária e reprodutibilidade e é normalmente expressa em termos de desvio padrão (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b).

O termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio, e seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo, ou DPR, para análises de amostras contendo a mesma quantidade das espécies de interesse. O DPR é ainda conhecido como coeficiente de variação (CV), ou ainda pela sigla RSD proveniente do inglês “relative standard deviation” (RIBANI, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

A repetibilidade consiste na medida da dispersão dos resultados obtidos dentro de um curto período de tempo pelo mesmo analista e nas mesmas condições analíticas (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016). Há divergências na nomenclatura dos compêndios oficiais, o Inmetro adota o termo repetitividade e a Anvisa o termo repetibilidade (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b). Neste estudo adotaremos a denominação de repetibilidade.

A avaliação pode seguir as recomendações do Inmetro (2016) sendo realizada através de sete ou mais repetições ou pela Anvisa (2017b) que sugerem a determinação pelo número mínimo de nove determinações com no mínimo três concentrações, em triplicata, cobrindo a faixa especificada ou o mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

A precisão intermediária consiste no grau de concordância entre os resultados de um mesmo laboratório em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Segundo alguns autores, esta etapa verifica se o mesmo laboratório oferece estatisticamente os mesmos resultados quando realizado sob as mesmas condições analíticas (RIBANI, 2004; TEIXEIRA, 2008). A sua determinação pode variar de acordo com os métodos adotados, no entanto, a Anvisa considera o mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes e o Inmetro considera a norma ISO 5725-3 que estabelece o mínimo de 15 determinações (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010; BRASIL, 2017b).

A reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial consiste no grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. O Inmetro (2016) recomenda sete ou mais repetições e a

Anvisa não especifica o número de experimentos e réplicas envolvidos. Esta etapa consiste numa ferramenta importante para controle do desempenho de um laboratório e caracteriza o processo de validação completo, necessário para padronização de procedimentos analíticos (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

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

O critério de aceitabilidade da precisão recomendado pela Anvisa considera o método empregado, a concentração do analito, o tipo de matriz e a finalidade do método admitindo valor inferior a 5% para o desvio padrão relativo. O Inmetro recomenda a avaliação através dos valores de HORRAT pela equação de HORWITZ já estabelecida no seu guia e relacionada diretamente com a razão de concentração do analito (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

1.8.1.5 *Exatidão, Tendência ou Recuperação*

É representada pelo grau de concordância entre os resultados obtidos, individualmente, no método e o valor de referência considerado verdadeiro, ou seja, aceito como o real (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b). Sua determinação é de suma importância para a rastreabilidade dos resultados e apresenta-se dentro de um dado nível de confiança que pode ser estreito para concentrações elevadas e/ou amplo para análise de traços (RIBANI, 2004; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

Para avaliar a exatidão, os processos que podem ser utilizados são estabelecidos por diferentes métodos, dentre os quais podemos citar: o uso de materiais de referência certificados, a comparação de métodos e a utilização dos ensaios de recuperação ou o método de adição padrão (BRASIL, 2003; RIBANI, 2004; TEIXEIRA, 2008; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

O método mais utilizado para validação de processos analíticos para o ensaio de recuperação está relacionado com a determinação da quantidade de analito recuperado em relação à quantidade real presente na amostra. Conforme o Inmetro

(2016), o método é expresso pela "fortificação" da amostra, isto é, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito colocado.

A Anvisa recomenda o quantitativo mínimo de 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear com 3 (três) concentrações: baixa, média e alta com injeções em triplicata. A exatidão é expressa em termos percentuais pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, sendo determinada após o estabelecimento da linearidade (BRASIL, 2003; MARKMAN, 2007; HELENO, 2010; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

A exatidão deva ser estabelecida ao longo de toda a faixa de calibração especificada para o procedimento analítico somente após a precisão e a linearidade terem sido estimadas.

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

$$\text{Rec \%} = \frac{\text{C1} - \text{C2}}{\text{C3}} \times 100$$

Equação 1 - Cálculo da recuperação

Onde:

Rec %: Recuperação em percentual

C1 = concentração de analito na amostra adicionada de padrão

C2 = concentração de analito na amostra não adicionada de padrão

C3 = concentração de analito na solução padrão

Os critérios estabelecidos baseados no estudo desenvolvido por Horwitz (1995), indicam o intervalo de recuperação aceitável relacionando com os níveis de concentração dos analitos conforme descrito na tabela 7 (HORTMITZ, 1995; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

Tabela 7 - Intervalo de recuperação do analito em função de sua concentração na amostra.

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

Fonte: (Adaptado de HORTMITZ, 1995; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2010).

1.8.1.6 Robustez

A robustez avalia a sensibilidade do método em resistir a variações nos parâmetros analíticos (RIBANI, 2004; BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b). Esta figura de mérito permite avaliar e estabelecer, ordenadamente, a influência de cada uma das variações nos resultados finais, e assim, designar o grau desta influência (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

A robustez de um método, conforme recomendado pela Anvisa, as alterações relacionam-se com o tipo de técnica empregada e nas determinações por cromatografia em fase líquida são indicadas as alterações na variação do pH da fase móvel, da composição da fase móvel, do fluxo de fase móvel, da temperatura e diferentes lotes ou fabricantes de colunas para que sejam estabelecidos os controles e precauções no desempenho do método (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017b).

Para avaliar a robustez de um método, o Inmetro (2016) recomenda a determinação através do teste de Youden, sendo o método mais utilizado para esta avaliação. É um teste que permite avaliar a robustez do método através da realização de oito ensaios independentes para determinar o efeito de sete variações ou combinação fatorial dos efeitos admitindo dois níveis em ordem aleatória, verificando qual o efeito ou combinação de efeitos que apresentam variações.

A matriz da combinação dos fatores para determinação de robustez utiliza letra maiúscula para os fatores nominais do método e a letra minúscula para a

variação a ser avaliada. Os efeitos resultantes das combinações ensaiadas são avaliados, isoladamente, e, posteriormente, são obtidas as médias correspondentes aos grupos das letras maiúsculas e letras minúsculas de cada fator.

Segundo Ribani (2004), as alterações refletem as possibilidades reais de situações de transferência do método para outros laboratórios, analistas ou equipamentos. Porém, existem limitações inerente aos parâmetros requeridos para que as alterações não caracterizem a necessidade de novo processo de validação. Visto que, conforme recomendação da Farmacopeia Americana (USP), múltiplos ajustes podem afetar o desempenho do sistema configurando novas implementações.

Os resultados encontrados devem indicar um controle mais rígido dos fatores de maior influência, e a indicação de diferença não significativa sugere que a média e o desvio padrão dos fatores correspondem à estimativa realista da precisão do método (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2007; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

1.9 Justificativa

A qualidade e a segurança indispensáveis aos produtos devem ser avaliadas pelo cumprimento de quesitos de conformidade, eficácia, efetividade e desempenho no momento da fabricação e da utilização. A legislação brasileira específica que os produtos para a saúde, quando utilizados nas condições e finalidades previstas não devem comprometer a saúde dos pacientes e dos operadores do produto (ANVISA, 2010).

As bolsas de sangue são materiais adquiridos pelo MS, sendo considerados insumos estratégicos para o SUS. O regulamento técnico para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de bolsas de sangue estabelece que a comprovação da eficácia e da segurança de bolsas de sangue seja realizada pelo INCQS (ANVISA, 2010).

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

Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias analíticas no INCQS possibilita realizar a parte experimental, proporcionando que o conhecimento científico seja, futuramente, reproduzido e adaptado contribuindo para o monitoramento e para o controle da qualidade destes produtos, para ser executado na rede de laboratórios do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB). Fato que evidencia a importância do aperfeiçoamento como ferramenta de garantia da qualidade do produto em relação ao risco de danos para o usuário.

A RDC nº 35/2014 propõe novas metodologias e também mantém citação das farmacopeias. O que dentre as substâncias presentes nos diferentes tipos de soluções anticoagulantes estão o citrato e o fosfato responsáveis pela estabilização da membrana celular mantendo o controle do pH e no controle da anticoagulação.

O presente estudo propõe um novo método para determinação de citrato e fosfato, concomitante, utilizando parâmetros farmacopeicos de comparação, otimizando o método atual. Foi avaliada a cromatografia de íons como método alternativo para a determinação de ânions presentes na solução anticoagulante das bolsas de sangue, substituindo o método utilizado atualmente, no qual emprega-se a técnica de CLAE com detector UV para a determinação do citrato total e espectrofotometria na região do visível para a determinação do fosfato diácido de sódio monohidratado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a otimização e validação do método proposto, buscando melhores resultados, em termos de reprodutibilidade e tempo de análise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar e validar o método analítico para determinação simultânea do teor de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção iônica.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar avaliação retrospectiva dos resultados obtidos das amostras CPD e CPDA submetidas ao INCQS no período de 2012 a 2016;
- Comparar as condições analíticas do método atual com o método alternativo das técnicas cromatográficas com os diferentes tipos de detecção estabelecendo os aspectos vantajosos da implementação do método alternativo para a determinação simultânea de citrato e fosfato;
- Avaliar o comportamento dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico e a otimização da metodologia analítica no desempenho do método;
- Validar o método de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Anvisa e pelo Inmetro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada para realização deste estudo foi dividida em quatro etapas. Na primeira etapa foram selecionadas as amostras de trabalho, na segunda etapa foi realizada a comparação dos métodos analíticos, na terceira etapa foi realizado o planejamento da validação analítica compreendendo a adequação do sistema e a otimização da metodologia analítica e na quarta etapa efetuada a validação analítica.

3.1 Material, equipamentos e acessórios

No desenvolvimento do estudo foram utilizados equipamentos qualificados e materiais calibrados para o preparo das soluções-padrão e soluções-amostra.

Os materiais utilizados foram pipetas volumétricas classe A de volumes variados (5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL e 50 mL), balões volumétricos classe A de 100 mL, 200 mL, 500 mL e 1000 mL e as micropipetas de volume variável do fabricante Eppendorf de capacidade de 100 µL a 1000 µL, 500 µL a 5000 µL e 1000 µL a 10000 µL, todos os materiais utilizados foram devidamente calibrados.

O equipamento de CLAE utilizado foi o cromatógrafo iônico Dionex[®] do fabricante Thermo Fisher Scientific com software Chromeleon 6, apresentando os módulos (bomba injetora, injetor automático, degaseificador, interface e o detector condutométrico modelo ED50 Eletrochemical Detector. A coluna cromatográfica do fabricante Thermo Fisher Scientific, modelo Dionex IonPac AS11 (4 x 250 mm) foi utilizada na etapa de validação analítica e na avaliação da robustez foi utilizada a coluna de lote 013-10-179A.

Para o preparo das soluções-padrão e soluções-amostra foi utilizada a estufa do fabricante Precision Scientific Group, modelo Precision Vacuun Over, a balança analítica calibrada do fabricante Mettler Toledo, modelo AX205, o sistema de purificação de água do fabricante Millipore[®], modelo Milli-Q[®] integral 10 e a bomba de vácuo do fabricante Dayton Electric MFG. Co., acoplada com ultrassom do fabricante Branson, modelo 8510.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapurificada, obtida pelo sistema de purificação Millipore[®]. As determinações analíticas foram efetuadas

no cromatógrafo e a separação dos analitos foi realizada utilizando a coluna cromatográfica Dionex Ionpac[®] AS11.

Os padrões analíticos utilizados foram o ácido cítrico anidro ($\geq 99,5\%$) e o fosfato diácido de sódio monohidratado (100,7 %) de lote e fabricante identificados na tabela 8. Sendo realizadas as devidas correções das purezas dos padrões.

Tabela 8 - Identificação dos padrões analíticos ácido cítrico anidro e fosfato diácido de sódio monohidratado.

Padrões	Lote	Fabricante
Ácido cítrico anidro	BCBJ4885V	Sigma Aldrich
Fosfato diácido de sódio monohidratado	J38C14	J. T. Baker

Fonte: (Do autor, 2017).

3.1.1 Preparo dos padrões analíticos

No preparo das soluções-padrão da curva analítica, o padrão de ácido cítrico anidro foi seco conforme recomendado pela Farmacopeia Americana à 105 °C por 4 horas (USP, 2016). A solução padrão foi preparada em balão volumétrico de 100 mL pela pesagem separadamente da massa de 25 mg de ácido cítrico anidro e 30 mg de fosfato diácido de sódio monohidratado diluída com água ultrapurificada, posteriormente, foi adicionado 5 mL de fase móvel para 100 mL. A solução padrão de citrato e fosfato foi realizada em triplicata e para a obtenção do cromatograma um tempo de corrida de 5 minutos.

Para a construção da curva analítica com cinco níveis de concentração para cada analito na avaliação da linearidade, o padrão do citrato e fosfato foi realizado pela pesagem de 25 mg de ácido cítrico anidro e de 30 mg de fosfato diácido de sódio monohidratado, seguida da transferência para balões volumétricos de 100 mL e homogeneização com água ultrapurificada. A partir da solução mãe preparou-se 5 níveis da curva padrão em balão volumétrico de 100 mL com adição de 5 mL da fase móvel em cada balão, para obter as concentrações entre 3,0 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Foram injetados 10 μL em triplicata de cada solução padrão e um tempo de corrida de 5 minutos.

3.1.2 Preparo da amostra

Para o preparo da amostra, pipetou-se 3 mL de amostra de solução anticoagulante CPD, adicionou-se 50 mL de fase móvel e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se com água ultrapurificada. A injeção foi realizada em triplicata e para a obtenção do cromatograma foi necessário um tempo médio de 5 minutos.

Na validação analítica, pipetou-se 1,5 mL de amostra de solução anticoagulante CPD, adicionou 25 mL de fase móvel, transferiu-se para balão volumétrico de 500 mL e completou-se com água ultrapurificada. A injeção foi realizada em triplicata e para a obtenção do cromatograma, um tempo médio de 5 minutos (USP, 2016).

3.1.3 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada com 1,05 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 50% da Merck e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL com água ultrapurificada para obter uma concentração de 20 mM, posteriormente, a fase móvel foi desgaseificada em banho de ultrassom. Utilizou-se fluxo de 2,0 mL/minuto, temperatura do forno de 25°C e volume de injeção de 10 µL.

3.2 Métodos

3.2.1 Condições cromatográficas

As condições operacionais adotadas foram as seguintes: coluna cromatográfica de troca iônica (4x250 mm); vazão da fase móvel: 2,0 mL/min; volume injetado de 10 µL. A temperatura de operação foi de, aproximadamente, 25 °C e para a obtenção dos cromatogramas foi necessário um tempo de corrida de 5 minutos. As condições cromatográficas estão descritas na tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas para verificação da adequação do sistema utilizando o cromatógrafo Dionex.

Condições cromatográficas	Especificação
Coluna cromatográfica	Coluna de troca iônica Dionex IonPac AS11 (4x250 mm) Fabricante: Thermo Scientific
Forno	Temperatura: 25°C
Fase móvel	NaOH 20 mM
Fluxo	2,0 mL/min
Volume de injeção	10 µL

Fonte: (USP, 39).

3.3 Avaliação retrospectiva e seleção das amostras submetidas ao INCQS

Para a seleção das amostras (etapa 1) a serem avaliadas neste estudo foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados das amostras submetidas ao INCQS no período de 2012 a 2016, utilizando o sistema Harpya (Sistema Web para Gerenciamento de Amostras Laboratoriais).

Para o estudo, utilizou-se amostra de bolsa de sangue submetida ao INCQS para análise prévia. Após avaliação das amostras obedecendo aos critérios: resultado satisfatório, integridade da embalagem, data de validade, disponibilidade no setor, condições de armazenamento e composição das soluções para avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, efeito matriz e robustez, foram selecionadas amostras para as quais existiam pelo menos 3 unidades de cada lote, em seguida, essas amostras foram identificadas e separadas aleatoriamente para análise.

Na primeira etapa, obteve-se um grupo de amostras de bolsas de sangue para relacionar a incidência das soluções anticoagulantes e/ou preservadoras. Os filtros utilizados foram: data (01/01/2012 a 31/12/2016), nome do produto (bolsa de sangue), detentor do registro, modalidade de análise (prévia, controle, orientação e fiscal) e tipo de bolsa com solução anticoagulante contendo citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado (CPD e CPDA).

As marcas foram codificadas para preservar a identidade dos detentores do registro do produto e os dados foram organizados e avaliados utilizando planilha do Microsoft® Excel® 2013.

3.4 Comparação dos métodos analíticos

Na comparação dos métodos analíticos (etapa 2) foi realizado o preparo dos padrões e da amostra para comparar os resultados com o sistema atual que realiza a análise, separadamente, do citrato e fosfato. Em comparação ao método atual para determinação de citrato (CLAE) e fosfato (espectrofotometria), utilizou-se o método de cromatografia iônica para determinação simultânea dos analitos.

Para a determinação dos analitos de interesse foi realizada a injeção em triplicata para ambos os métodos para 02 (duas) amostras diferentes (A e B) numa faixa de concentrações em que se deseja validar o método. Foram avaliadas as condições analíticas de cada sistema e realizado o tratamento estatístico para avaliação dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio.

Para a comparação dos procedimentos, foi verificado se os dois métodos cromatográficos apresentam diferenças significativas entre si, em relação às suas precisões. Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados conforme os valores médios obtidos para a determinação do desvio padrão relativo (DPR) da concentração, o teste de hipótese e o teste de variância (ANOVA) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

3.5 Planejamento da validação analítica

Na etapa de planejamento (etapa 3), foi verificada a adequação do sistema cromatográfico e a otimização da metodologia analítica.

Para este estudo, utilizou-se o padrão analítico secundário de ácido cítrico anidro da Sigma-Aldrich e o padrão fosfato diácido de sódio monohidratado da J. T. Baker. Os critérios para determinação dos parâmetros dos métodos analíticos foram realizados de acordo com a RE nº 899/2003 e a RDC nº 166/2017 da Anvisa, e o documento de orientação do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2016 (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

3.5.1 Adequação do sistema cromatográfico

A adequação do sistema cromatográfico foi avaliada preparando-se uma solução padrão de citrato e fosfato. A solução padrão de citrato e fosfato foi injetada seis vezes nas condições cromatográficas descritas na Tabela 9 no item 3.2.1. Cabe ressaltar que, nesta etapa, utilizou-se a coluna cromatográfica Dionex Ionpac AS11[®] do lote 013-10-179A do fabricante Thermo Scientific.

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

3.5.2 Otimização da metodologia analítica

Este estudo teve o intuito de otimização das condições experimentais e a determinação dos parâmetros preliminares de validação do método de cromatografia iônica.

3.5.2.1 *Avaliação da diluição da amostra e padrões*

A diluição das amostras e padrões foi avaliada por intermédio da comparação do resultado pela diluição com água ultrapurificada e com a diluição pela adição de 5% da fase móvel em meio aquoso.

Foi preparado o nível intermediário da curva analítica dos analitos de interesse e da amostra, conforme descrito no item 3.1.1, sendo injetado três vezes para determinação da média e DPR da área, do tempo de retenção e dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico (fator de assimetria e número de pratos teóricos) nas condições cromatográficas descritas na tabela 9 no item 3.2.1.

3.5.2.2 *Avaliação do fluxo da fase móvel*

A avaliação do fluxo da fase móvel foi realizada através de 6 injeções dos padrões de concentração (A) baixo, padrão (C) intermediário e padrão (E) alto das

curvas analíticas de citrato e fosfato sob as condições cromatográficas relacionadas na tabela 9 variando o fluxo em (1,9; 2,0 e 2,1) mL/minuto.

Os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados conforme os valores médios obtidos para determinação do DPR da área, do tempo de retenção, fator de assimetria e número de pratos teóricos.

3.6 Validação analítica

A validação analítica (etapa 4) foi realizada com base nos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez seguindo o protocolo proposto pela Anvisa e do Inmetro (BRASIL, 2003; SANTOS, 2014; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

Assim, a validação do método deve garantir, através dos dados experimentais, que este atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados analíticos (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

3.6.1 Avaliação da seletividade

Na avaliação do parâmetro de validação da seletividade foram simuladas soluções anticoagulantes e/ou preservadoras contendo os analitos na concentração comercial estabelecida pela legislação e as mesmas soluções na ausência dos analitos. Para avaliação da seletividade foram selecionadas amostras comerciais contendo as soluções CPD, CPDA e ACD-A. A solução anticoagulante ACD-B não foi incluída, pois, foi verificada a ausência da análise de amostras contendo esta solução anticoagulante no período de estudo.

Na avaliação dos demais parâmetros (linearidade, precisão, exatidão e robustez) foi utilizada a amostra comercial de solução de CPD de acordo com a seleção demonstrada no item 3.3.

A seletividade da técnica foi comprovada através da comparação entre matrizes isentas do analito, matrizes contendo o analito e matrizes comerciais de soluções anticoagulantes. As soluções foram preparadas no laboratório, para

diferentes tipos de soluções anticoagulantes (ACD, CPD e CPDA). Em algumas destas soluções foi realizada a comparação sem e com o processo de autoclavação, simulando o processo fabril do produto, e todas as soluções e as amostras comerciais foram analisadas quanto à presença de interferentes e/ ou produtos de degradação.

3.6.2 Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, contendo cinco níveis de concentração de ácido cítrico anidro e fosfato diácido de sódio monohidratado, com injeções em triplicata para a determinação do teor de citrato e fosfato utilizando a técnica de cromatografia iônica.

A avaliação dos resultados foi feita utilizando a “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012), que permitiu determinar o limite de quantificação e o limite de detecção através da avaliação dos resíduos e a relação entre o DPR da curva analítica e sua inclinação (coeficientes angular e linear).

A determinação da concentração para cada analito na amostra está relacionada com a área do sinal correspondente. Para tal determinação, é necessária, a obtenção de um cromatograma para cada uma das soluções padrões, construindo, uma curva padrão para cada um dos analitos de interesse. A partir da equação da reta da curva analítica fez-se uma relação direta com a área do sinal da amostra de concentração desconhecida, obtendo a concentração específica de cada analito.

3.6.3 Avaliação da precisão

A precisão foi estudada nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Na repetibilidade procedeu-se o doseamento, nas mesmas condições analíticas, de vinte replicatas da solução amostra anticoagulante CPD. Os sinais cromatográficos obtidos permitiram determinar o DPR.

Na precisão intermediária, foi realizada sob as mesmas condições cromatográficas da repetibilidade, alterou-se três analistas, em três dias diferentes. Os dados cromatográficos foram avaliados pelo DPR (BRASIL, 2003; INSTITUTO

NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; USP, 2016; BRASIL, 2017b).

3.6.4 Avaliação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo mecanismo de determinação da recuperação, foram realizadas injeções das soluções de trabalho na elaboração da curva de adição padrão de citrato e fosfato. A injeção foi realizada em triplicata com quatro níveis de concentração preparada pela adição padrão da amostra comercial da solução anticoagulante CPD pelo preparo da curva-matriz. Foram avaliados os sinais cromatográficos de cada analito, quanto à recuperação em cada nível de concentração (BRASIL, 2003; FUST, 2011; VALE, 2012; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; USP, 2016; BRASIL, 2017b).

A determinação dos valores da recuperação, expressos em porcentagem, foi calculada através da razão entre as concentrações médias determinadas, experimentalmente, e as concentrações teóricas correspondentes (FUST, 2011; MARQUES et al, 2012; VALE, 2012).

3.6.5 Avaliação da robustez

Para avaliar a robustez do método foi preparado o nível intermediário da curva analítica e da amostra dos analitos, conforme descrito no item 3.1.1, sendo injetado o padrão três vezes para determinação da média e desvio padrão relativo da área, do tempo de retenção e dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico na avaliação do efeito de quatro variações pela adaptação do teste de Youden, de acordo com o Inmetro (2016) para as combinações estabelecidas. Foram admitidas duas variações de nível, separadamente para os parâmetros de volume de injeção, concentração da fase móvel, fluxo da fase móvel e lote diferente da coluna cromatográfica (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

Nesta avaliação, as condições cromatográficas foram denominadas pelos fatores nominais, sendo as condições normais por letras maiúsculas, de A - D e a variação, por letras minúsculas de a - d conforme descrito na tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros de avaliação da robustez na validação do método de determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado.

Parâmetro	Condição normal	F*	Nível I	Nível II	F*
Coluna cromatográfica	Dionex IonPac AS11 lote: 013-10-179A	A	Dionex IonPac AS11 lote: 013-10-179A	Dionex Ion Pac AS11 lote: 012-26-129	a
Volume de injeção	10 µL	B	8 µL	12 µL	b
Concentração da fase móvel	20 mM	C	19 mM	21 mM	c
Fluxo da fase móvel	2,0 mL/min	D	1,9 mL/min	2,1 mL/min	d

* Fator

Fonte: (Do autor, 2017).

A tabela 11 descreve as combinações de variações utilizadas para determinar os efeitos da variação dos quatro fatores no procedimento analítico sendo avaliados os efeitos de cada variação separadamente.

Tabela 11 - Combinações de variações segundo a adaptação do teste de Youden para avaliação da robustez.

Fator	Combinação de variações							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	B	b
C ou c	C	C	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
Efeito	s*	t*	u*	v*	w*	x*	y*	z*

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

Fonte: (ADAPTADO DE VALE, 2012).

A avaliação foi realizada isoladamente para cada fator pela verificação de sua influência baseando-se nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, expresso em termos de percentuais, de acordo com o cálculo do efeito realizado pela sequência das equações 2, 3 e 4.

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

Equação 2 - Determinação do efeito normal

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

Equação 3 - Determinação do efeito da variação

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

Equação 4 - Determinação do efeito

Sendo:

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

M normal – Média dos resultados das amostras sob as condições normais

M variação – Média dos resultados das amostras sob as condições variadas

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação retrospectiva e seleção das amostras submetidas ao INCQS

Na avaliação dos dados disponíveis no Harpya de análises das amostras submetidas ao INCQS foi possível verificar a incidência de amostras de bolsa de sangue com as soluções anticoagulantes CPD e CPDA, por apresentarem os dois analitos de interesse no período de estudo.

Na avaliação das amostras, quanto ao tipo de solução, a partir da busca realizada no sistema Harpya do INCQS, foram observadas que as bolsas de sangue, contendo solução anticoagulante CPD possuíam um quantitativo superior com maior número de amostras analisadas no INCQS em comparação às bolsas de sangue CPDA

Sendo, a solução CPD escolhida por representar o tipo de maior prevalência de análises realizadas no período selecionado (2012 a 2016) das amostras com solução anticoagulante.

4.2 Comparação dos métodos analíticos

A comparação dos métodos analíticos consiste na avaliação dos resultados obtidos utilizando um método atual e tem como objetivo avaliar o grau de proximidade dos dois métodos, ou seja, estudar a precisão e exatidão do método alternativo relativamente ao atual (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

A tabela 12 apresenta os parâmetros de comparação dos métodos analíticos para a determinação do teor de citrato total.

Tabela 12 - Comparação dos métodos analíticos do citrato total.

Condição analítica	Método Atual CLAE / Ultravioleta	Método Alternativo Cromatografia Iônica
Detecção	Ultravioleta	Condutividade e sistema de supressão
Coluna cromatográfica	Troca catiônica	Troca aniônica
Temperatura do forno	40 °C	25 °C
Fase móvel	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄ conc 0,009 M)	Hidróxido de sódio (NaOH 20mM)
Fluxo	0,5 mL/min	2,0 mL/min
Tempo de corrida	20 minutos	5 minutos
Volume de injeção	20 µL	10 µL
Curva analítica / Amostra	Diluição em meio ácido	Diluição em meio alcalino

Fonte: (Do autor, 2017).

A tabela 13 apresenta os parâmetros de comparação dos métodos analíticos para a determinação do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado.

Tabela 13 - Comparação dos métodos analíticos do fosfato diácido de sódio monohidratado.

Condição analítica	Método Atual Espectrofotometria	Método Alternativo Cromatografia Iônica
Detecção	Ultravioleta/visível	Condutividade e sistema de supressão
Coluna cromatográfica	-	Troca aniônica
Temperatura do forno	-	25 °C
Fase móvel	-	Hidróxido de sódio (NaOH 20mM)
Fluxo	-	2,0 mL/min
Tempo de corrida	-	5 minutos
Volume de injeção	-	10 µL
Curva analítica / Amostra	Diluição em meio ácido	Diluição em meio alcalino

Fonte: (Do autor, 2017).

As vantagens do método alternativo para os métodos atuais é, principalmente, a determinação simultânea de citrato e fosfato, a separação analítica (eficiência de separação cromatográfica), o consumo de reagente (custo analítico) e a redução do

tempo de análise inferior a 10 minutos, como ocorre no método de determinação do teor de citrato (CLAE), em relação ao método atual na determinação do fosfato (espectrofotometria), maior sensibilidade a baixas concentrações.

Entre as desvantagens se tem os altos custos com o equipamento e reagentes químicos de pureza específica inerentes a qualquer método cromatográfico.

Portanto, avaliando as condições das técnicas, suas vantagens e desvantagens, e a viabilidade de implementação do método na rotina de análise para determinação de citrato e fosfato, comparando o sistema atual e o proposto, com relação aos parâmetros de análise, verificou-se uma redução do tempo de análise, redução do gasto de insumos e uma resposta mais seletiva para as duas substâncias, havendo, então, uma otimização do sistema (MARKMAN, 2007; HELENO, 2010).

As tabelas 14 e 15 apresentam os resultados das análises das amostras A e B. Para os dois métodos, a repetibilidade foi realizada em triplicata, cujo DPR se mostrou de acordo com os critérios estabelecidos. Utilizou-se um grau de confiança de 95% e, conseqüentemente, um nível de significância igual a 0,05 ($\alpha = 0,05$) nos testes descritos a seguir.

Considerando a triplicata das duas amostras ($n = 6$), a ANOVA fator duplo com repetição revelou que os resultados obtidos entre o método atual e alternativo não foi significativo para o citrato ($F_{\text{calculado}} = 14,4 < F_{\text{crítico}} = 39,0$ / $F_{\text{calculado}} = 11,3 < F_{\text{crítico}} = 39,0$) e para o fosfato ($F_{\text{calculado}} = 7,69 < F_{\text{crítico}} = 39,0$ / $F_{\text{calculado}} = 25,0 < F_{\text{crítico}} = 39,0$). Logo, $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ para triplicata das duas amostras, indicou que não há diferença significativa entre os dois métodos de análise.

O teste t pareado ($\alpha = 0,05$) indicou que não há diferença significativa entre as médias obtidas pelos dois métodos para as duas amostras para análise do teor de citrato e fosfato, respectivamente, na amostra A ($t_{\text{calculado}} = 1,58 < t_{\text{crítico}} = 4,30$ / $t_{\text{calculado}} = 1,98 < t_{\text{crítico}} = 4,30$) e amostra B ($t_{\text{calculado}} = 0,02 < t_{\text{crítico}} = 4,30$ / $t_{\text{calculado}} = -4 < t_{\text{crítico}} = 4,30$), como demonstrado a seguir nas tabelas 14 e 15.

Na tabela 14 estão descritos os resultados obtidos na comparação dos métodos analíticos atual e alternativo na determinação de citrato total.

Tabela 14 - Resultado comparativo da amostra de citrato total.

Replicata	Método Atual	Método Alternativo	Método Atual	Método Alternativo
	Amostra (A)	Amostra (A)	Amostra (B)	Amostra (B)
1	20,61 g/L	20,97 g/L	19,70 g/L	19,33 g/L
2	20,55 g/L	20,53 g/L	19,81 g/L	19,97 g/L
3	20,67 g/L	20,85 g/L	19,61 g/L	19,83 g/L
Média	20,61	20,78	19,71	19,71
DP*	0,06	0,23	0,10	0,34
DPR**	0,29	1,09	0,51	1,71
Variância	0,00360	0,05173	0,01003	0,11320
t calculado		1,58		0,02
t crítico		4,30		4,30
F calculado		14,4		11,3
F crítico		39,0		39,0

* DP = Desvio padrão

**DPR = Desvio padrão relativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Na tabela 15 estão descritos os resultados obtidos na comparação dos métodos analíticos atual e alternativo na determinação de fosfato diácido de sódio monohidratado.

Tabela 15 - Resultado comparativo da amostra de fosfato diácido de sódio monohidratado.

Replicata	Método Atual	Método Alternativo	Método Atual	Método Alternativo
	Amostra (A)	Amostra (A)	Amostra (B)	Amostra (B)
1	2,19 g/L	2,25 g/L	2,19 g/L	2,11 g/L
2	2,18 g/L	2,25 g/L	2,20 g/L	2,16 g/L
3	2,15 g/L	2,15 g/L	2,20 g/L	2,16 g/L
Média	2,17	2,22	2,20	2,14
DP*	0,02	0,06	0,01	0,03
DPR**	0,96	2,60	0,26	1,35
Variância	0,00043	0,00333	0,00003	0,00083
t calculado		1,98		- 4,00
t crítico		4,30		4,30
F calculado		7,69		25,0
F crítico		39,0		39,0

* DP = Desvio padrão

**DPR = Desvio padrão relativo

Fonte: (Do autor, 2017).

Sendo assim, foi possível comprovar, que ambos os analitos no método alternativo equivalem ao método atual. Verifica-se, então, que o método alternativo é reprodutível em termos das análises realizadas (MARKMAN, 2007; HELENO, 2010).

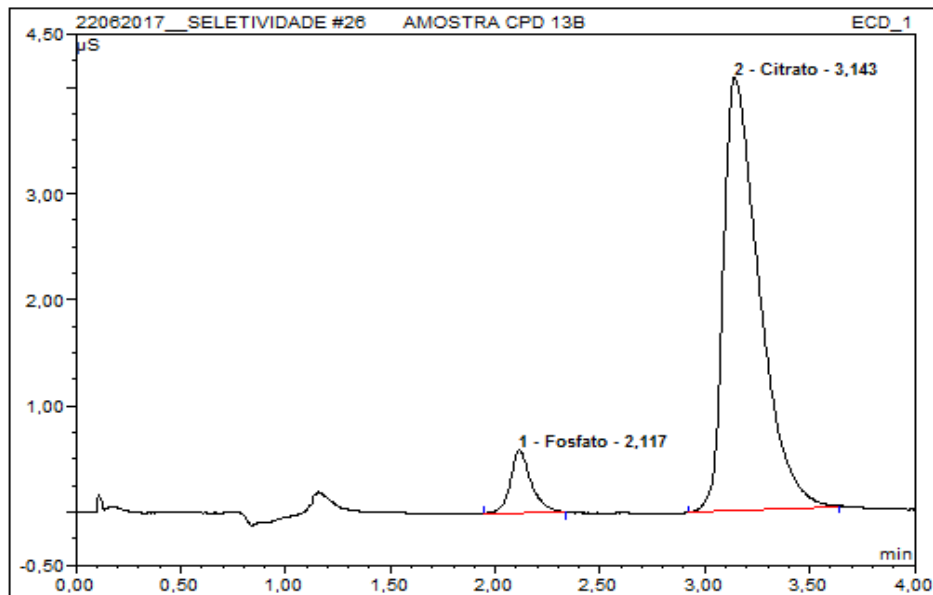
É importante ressaltar a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Na avaliação estatística dos resultados, o método alternativo se mostrou eficiente para os analitos em questão, apresentando resultados precisos e confiáveis.

4.3 Planejamento da validação analítica

4.3.1 Adequação do sistema cromatográfico

Inicialmente, verificou-se a satisfatoriedade na separação completa dos sinais cromatográficos dos analito pela ausência de sobreposições, conforme apresentado na figura 6. Muitos autores recomendam a realização da verificação da conformidade do sistema cromatográfico (system suitability) no desempenho do equipamento em reproduzir o método (RIBANI, 2004).

Figura 6 - Cromatograma referente ao padrão de citrato e fosfato na avaliação da adequação do sistema cromatográfico



Padrão analítico de concentração de ácido cítrico anidro e fosfato diácido de sódio monohidratado, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac[®] AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutométrica com temperatura do forno em 25 °C.

Fonte: (Do autor, 2017).

A avaliação dos sinais cromatográficos demonstrou que todos os parâmetros de adequação estavam dentro dos critérios de conformidade estabelecidos pelos compêndios oficiais (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016, USP, 2016; BRASIL, 2017b).

A resolução apresentou-se superior a 2, o fator de assimetria inferior a 2, fator de retenção no intervalo de 1-10, o número de pratos teóricos superior a 2000 e a repetitividade expressa em DPR inferior a 1,5 % (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016, USP, 2016; BRASIL, 2017b).

Cabe ressaltar que, a resolução indica o poder de separação do sistema para um par de analitos de interesse, sendo também definida como capacidade de separação de dois ou mais analitos (RIBANI, 2004; USP, 2016). Assim, considerando que, a avaliação foi realizada na solução padrão onde os analitos apresentaram-se solubilizados em água ultrapurificada, os sinais cromatográficos obtidos corresponderam apenas aos analitos de interesse não sendo possível determinar a resolução referente ao analito fosfato que elui primeiramente (menor tempo de retenção).

A tabela 16 descreve os valores dos parâmetros de adequação obtidos pelos sinais cromatográficos revelando reprodutibilidade e conformidade com os principais compêndios oficiais.

Tabela 16 - Resultados obtidos na adequação do sistema cromatográfico para a determinação de Citrato e fosfato utilizando coluna Ionpac AS11.

Parâmetros de adequação	citrato		fosfato	
	Valor	DPR	Valor	DPR
Tempo de retenção (Tr)	± 3,0	0,14	± 2,0	0,24
Resolução (Rs)	---	---	5,59	1,23
Fator de assimetria (Tf)	1,82	1,14	1,43	1,45
Nº de pratos teóricos (N)	2537	0,94	4869	1,23

Fonte: (Do autor, 2017).

4.3.2 Otimização da metodologia analítica

4.3.2.1 Avaliação da diluição da amostra e padrões

Na avaliação do preparo das amostras e padrões foi descartada a diluição dos mesmos na água ultrapurificada por apresentar números de pratos teóricos menor que 2000 e fator de assimetria maior que 2,0, em desacordo com os parâmetros de conformidade recomendados, além de apresentar um maior tempo de retenção. Ao contrário do preparo realizado pela adição de água ultrapurificada e um volume da fase móvel (NaOH 20mM), se obteve satisfatória por apresentar todos os parâmetros dentro dos critérios de aceitação e um tempo de retenção menor. A tabela 17 descreve a avaliação da diluição do padrão e amostra.

Tabela 17 - Avaliação do preparo da amostra/padrões.

Parâmetros de adequação	Experimentos	
	Água ultrapurificada	Água ultrapurificada + NaOH 20 mM
Tr*	Maior	Menor
Tf**	>2,0	<2,0

DPR***	<1,5%	<1,5%
N****	<2000	>2000

* Tempo de retenção

** Fator de assimetria <2,0

*** Desvio padrão relativo <1,5%

**** Número de pratos teóricos >2000

Fonte: (Do autor, 2017).

4.3.2.2 Avaliação do fluxo da fase móvel

A avaliação do fluxo da fase móvel foi realizada para verificar sua influência no método proposto. A tabela 18 descreve os resultados obtidos para a citrato e fosfato comprovando que a avaliação do fluxo da fase móvel é determinante no tempo de retenção da análise.

Tabela 18 - Avaliação do fluxo da fase móvel para a determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado.

Parâmetros de adequação	Citrato			Fosfato		
	1,9 mL/min	2,0 mL/min	2,1 mL/min	1,9 mL/min	2,0 mL/min	2,1 mL/min
Tr*	3,98	3,48	3,97	2,50	2,22	2,90
Tf**	1,07	1,16	1,19	1,25	1,20	1,42
DPR***	<1,5%	<1,5%	>1,5%	<1,5%	<1,5%	>1,5%
N****	3123	3244	2461	3014	3101	2787

* Tempo de retenção

** Fator de assimetria <2,0

*** Desvio padrão relativo <1,5%

**** Número de pratos teóricos >2000

Fonte: (Do autor, 2017).

Na avaliação dos parâmetros de adequação, foi visualizada a redução do número de pratos teóricos e do fator de retenção pelo aumento do fluxo da fase móvel. Este resultado comprovou a especificação do fabricante da coluna cromatográfica, que informa que a coluna para análise dos íons apresenta o número de pratos teóricos relacionados inversamente com o fluxo da fase móvel (THERMO SCIENTIFIC, 2017b).

Na avaliação da variação do fluxo da fase móvel, foi descartado o fluxo de 2,1 mL/min, pois apresenta um maior tempo de retenção, menor número de pratos

teóricos e DPR maior que 1,5%. Comparando os fluxos de 1,9 mL/min e 2,0 mL/min, foi definida a continuidade do fluxo de 2,0 mL/min, por apresentar um número de pratos teóricos maior e um tempo de retenção menor em comparação com o fluxo 1,9 mL/min. A mesma condição se aplica ao fosfato.

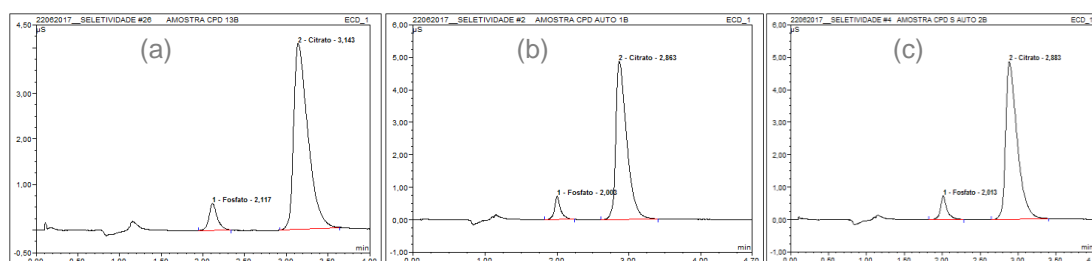
Os resultados obtidos demonstraram satisfatoriedade dos parâmetros de adequação para os analitos nos fluxos testados. No fluxo de 1,9 mL/min foi verificado um fator de assimetria inferior para o citrato sendo excluído da avaliação. Embora os fluxos de 1,9 e 2,1 mL/min tenham apresentado valores muito próximos, optou-se por utilizar o fluxo de 2,0 mL/min devido ao menor tempo de análise.

4.4 Validação da metodologia analítica

4.4.1 Avaliação da seletividade

A seletividade do método foi demonstrada utilizando a comparação dos cromatogramas (Figura 7) da amostra comercial, amostra preparada sem o processo de autoclavação e amostra preparada com o processo de autoclavação.

Figura 7- Cromatograma da seletividade da (a) amostra comercial CPD, (b) amostra simulada CPD autoclavada e (c) amostra simulada CPD não autoclavada



Condições experimentais:

(a) Amostra comercial CPD, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac[®] AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutométrica com temperatura do forno em 25 °C.

(b) Amostra simulada CPD autoclavada, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac[®] AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutométrica com temperatura do forno em 25 °C.

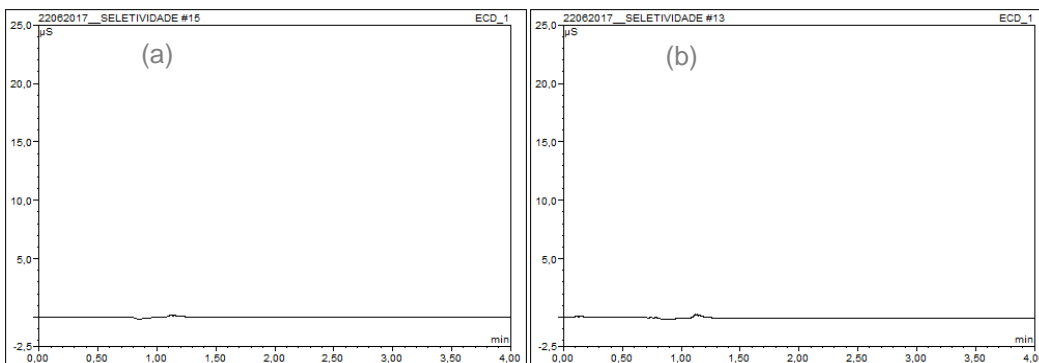
(c) Amostra simulada CPD não autoclavada, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac[®] AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutométrica com temperatura do forno em 25 °C.

Fonte: (Do autor, 2017).

Ao analisar os sinais cromatográficos, observou-se a simetria e a distinção entre as duas substâncias.

A Figura 8 indica a comparação do placebo não autoclavado e placebo autoclavado. Nessa última condição, foi verificado que não houve degradação com a autoclavação e, além disso, não ocorreu a formação de compostos que possam eluir, juntamente, com o fosfato ou o citrato.

Figura 8 - Cromatograma da seletividade da amostra (a) placebo autoclavado e amostra (b) placebo não autoclavado



Condições experimentais:

(a) Amostra placebo (sem os analitos de interesse) autoclavada, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac® AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutimétrica com temperatura do forno em 25 °C.

(b) Amostra placebo (sem os analitos de interesse) não autoclavada, utilizando como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 2,0 mL/minuto, injeção de 10 mL, coluna de troca iônica Ionpac® AS11 (tamanho 250 x 4,0 mm), detecção condutimétrica com temperatura do forno em 25 °C.

Fonte: (Do autor, 2017).

Logo, o método foi seletivo, visto que não existem substâncias próximas ao tempo de retenção dos analitos (RIBANI, 2004; FUST; 2011; VALE; 2012). Na avaliação da especificidade, a autoclavação das amostras foi escolhida como método de degradação por corresponder a uma etapa do processo industrial. Observou-se os mesmos perfis cromatográficos com tempo de retenção de $\pm 2,0$ minutos para o fosfato e $\pm 3,0$ minutos para o citrato, constatando ausência de interferentes e/ou produtos de degradação na região de interesse.

4.4.2 Avaliação da linearidade, limite de quantificação e limite de detecção

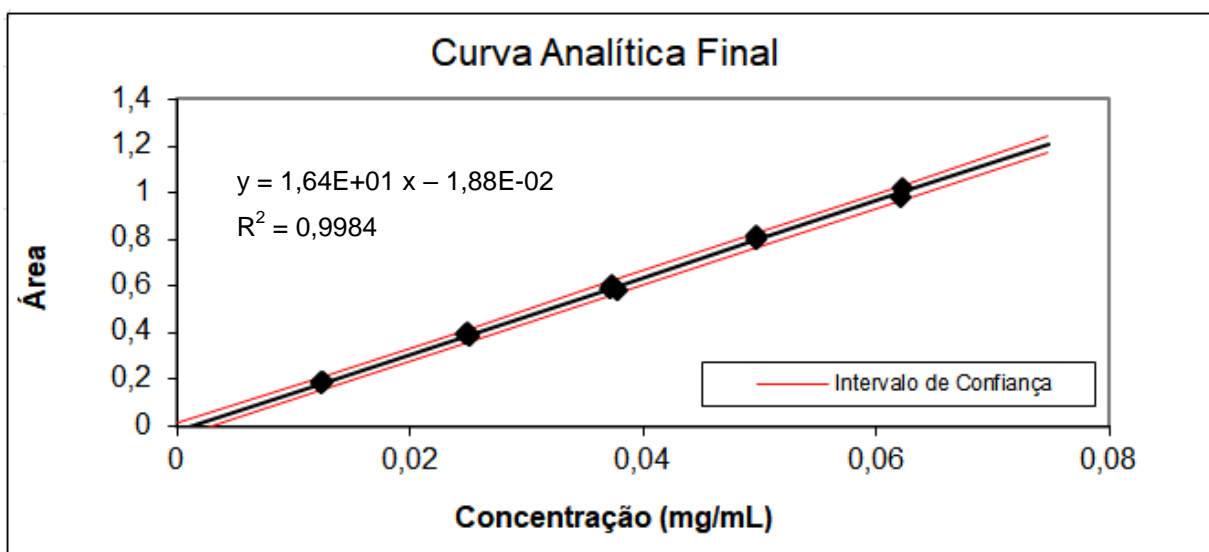
A linearidade foi comprovada pela verificação da homocedasticidade, obtenção de regressão linear significativa, ausência de desvio de linearidade e

comprovação da normalidade. De acordo com os testes realizados, foi observado um coeficiente de correlação (r) de 0,9992 para o citrato e de 0,9988 para o fosfato, conforme demonstrado nas figuras 9 e 10 e nos anexos A e B, conforme estabelecido pela Anvisa (0,99) e pelo Inmetro (0,90), comprovando a satisfatoriedade do método para determinar citrato e fosfato na matriz das soluções anticoagulantes.

A avaliação da linearidade do teor de citrato de acordo com a planilha de avaliação da Linearidade de Curva Analítica apresentou valores extremos, porém, a linearidade não ficou comprometida pelo desvio verificado, pois, estes valores foram excluídos da curva analítica. Este resultado demonstrou que o coeficiente de correlação (r) se apresentou satisfatório (0,9992). O resumo dessa avaliação está descrito, detalhadamente, no anexo A.

A análise dos resíduos apresentou resultado satisfatório pelo teste de Dubin Watson (autocorrelação), verificou a homocedasticidade e a distribuição normal dos resíduos. A regressão foi significativa e o gráfico de resíduos apresentou resultados dispersos numa faixa estreita de análise. A curva analítica utilizada na avaliação do citrato está representada na Figura 9. A planilha com os resultados obtidos apresentam descritos no anexo A.

Figura 9 - Representação gráfica da curva analítica do padrão de ácido cítrico anidro resultante da avaliação da linearidade

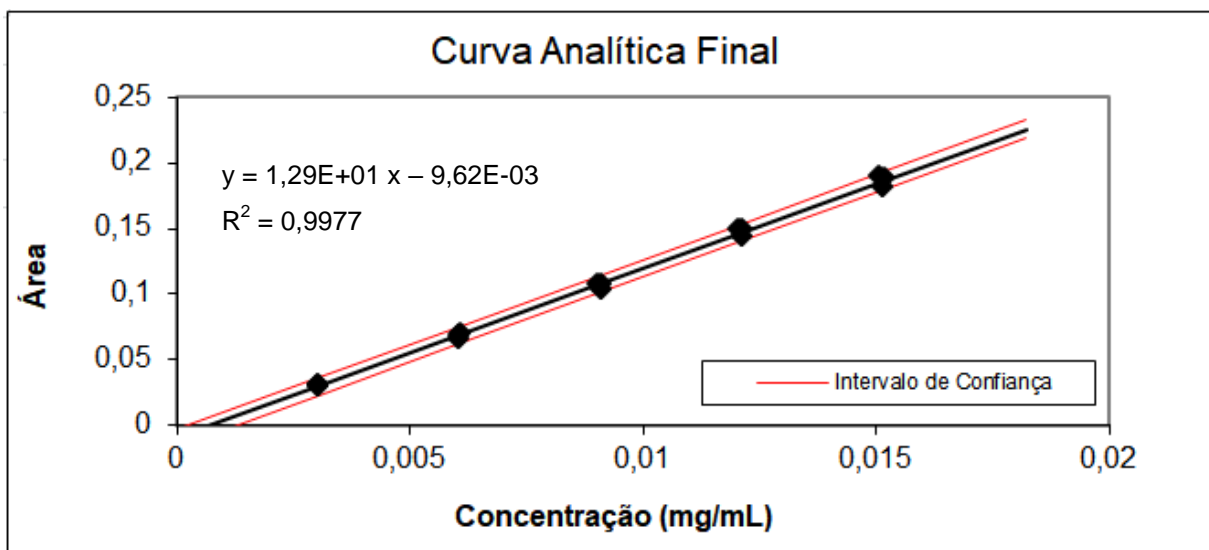


Fonte: (Do autor, 2017).

Na avaliação da linearidade do teor de fosfato diácido de sódio monohidratado, não apresentou valores extremos. O resultado demonstrou que o coeficiente de correlação (r) se apresentou satisfatório (0,9988), descrito detalhadamente, no anexo B.

A análise dos resíduos apresentou resultado satisfatório pelo teste de Dubin Watson (autocorrelação), verificou a homocedasticidade e a distribuição normal dos resíduos. A regressão foi significativa e o gráfico de resíduos apresentou resultados dispersos numa faixa estreita de análise. A curva analítica utilizada na avaliação do fosfato está representada na Figura 10. A planilha com os resultados obtidos apresentam descritos no anexo B.

Figura 10 - Representação gráfica da curva analítica do padrão de fosfato diácido de sódio monohidratado resultante da avaliação da linearidade



Fonte: (Do autor, 2017).

Os resultados obtidos para o limite de detecção do citrato foi de 1,93 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação de 5,75 $\mu\text{g/mL}$, para o fosfato, o limite de detecção encontrado foi de 0,563 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação de 1,68 $\mu\text{g/mL}$ obtidos pela planilha de avaliação da Linearidade de Curva Analítica. A injeção de soluções contendo, individualmente, cada um dos analitos de interesse deste método fez-se a identificação específica dos sinais cromatográficos de fosfato e citrato, respectivamente. (FERNANDES, 2016).

4.4.3 Avaliação da precisão

Os resultados obtidos para a precisão foram aceitáveis. A avaliação da repetibilidade para o citrato (Tabela 19) e o fosfato (Tabela 20) indicou DPR experimental de 1,6% para o citrato e 1,9% para o fosfato, inferior ao limite estabelecido pela Anvisa (5%) e pelo Inmetro (2%) (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

Tabela 19 - Resultados da avaliação da repetibilidade em relação ao DPR do citrato total.

Parâmetro	Resultado obtido
Concentração mínima	19,26 g/L
Concentração máxima	19,54 g/L
Concentração média	19,38 g/L
Desvio padrão (s)	0,0015
Limite de Repetitividade (r)	0,0095
DPR	1,6292 %

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 20 - Resultados da avaliação da repetibilidade em relação ao DPR do fosfato diácido de sódio monohidratado.

Parâmetro	Resultado obtido
Concentração mínima	2,12 g/L
Concentração máxima	2,13 g/L
Concentração média	2,14 g/L
Desvio padrão (s)	0,0001
Limite de Repetitividade (r)	0,0008
DPR	1,9273 %

Fonte: (Do autor, 2017).

No estudo da precisão intermediária do citrato (Tabela 21) e do fosfato (Tabela 22), a variabilidade de alguns parâmetros experimentais (analista, equipamento e dia de análise) indicou um DPR de 2,8% para o citrato e 3,1% para o fosfato, também inferior conforme os critérios estabelecidos pela Anvisa (5%) e pelo Inmetro (4%) (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

Tabela 21 - Resultados da avaliação da precisão intermediária em relação ao DPR do citrato total.

Parâmetro	Resultado obtido
Desvio padrão experimento 1	1,6292
Desvio padrão experimento 2	4,4570
Desvio padrão experimento 3	1,0347
Desvio padrão de precisão intermediária (Si)	0,0025
DPR	2,7900%

Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 22 - Resultados da avaliação da precisão intermediária em relação ao DPR do fosfato diácido de sódio monohidratado.

Parâmetro	Resultado obtido
Desvio padrão experimento 1	1,9273
Desvio padrão experimento 2	4,3320
Desvio padrão experimento 3	2,5434
Desvio padrão de precisão intermediária (Si)	0,0002
DPR	3,0879%

Fonte: (Do autor, 2017).

4.4.4 Avaliação da exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela determinação da recuperação, recomendado pela Anvisa e pelo Inmetro (BRASIL, 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016; BRASIL, 2017b).

As avaliações foram realizadas, isoladamente, para cada analito e foi adotada a tabela de critério de aceitação para recuperação de acordo com o Inmetro. Neste estudo, a recuperação apresenta-se relacionada com as concentrações dos analitos, obtidas na etapa de repetitividade, e correspondente a (95-105%) para o analito citrato e (90-107%) para o analito fosfato (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

A exatidão foi comprovada pelo cálculo da recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão. A tabela 23 descreve os resultados obtidos para recuperação e verificou-se que as médias dos resultados se encontraram dentro dos limites estabelecidos.

Tabela 23 - Resultados obtidos na avaliação da exatidão na determinação de citrato total e fosfato diácido de sódio monohidratado.

Curva	Citrato (%)	Fosfato (%)
Nível 1	98,20	95,45
Nível 2	95,09	101,14
Nível 3	95,92	105,95
Nível 4	97,06	107,27
Recuperação média (%)	96,57	102,45

Fonte: (Do autor, 2017).

Verificou-se, que a recuperação dos analitos em cada nível da curva de adição padrão do citrato e fosfato, ficou entre os limites estabelecidos para o nível de concentração dos analitos em estudo, comprovando assim, adequada exatidão do método para os mesmos (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

4.4.5 Avaliação da robustez

Para a escolha das variáveis, chamadas de fatores, baseou-se na indicação da Anvisa (2017b) descrito no item 3.6.5. Foram considerados dois níveis, identificado por nível I e nível II, para avaliação dos fatores de coluna cromatográfica, volume de injeção, concentração da fase móvel e fluxo da fase móvel. Foram utilizados quatro fatores e admitido três réplicas da solução padrão na concentração do ponto intermediário da curva analítica. Os fatores escolhidos foram: (1) concentração da fase móvel; (2) volume de injeção; (3) fluxo da fase móvel; (4) coluna cromatográfica, sendo variados sensivelmente em dois níveis (nível superior e nível inferior) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, 2016).

O cruzamento dos fatores correspondeu a dezesseis ensaios e os resultados obtidos refletiram a influência de cada fator sobre os quatro parâmetros de eficiência de separação, ou seja, demonstrados pelos parâmetros do sistema cromatográfico: tempo de retenção (Tr), resolução (Rs), fator de assimetria (Tf), número de pratos teóricos (N) e a área obtida.

Na avaliação dos resultados foi observado que todas as combinações apresentaram valores dentro dos critérios de aceitabilidade, ou seja, a resolução (Rs) superior a 2, fator de assimetria (Tf) inferior a 2 e número de pratos teóricos (N) superior a 2000. Além disso, todos os resultados apresentaram repetibilidade dentro do permitido (inferior a 2%), demonstrando baixa variabilidade do equipamento (USP, 2016).

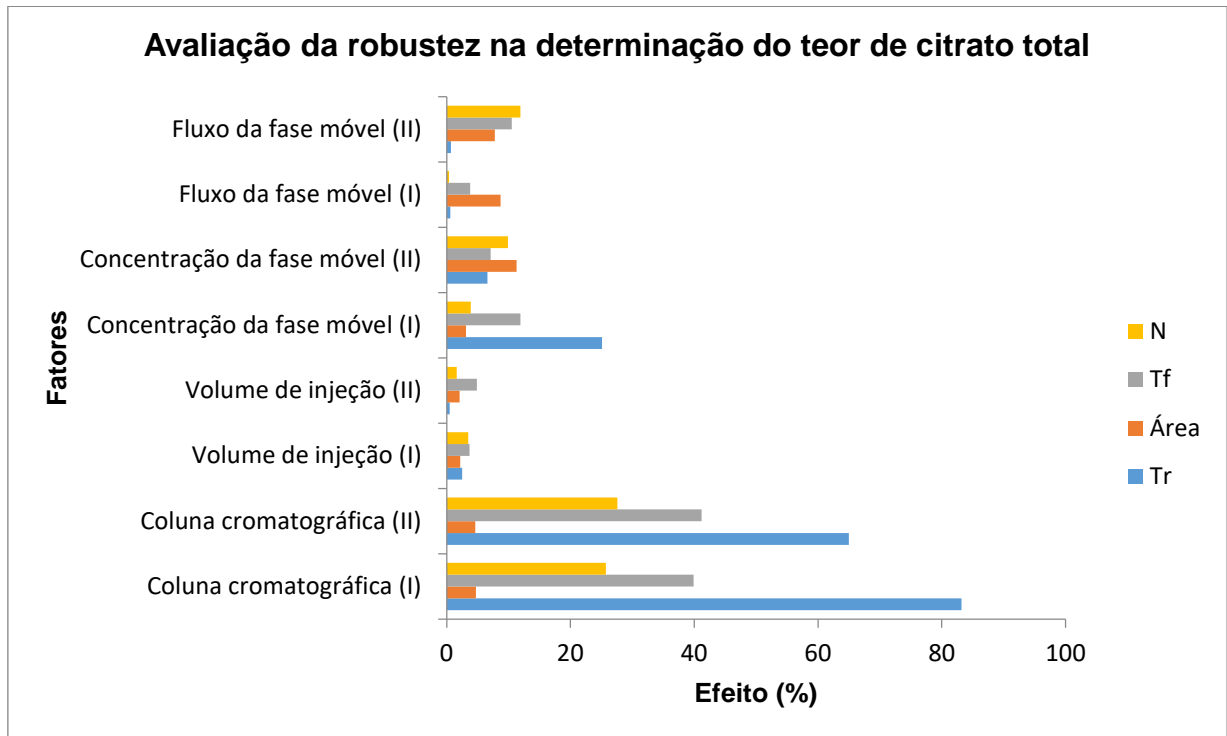
Os efeitos resultantes dessas combinações para cada fator na determinação dos analitos apresentam-se descritos com valores em módulo nas tabelas 24 e 25, respectivamente, e os gráficos demonstrados nas figuras 11 e 12, possibilitando observar a influência dos fatores no método.

Tabela 24 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de citrato total.

Fator	Nível	Tr	Área	Rs	Tf	N
Coluna cromatográfica	(I)	83,2	4,7	--	39,9	25,7
	(II)	65,0	4,6	--	41,2	27,6
Volume de injeção	(I)	2,5	2,2	--	3,7	3,5
	(II)	0,5	2,1	--	4,9	1,6
Concentração da fase móvel	(I)	25,1	3,1	--	11,9	3,9
	(II)	6,6	11,3	--	7,1	9,9
Fluxo da fase móvel	(I)	0,6	8,7	--	3,8	0,4
	(II)	0,7	7,8	--	10,5	11,9

Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 11 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de citrato total



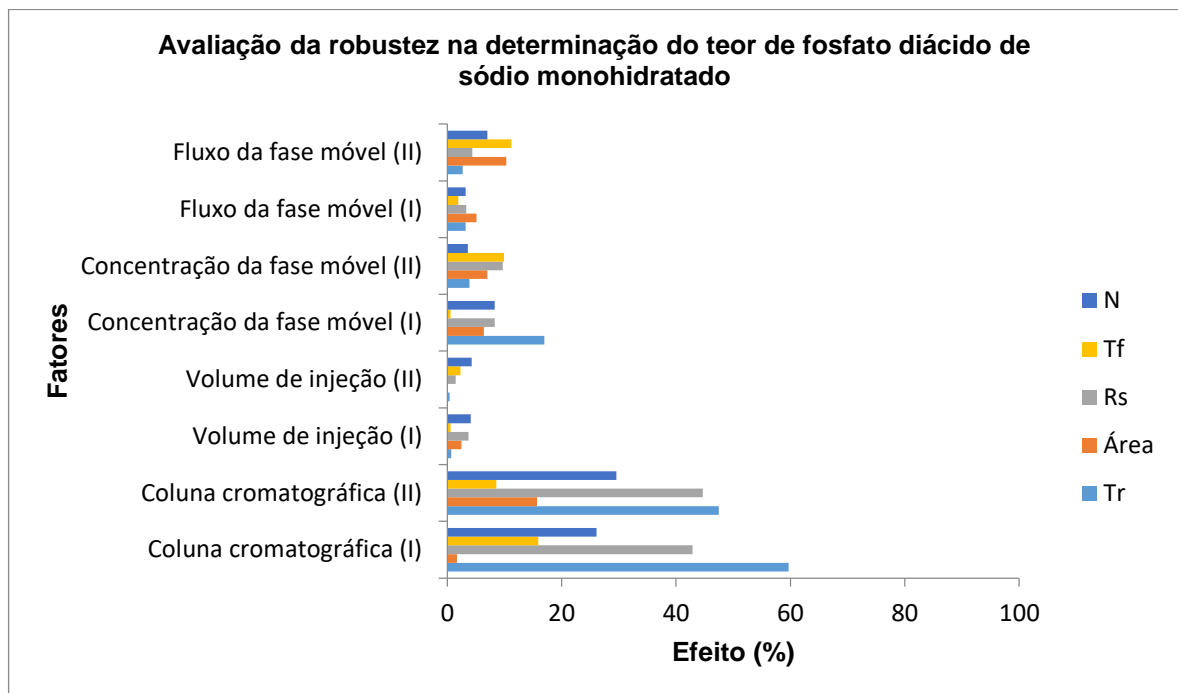
Fonte: (Do autor, 2017).

Tabela 25 - Resultados dos efeitos de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de fosfato diácido de sódio monohidratado.

Fator	Nível	Tr	Área	Rs	Tf	N
Coluna cromatográfica	(I)	59,7	1,7	42,9	15,9	26,1
	(II)	47,5	15,7	44,7	8,6	29,6
Volume de injeção	(I)	0,7	2,5	3,7	0,6	4,1
	(II)	0,4	0,0	1,5	2,3	4,3
Concentração da fase móvel	(I)	17,0	6,4	8,3	0,6	8,3
	(II)	3,9	7,0	9,7	9,9	3,6
Fluxo da fase móvel	(I)	3,2	5,1	3,3	1,9	3,2
	(II)	2,7	10,3	4,4	11,2	7,0

Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 12 - Avaliação do efeito de cada fator da avaliação da robustez na validação da determinação de fosfato diácido de sódio monohidratado



Fonte: (Do autor, 2017).

Os resultados demonstraram que o tempo de retenção, fator de assimetria e a resolução foram os parâmetros de adequação que apresentaram maiores alterações, verificado pela variabilidade dos resultados em todas as combinações e pelos efeitos nas determinações dos analitos.

A coluna cromatográfica foi o fator que demonstrou maior efeito nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico para os dois analitos, sendo seguido do fator concentração da fase móvel e fluxo da fase móvel para ambos os analitos. Sendo que os demais fatores: concentração da fase móvel, fluxo da fase móvel e volume de injeção apresentaram baixa variabilidade nas respostas obtidas para os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico comparando com a coluna.

A aceitabilidade dos parâmetros de adequação constata que as alterações promovidas não podem ocasionar variações significativas em relação aos parâmetros de adequação do sistema avaliados (tempo de retenção, resolução, fator de assimetria, e número de pratos teóricos (RIBANI, 2004; FUST, 2011; VALE, 2012).

Os valores de DPR comprovaram que o método é robusto a pequenas variações nas condições analíticas avaliadas mantendo sua exatidão e precisão, e garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos (RIBANI, 2004; MARKMAN, 2007; TEIXEIRA, 2008).

5 CONCLUSÃO

As amostras selecionadas para esta avaliação apresentaram resultados satisfatórios quanto aos parâmetros de otimização e validação da metodologia.

O método alternativo demonstrou separação cromatográfica eficiente comprovada pelos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico e apresentou resposta linear satisfatória. Assim, o novo método se mostrou apto à validação. Na comparação dos métodos, a avaliação estatística indicou que não há diferença significativa entre os dois métodos, demonstrando a confiabilidade dos dados apresentados com os resultados significativos das análises de citrato e fosfato.

A otimização das condições analíticas do método através da variação do fluxo de fase móvel e da diluição das amostras e padrões permitiu a avaliação da influência dessas variáveis nos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico, indicando que o fluxo de 2,0 mL/minuto e a diluição com fase móvel NaOH 20mM foram favoráveis para o desempenho do método.

Na validação analítica, o método demonstrou ser seletivo para a quantificação de citrato e fosfato em solução anticoagulante de bolsa de sangue do tipo CPD, pois não ocorreu a formação de compostos que possam eluir, juntamente, com os analitos. Na avaliação da especificidade foi constatado a ausência de interferentes e/ou produtos de degradação na região de interesse.

O parâmetro da linearidade apresentou resposta linear, os coeficientes de correlação estavam de acordo com os valores recomendados pela Anvisa e pelo Inmetro. Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método dos mínimos quadrados.

A repetibilidade e a precisão intermediária indicaram valores de DPR satisfatórios em relação aos recomendados pela Anvisa e Inmetro, demonstrando não apresentar diferença estatística entre os resultados por analistas diferentes em dias diferentes na precisão intermediária.

O método apresentou exatidão adequada, obtendo-se recuperação satisfatória conforme os critérios de aceitação estabelecidos pela Anvisa e Inmetro para os analitos citrato e fosfato.

A robustez do método não apresentou diferença estatística significativa entre os resultados obtidos a partir de pequenas variações nos diferentes parâmetros das

condições cromatográficas, indicando que o tempo de retenção, o fator de assimetria e resolução foram os parâmetros de adequação que apresentaram as maiores alterações. Na avaliação dos efeitos dos fatores, a coluna cromatográfica e a concentração da fase móvel apresentaram os efeitos mais significativos.

Os procedimentos analíticos para determinação de citrato e fosfato por cromatografia iônica, avaliados neste trabalho, apresentaram desempenho dentro das especificações preconizadas para os parâmetros da validação de métodos analíticos. Desta forma, os resultados encontrados no estudo de validação indicaram que o método é confiável e reprodutível de forma a reduzir o risco à saúde.

Portanto, o estudo contribui para novos avanços no controle do produto e para a revisão da legislação vigente, ressaltando a importância da validação analítica para assegurar a qualidade de bolsas de sangue, mas também de produtos de âmbito sanitário, principalmente, disponibilizados pelo Ministério da Saúde. Ainda, denota a importância do INCQS na regulação deste, colaborando para as atividades de controle da qualidade de bolsa de sangue utilizando metodologia analítica segura e reprodutível, evidenciando a importância do componente laboratorial dentro do SNVS.

6 PERSPECTIVAS

Sugerir a implementação do novo método nas análises prévias de bolsas de sangue integrantes de programa do Ministério da Saúde / Anvisa com alteração de parâmetro legislativo.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Histórico da Rede**. Brasília, 2015a. Disponível em: <<http://redesentinela-Anvisa.blogspot.com.br/p/historico-da-rede.html>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

_____. **Produtos para a Saúde**. Brasília, 2015b. Disponível em: <<http://portal.Anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Produtos+para+a+Saude>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

ALEXANDRE, G. P. **Validação de métodos para análise de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, n. 59, p. 60-67, 2012.

BELLI, C. V. **Novas perspectivas no controle dos produtos para saúde no Brasil – a visão do setor regulado**. 2006. 295 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRANCO, N. M. C. **Avaliação da utilização do Notivisa pelos Lacens**. 2009. 57 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.

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

_____. Decreto n.º 79094, de 5 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº 6360/76, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jan de 1977.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998. Anexo. Regulamento técnico sobre bolsas plásticas para a

coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 nov. 1998.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 56, de 6 de abril de 2001. Dispõe sobre os requisitos essenciais de segurança e eficácia de produtos para saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de abr. 2001a.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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 out. 2001b.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, 2 de junho de 2003.

_____. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Imunizações 30 anos**. Brasília, 2003. 208 p.

_____. Ministério da Saúde. **HIV/Aids, hepatites e outras DST**. Brasília, 2006. 197 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.660, de 22 de julho de 2009. Institui o sistema de notificação e investigação em vigilância sanitária - Vigipós, no âmbito do sistema nacional de vigilância sanitária, como parte integrante do sistema único de saúde - SUS. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de jul. 2009.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de tecnovigilância: abordagens de vigilância sanitária de produtos para a saúde comercializados no Brasil**. Brasília, 2010. 629 p.

_____. Resolução nº 16, de 28 de março de 2013. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 abr. 2013.

_____. Resolução 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, 02 jun. 2014.

_____. Resolução nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 fev. 2016.

_____. Ministério da Saúde. **Caderno de Informação. Sangue e Hemoderivados/Dados de 2015**. Brasília, 2017a. 118 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 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, 11 jul. 2017b.

FERNANDES, F. S. et al. Validação da metodologia para a determinação de citrato total em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência. **Rev. Virtual Quim.** v. 8, n, 5, p. 1476-1484, 2016.

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

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

HARMENING, D.M. **Técnicas modernas em banco de sangue**. 6. ed. São Paulo: Revinter, 2015.

HELENO, F. F. et al. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de btex em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 329-336, 2010.

HOFFBRAND, A. V. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (Brasil). **Avaliação da conformidade**. 6. ed. 2015. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/qualidade/>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

_____. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro. 2007.

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

_____. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 3826-1**: plastics collapsible containers for human blood and blood components - part 1: conventional containers. Switzerland, 2013.

KARTHIKEYAN, K. et al. Development and validation of rapid ion-chromatographic method with conductivity detection for trace level determination of allylamine in sevelamer drug substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p. 203-207, 2011.

KLEIN, A. C. **Cromatografia iônica como método analítico alternativo para a análise quantitativa de analitos**. 2010. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

LEITE, R. S. **Análise de bifosfonatos por cromatografia líquida de troca iônica, detecção indireta no ultravioleta e por condutividade com supressão do eluente**. 2008. 85 f. Tese. (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

LOWEN, T. C. R. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de lamivudina e do ensaio limite do enantiômero(+)**BCH-189 em comprimidos de lamivudina. 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

MARKMAN, B. E. O.; KOSCHTSCHAK, M. R. W.; AURICCHIO, M. T. Otimização e validação de método farmacopeico para verificar possíveis desvios de qualidade de matérias primas e cápsulas manipuladas contendo hormônios tireoidianos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 268-274, 2007.

MARQUES, M. N. **Cromatografia de íons aplicada na especiação de cromo hexavalente em amostra de interesse ambiental**. 1999. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MICHALSKI, R.; LYKO, A.; Kurzyca, I. Matrix Influences on the Determination of Common Ions by using Ion chromatography - part 1: determination of Inorganic Anions. **Journal of Chromatographic Science**. v. 50, p. 482–493. 2012.

MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 5 ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2005. 285 p.

MORAIS, L. O. **Qualidade do fio para sutura cirúrgica e do cateter venoso central: avaliação das notificações de tecnovigilância registradas no sistema NOTIVISA**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

PROWSE, C. V.; DE KORTE, D.; HESS, J. R., et al. Commercially available blood storage containers. **Vox Sanguinis**, v. 106, p. 1-13, 2014.

PIMENTA, C. C. **Desafios e oportunidades no setor de compras governamentais na América Latina e Caribe: o caso brasileiro**. Brasília: ENAP, 1998. p. 23.

RÂBELO, R. B. **Vigilância pós-comercialização de produtos para a saúde: o desafio da rede sentinela**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

REIS, M. E. D. Tecnovigilância no Brasil: evolução e perspectivas. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA PUBLICAÇÕES DA PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU DA PUC GOIÁS, 5., 2010, Goiás. **Anais eletrônicos**. Goiás: PUC, 2010. Disponível em: <http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/home/secao.asp?id_secao=3148>. Acesso em: 07 nov. 2015.

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

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, 1992.

SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P.; AZEVEDO, A. S. Validação de um método para determinação simultânea de quatro ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em polpas de frutas congeladas. **Quím. Nova**, Bahia, v. 37, n. 3, p. 540-544, 2014.

SASTRI, V. R. **Plastics in medical devices**: properties, requirements, and applications. Norwich, NY: William Andrew, 2010.

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 Sang**, v. 110, p. 227–235, 2016.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **High-performance liquid chromatography in: principles of instrumental analysis**. 4. ed. Flórida: Harcourt Brace College Publishers, 1992.

SOLUÇÃO anticoagulante citrato, fosfato e glicose. In: FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

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

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

THERMO SCIENTIFIC. **Assay for citrate and phosphate in pharmaceutical formulations using ion chromatography**: AN 164. Disponível em: <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/49183-AN164>>. Acesso em: 07 jan. 2013.

THERMO SCIENTIFIC. **Industrial chromatography**. (AS11). Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/044076>>. Acesso em: 09 jun. 2017.



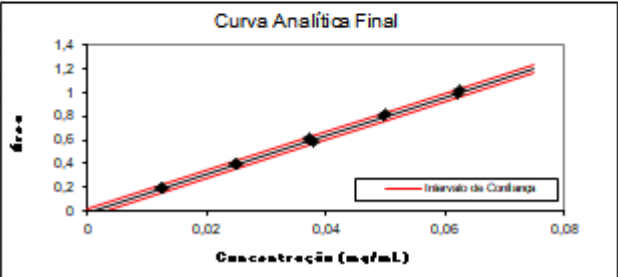
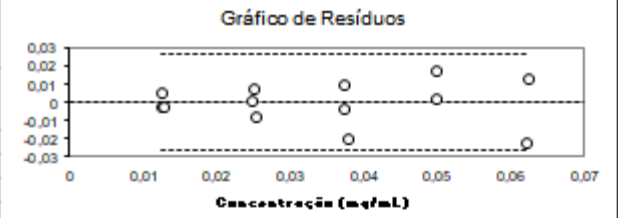
THE UNITED States Pharmacopeia 39. National formulary 34. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2016. 2 v.

VALE, R. F. D. **Avaliação de metodologias preconizadas no controle de qualidade físico-químico de bolsas de sangue**. 2010. 106 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.



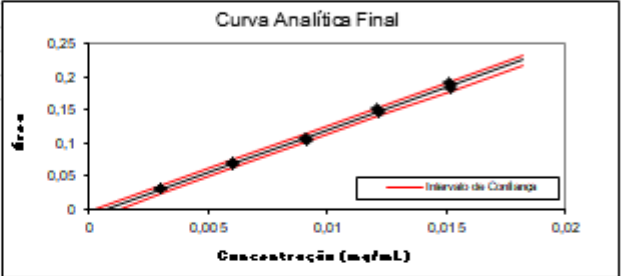
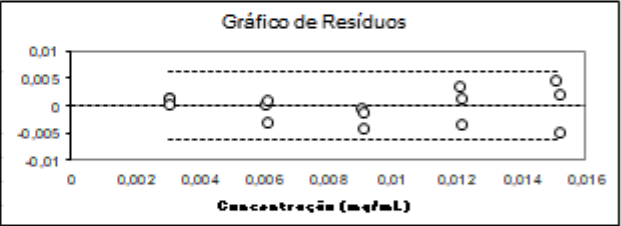
VALE, R. F. D. **Otimização e validação da determinação do teor de glicose, frutose e manitol em bolsas de sangue por cromatografia em fase líquida**. 2012. 161 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,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

World Health Organization - WHO. **Safe Injection Global Network (SIGN)**. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/injection_safety/en>. Acesso em: 22 jul. 2015.

ANEXO A - PLANILHA DE LINEARIDADE DO CITRATO TOTAL

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		 INQCS			
AValiação de Linearidade de Curva Analítica					
Dados da Curva Analítica					
Análise:	Avaliação da Linearidade para o analito citrato (amostra CPD)				
Data de Confeção da Curva:	05/02/2018	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	5		
Equipamento:	Dionex	Responsável:	Gleyce		
Tabela de dados originais					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área		
1	01	0,01242	0,19		
	02	0,01245	0,183		
	03	0,01259	0,186		
2	04	0,02485	0,39		
	05	0,02491	0,397		
	06	0,02518	0,386		
3	07	0,03727	0,589		
	08	0,03736	0,604		
	09	0,03776	0,581		
4	10	0,0497	0,799		
	11	0,04982	0,816		
	12	0,05035	0,78		
5	13	0,06212	0,978		
	14	0,06227	1,016		
	15	0,06284	0,976		
Avaliação de Valores Extremos					
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
Curva Analítica Final					
					
Gráfico de Resíduos					
					
Normalidade dos Resíduos					
(Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,98				
Reqrit ($\alpha = 0,05$)	0,93				
Autocorrelação dos Resíduos					
(Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	3,04				
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,01				
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,34				
Homogeneidade da Variância dos Resíduos					
(Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	6,29E-05				
t_f calculado	-1,32E+00				
$t_{f, \alpha/2, n-k}$ ($\alpha = 0,05$)	2,20E+00				
p	2,14E-01				
Resumo da Avaliação					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade $p > 0,05$					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa $p < 0,001$					
Não há desvio de Linearidade $p > 0,05$					
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)					
Não há autocorrelação $d > dL$					
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)					
Segue a Normal $Req > Reqrit$					
Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)					
Coefficiente Angular (b)	1,64E+01	Coefficiente Linear (a):	-1,88E-02		
r	0,9992	R ²	0,9984		
N	13	Graus de Liberdade	11		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	1,93E-03	Limite de Quantificação	5,75E-03		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,01E+00	1,01E+00	6,78E+03	1,05E-16
resíduos	11	1,64E-03	1,49E-04		
Ajuste	3	4,12E-04	1,37E-04	8,95E-01	4,84E-01
erro puro	8	1,23E-03	1,53E-04		
total	12	1,01E+00			
Observações					
Responsável: _____		Data: ___/___/___		Verificado por: _____	
				Data: ___/___/___	
AValiação de Linearidade de Curva Analítica				Pág.: 1/1	

ANEXO B - PLANILHA DE LINEARIDADE DO FOSFATO DIÁCIDO DE SÓDIO MONOHIDRATADO

 Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde		 INCQS			
AValiação de Linearidade de Curva Analítica					
Dados da Curva Analítica					
Análise:	Avaliação da Linearidade para o analito fosfato (amostra CPD)				
Data de Confeção da Curva:	05/02/2018	Curva N°:	1		
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	5		
Equipamento:	Dione®	Responsável:	Gleyce		
Tabela de dados originais					
Nível (k)	i	Conc. µg/mL	Resposta Área		
1	01	0,00301	0,031		
	02	0,00303	0,031		
	03	0,00303	0,030		
2	04	0,00603	0,069		
	05	0,00607	0,070		
	06	0,00606	0,066		
3	07	0,00904	0,107		
	08	0,00910	0,107		
	09	0,00910	0,104		
4	10	0,01205	0,150		
	11	0,01214	0,149		
	12	0,01213	0,144		
5	13	0,01506	0,190		
	14	0,01517	0,189		
	15	0,01516	0,182		
Avaliação de Valores Extremos					
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)					
Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
					
					
Normalidade dos Resíduos					
(Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,98				
Rcrit (α = 0,05)	0,94				
Autocorrelação dos Resíduos					
(Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	2,20				
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,08				
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,36				
Homogeneidade da Variância dos Resíduos					
(Teste de Brown-Forsythe)					
Variância Combinada	3,89E-06				
t ₁ calculado	-1,32E+00				
t _{1,α/2,df} (α = 0,05)	2,16E+00				
p	2,10E-01				
Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)					
Coefficiente Angular (b)	1,29E+01	Coefficiente Linear (a):	-9,62E-03		
r	0,9988	R ²	0,9977		
N	15	Graus de Liberdade	13		
Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
Limite de Detecção	5,63E-04	Limite de Quantificação	1,68E-03		
ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
fonte	GL	SQ	MQ	F	p
regressão	1	4,61E-02	4,61E-02	5,53E+03	1,76E-18
resíduos	13	1,08E-04	8,34E-06		
Ajuste	3	3,44E-05	1,15E-05	1,55E+00	2,62E-01
erro puro	10	7,40E-05	7,40E-06		
total	14	4,62E-02			
Resumo da Avaliação					
Homogeneidade de variância					
Há Homocedasticidade p > 0,05					
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade					
A regressão é significativa p < 0,001					
Não há desvio de Linearidade p > 0,05					
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)					
Não há autocorrelação d > dL					
Teste de Normalidade (α = 0,05)					
Segue a Normal Req > Rcrit					
Observações					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AValiação de Linearidade de Curva Analítica			Pág.: 1/1		