

Artigo

Validação da Metodologia para a Determinação de Citrato Total em Soluções Anticoagulantes de Bolsas de Sangue por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**Fernandes, F. S.;*** Vale, R. F. D.; Fust, A. M. B. S.; Freitas, M. N. M.;;
Guimarães, R. S. F.; Teixeira, M. T; Feitoza-Silva, M.; Jacob, S. C.*Rev. Virtual Quim.*, 2016, XX (XX), no prelo. Data de publicação na Web: 9 de outubro de 2016<http://rvq.sbg.org.br>**Validation of the Methodology for Determining Total Citrate in Blood Bags Anticoagulant Solutions Using High Performance Liquid Chromatography**

Abstract: Blood bags are products utilized to collect, store, process, transport, separate and administrate blood or its components. Considering this purposes of use, they may contain solutions in their inside, as anticoagulants and/or preservatives solutions. This products are classified, according with Anvisa RDC nº 185 from October 2001, due to their technical complexity as a level III risk product. The technical regulation that guides its registration process is ANVISA's RDC no 35, from June 2014, in which is normalized the whole quality control process for blood bags in Brazil, including the determination of physical and chemical assays that must be performed on anticoagulant solutions. One of these is the total citrate determination. Citrate solution acts as a buffer, ensuring viability and preserved blood components functions during the storage period. The objective of this study was to develop and validate a methodology to quantify total citrate, different from the one recommended by order nº 950, from November 1998. The following parameters were analyzed to validate the methodology under study: specificity, linearity and linear response range, detection limit, quantification limit, accuracy, precision and robustness. The study results showed that the proposed methodology allows a safe, efficient and suitable total citrate determination, to be used in the anticoagulant solutions quality control. This study contributed to insert the methodology in the current legislation, RDC Nº 35 from June 2014, for the blood bags control.

Keywords: Blood bag; sodium citrate; analytical validation.

Resumo

As bolsas de sangue são produtos destinados à coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e seus componentes, podendo conter ou não soluções anticoagulantes e/ou preservadoras. Esses produtos são classificados pela RDC nº 185 de outubro de 2001 da Anvisa devido a sua complexidade técnica, como um produto de risco III e o regulamento técnico utilizado para o registro deste produto é a RDC Nº 35 de junho de 2014. Esta resolução estabelece o controle de qualidade das bolsas de sangue no Brasil e preconiza os ensaios físico-químicos que devem ser realizados nas soluções anticoagulantes. Um destes ensaios é a determinação de citrato total que atua como um tampão para garantir a viabilidade e a função de cada constituinte sanguíneo durante o armazenamento. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia para determinação do teor de citrato total em solução anticoagulante, alternativa à recomendada pela Portaria 950 de 26 de novembro de 1998. Foram estudados os seguintes parâmetros de validação: especificidade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Os resultados do estudo mostraram que a metodologia proposta permite que a determinação do teor de citrato seja segura, eficiente e adequada para o controle de soluções anticoagulantes. Este estudo contribuiu para a inserção do ensaio na legislação vigente RDC Nº 35, de junho de 2014 para o controle das bolsas de sangue.

Palavras-chave: Bolsa de sangue; citrato de sódio; validação analítica.

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Química. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Telefone: +55 21 3568-5151

 fernanda.fernandes@incqs.fiocruz.br

DOI:

Validação da Metodologia para a Determinação de Citrato Total em Soluções Anticoagulantes de Bolsas de Sangue por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Fernanda S. Fernandes,* Renata F. D. Vale, Anna Maria B. S. Fust, Mary Nei de M. Freitas, Ringo S. F. Guimarães, Maíra T. Teixeira, Michele F. Silva, Silvana do C. Jacob

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Química. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* fernanda.fernandes@incqs.fiocruz.br

Recebido em 7 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 9 de outubro de 2016

1. Introdução

2. Metodologia

2.1. Validação do método

3. Resultados e Discussão

3.1. Validação analítica

4. Conclusão

1. Introdução

As bolsas de sangue conceitualmente consistem no produto destinado à coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e seus componentes.¹ Estão submetidas ao sistema de Vigilância Sanitária e segundo a RDC nº 185 de outubro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), devido a sua elevada complexidade técnica, está classificada como um produto de risco III.²

A Resolução RDC N° 35 de junho de 2014 estabelece os requisitos mínimos de qualidade para este artigo de saúde através

de parâmetros de controle biológicos, físicos e físico-químicos.³ Dentre os parâmetros físico-químicos recomendados, está a determinação de citrato total na solução anticoagulante das bolsas de sangue.⁴

A associação do citrato de sódio (Figura 1) com o ácido cítrico (Figura 2) 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. O teor de citrato total deve se apresentar na faixa

estabelecida pela legislação vigente (RDC Nº 35 de junho de 2014) de acordo com o tipo de solução. O método para determinação desse teor avaliado neste estudo utiliza a

técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV) e deve ser adequado para tal propósito.^{1,4}

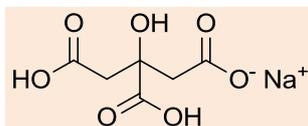


Figura 1. Estrutura química do citrato de sódio

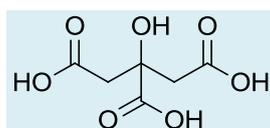


Figura 2. Estrutura química do ácido cítrico

Segundo a norma NBR ISO/IEC 17025, validação é a confirmação pelo fornecimento de evidências objetivas de que o método é apropriado para o uso pretendido, se relacionando a métodos não normalizados, desenvolvidos pelo próprio laboratório. A Resolução RE nº 899 da Anvisa de 2003 complementa esse conceito, descrevendo a validação como garantia de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando confiabilidade aos resultados.^{5,6}

Nesta perspectiva, o presente trabalho relata a validação da metodologia analítica realizada com base na Resolução RE nº 899 de maio de 2003 da Anvisa e no documento Inmetro DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2011. Foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.^{6,7}

2. Metodologia

A solução utilizada na validação analítica foi definida pela avaliação das amostras de bolsas de sangue analisadas no período de janeiro de 2006 a dezembro de 2012 através

do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA 2000 e SGAweb 2011) do INCQS usando também os filtros: categoria de produto e tipo de produto.

Na validação analítica foram utilizadas micropipetas, pipetas e balões volumétricos de volumes variados, todos devidamente calibrados. As medidas foram efetuadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção ultravioleta-visível (UV-VIS) Shimadzu Corporation, com software LC Solution[®] versão 1.22.

Foram utilizados padrão de referência de ácido cítrico da USP e padrão analítico da Sigma-Aldrich (padrão secundário) pré-qualificado por inspeção visual e avaliação de teor.

Todas as soluções utilizaram água purificada obtida em um sistema de purificação Milli-Q. A fase móvel foi preparada pela adição de 250 µL de ácido sulfúrico grau analítico (Merck) a cada litro de água para obter uma solução final de 0,009 M, em seguida filtrada com membrana de celulose 0,45 µm e degaseificada em banho de ultrassom à temperatura ambiente.

Os padrões de calibração nas concentrações de 1,8 a 2,4 mg/mL foram confeccionados a partir de uma solução estoque de ácido cítrico na concentração 25

mg/mL, preparada solubilizando 1250 mg do ácido cítrico anidro em 50 mL da fase móvel.

As soluções amostra foram preparadas diluindo-as em fase móvel de modo a apresentarem concentrações no intervalo da curva analítica. Foi necessário um fator de

diluição de 10 para as amostras de solução CPD, CPDA e ACD-A, e um fator de 3,3 para solução ACD-B.

A análise cromatográfica foi realizada utilizando as condições apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Condições operacionais usadas para a separação e quantificação de citrato em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue

Parâmetros	Condições operacionais
Coluna cromatográfica	Shodex SH1011 (8 x 300 mm)
Temperatura do forno	40° C
Volume de injeção	20 µL
Comprimento de onda	230 nm
Fase móvel	Ácido sulfúrico 0,009 M
Fluxo	0,5 mL/min

2.1. Validação do método

Os critérios para determinação dos parâmetros de validação foram realizados de acordo com a Resolução RE nº 899 de maio de 2003 da Anvisa, e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008 de fevereiro de 2011.^{6,7}

Para este estudo, utilizou-se o padrão analítico secundário Sigma-Aldrich, por comparação com padrão de referência USP por inspeção visual e por doseamento através de curva analítica.

Os parâmetros de validação do método proposto foram estudados utilizando o padrão analítico secundário recém preparado no laboratório e com concentração determinada por padrão de referência da USP.

A linearidade foi avaliada pela construção de três curvas analíticas, contendo sete níveis de concentração de ácido cítrico, com injeções em triplicata assim como no trabalho de Cadalti et. al.⁸ para determinação do citrato utilizando a técnica de cromatografia com fase líquida utilizando colona de troca iônica. A avaliação dos

resultados foi feita utilizando a planilha desenvolvida por Souza & Junqueira⁹, que permitiu determinar o limite de quantificação e o limite de detecção através da avaliação dos resíduos e a relação entre o desvio padrão da curva analítica e sua inclinação (coeficientes angular e linear).

A especificidade 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 os diferentes tipos de soluções anticoagulantes (ACD-A, ACD-B, CPD e CPDA). Partes dessas soluções foram submetidas à autoclavação e todas as soluções e as amostras comerciais foram analisadas quanto à presença de interferentes e/ou produtos de degradação.

No estudo do efeito matriz foi comparada a curva analítica em fase móvel e em solução amostra. Foram aplicados o teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student), conforme recomendado pelo Inmetro.⁷

A exatidão do método foi avaliada pela

recuperação de uma quantidade conhecida do analito na amostra, segundo Horwitz.¹⁰

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 desvio padrão relativo (DPR).

Na precisão intermediária, realizada sob as mesmas condições cromatográficas da repetibilidade, alterou-se dois analistas, em dois dias diferentes e analisados em dois equipamentos diferentes. Os dados cromatográficos foram avaliados pelo DPR.

A robustez do método foi avaliada analisando seis replicatas do padrão de calibração com concentração 2,1 g/L, variando as seguintes condições experimentais: fase móvel (fluxo e composição), temperatura do forno, volume de injeção e coluna cromatográfica. Neste parâmetro, foi utilizado o teste de Youden descrito no artigo de César; Pianetti¹¹ para o cruzamento das alterações analíticas, admitindo ainda dois níveis de variações.

3. Resultados e Discussão

A solução CPD foi escolhida por representar o tipo de maior prevalência de análises realizadas no período selecionado (47,2% das amostras contendo solução anticoagulante e preservadora) obedecendo aos critérios: resultado satisfatório, integridade da amostra, prazo de validade e disponibilidade no setor.

Não foram detectadas diferenças na inspeção visual entre o padrão analítico secundário e o padrão USP. Os sinais cromatográficos obtidos para o padrão

secundário indicaram ausência de interferentes na região de determinação do analito e seu teor se apresentou dentro das especificações do fabricante (99,5 – 100,5%), permitindo a correção nos valores de concentração (teor 100,3%).

3.1. Validação analítica

A linearidade foi comprovada pela verificação da homocedasticidade, obtenção de regressão linear significativa, ausência de desvio de linearidade e comprovação da normalidade. O coeficiente de correlação obtido (0,9994) foi superior ao estabelecido pela Anvisa (0,99) e pelo Inmetro (0,90).^{6,7} A curva analítica utilizada na avaliação do citrato está representada na (Figura 3).

Assim como no estudo de Jastrzebska, et al.², que apesar de ter aplicado o método CITP-CITP (isotacoforese capilar duas dimensões) obteve um coeficiente de correlação de (0,9992) demonstrando também que a resposta linear foi superior ao determinada pela Anvisa e Inmetro comprovando a satisfatoriedade do método para determinar citrato na matriz da solução anticoagulante.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados, respectivamente, em: 0,0405 mg/mL e 0,120 mg/mL, apresentando-se inferior ao primeiro nível da curva analítica confirmando a sensibilidade do método.

Na avaliação da especificidade, a autoclavagem 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 ((±) 12 minutos) e constatando ausência de interferentes e/ou produtos de degradação na região de interesse.

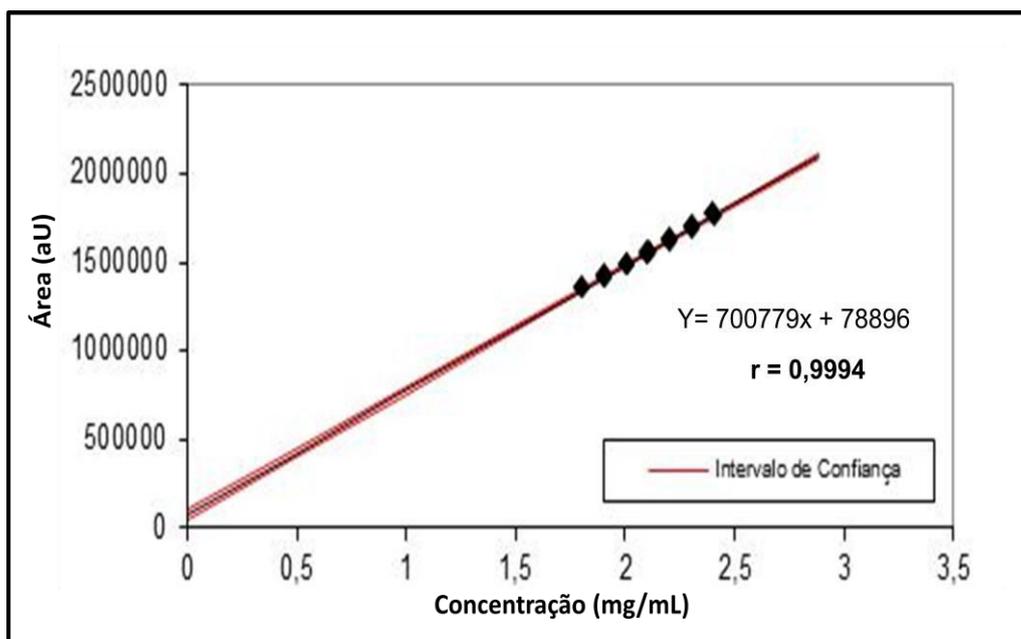


Figura 3. Representação gráfica da curva analítica de ácido cítrico resultante da avaliação da linearidade

Na avaliação do efeito matriz, assim como no experimento desenvolvido por Alves *et al.*¹³, os resultados indicaram a ausência de homogeneidade, na comparação das inclinações e interseções das duas curvas através do teste t para variâncias, o valor de t calculado se apresentou inferior ao valor de t tabelado (t crítico).

Os resultados da avaliação da exatidão pelo estudo da recuperação comumente utilizado em estudos de validação Roggia *et*

*al.*¹⁴ e Santos *et al.*¹⁵, (Tabela 1), apresentaram uma variação aceitável, com recuperação entre 97 a 103% para o nível de concentração.

Na precisão, obteve-se resultados aceitáveis como Souza *et al.*¹⁶ A avaliação da repetibilidade (Tabela 2) indicou DPR experimental de 0,34%, inferior ao limite estabelecido pela Anvisa (5%) e pelo Inmetro (2%).

Tabela 1. Resultados da avaliação de exatidão em termos do teor de recuperação

Padrão	Concentração esperada (mg/L)	Concentração adicionada (mg/L)	Recuperação (%)
A	1,9013	2,0014	96,7
B	2,0014	2,1015	98,1
C	2,1015	2,2016	110,5
D	2,2016	2,3017	99,0
E	2,3017	2,4018	100,1
F	2,4018	1,9013	99,1
Tendência			100,6

Tabela 2. Resultados da avaliação da repetibilidade em relação ao desvio padrão relativo

Parâmetro	Resultado obtido
Concentração mínima	20,3088
Concentração máxima	20,5518
Concentração média	20,3756
Desvio padrão (s)	0,0689
Limite de repetitividade (r)	0,4811
DPR	0,3381%

E no estudo da precisão intermediária (Tabela 3), a variabilidade de alguns parâmetros experimentais (analista, equipamento e dia de análise) indicou um DPR de 0,83%, também inferior de acordo com os critérios estabelecidos pela Anvisa (5%) e pelo Inmetro (4%).

Tabela 3. Resultados da avaliação da precisão intermediária em relação ao desvio padrão relativo

Parâmetro	Resultado obtido
Desvio padrão experimento 1	0,0427
Desvio padrão experimento 2	0,3119
Desvio padrão experimento 3	0,7476
Desvio padrão de precisão intermediária (Si)	0,1703
DPR	0,8255 %

A robustez do método foi comprovada como no estudo por Prestes *et al.*¹⁷; Mello; Barbosa¹⁸, avaliada pela adaptação do teste de Youden que indicou a influência das variações nos resultados finais.

Foi observado que todas as combinações se apresentaram resultados dentro dos critérios de eficiência de separação cromatográfica e os efeitos resultantes das combinações recomendados pela Anvisa. O

mesmo tipo de colunas cromatográficas com lotes diferentes, concentração ácida da fase móvel e a temperatura do forno foram os parâmetros instrumentais que mais influenciam na quantificação do analito, sendo observado valores de DPR inferiores a 2% em todas as combinações analíticas (Figura 4), comprovando a robustez do método estudado.

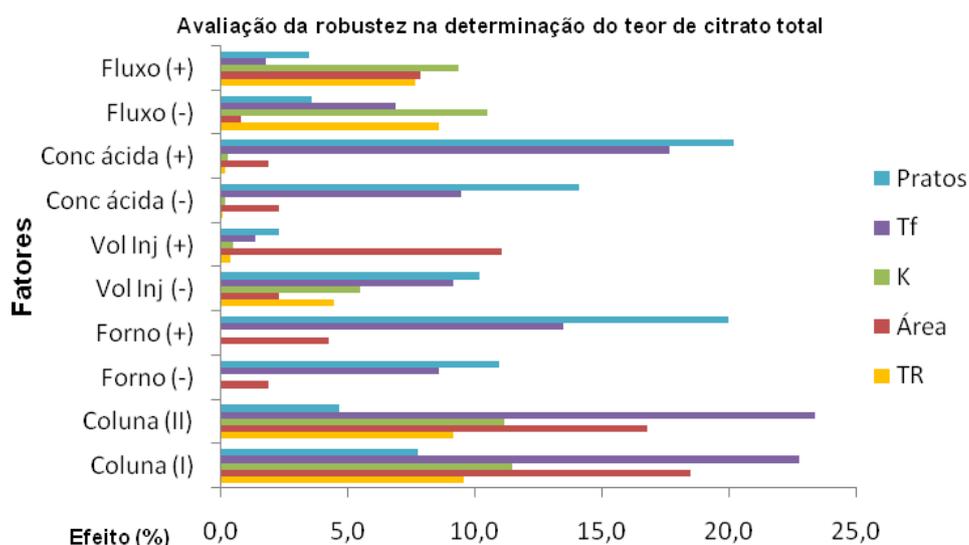


Figura 4. Representação gráfica dos resultados da avaliação da robustez em termos do efeito das variações das condições analíticas nos parâmetros de eficiência de separação e no tempo de retenção

4. Conclusão

Os resultados demonstrados comprovaram que o método proposto por CLAE-UV pode ser utilizado na determinação de citrato total, e que a validação analítica comprovou o desempenho de acordo com os critérios estabelecidos pela Anvisa e pelo Inmetro.

Dentre as diversas vantagens deste método sobre o preconizado na Portaria nº 950 de novembro de 1998 destaca-se o menor tempo e custo de análise. O método proposto apresentou-se adequado e eficiente a ser incorporado na rotina de controle de qualidade para determinação de citrato total em soluções anticoagulantes em bolsa de sangue.

Este estudo contribuiu para a discussão da revisão da Portaria nº 950 de 1998 junto à Anvisa e a inserção da metodologia estudada para determinação de citrato em solução anticoagulante presentes na bolsa de sangue na legislação vigente RDC N° 35 de junho de 2014.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e a parceria realizada com a Anvisa para este estudo.

Referências Bibliográficas

- Vale, R. F. D.; *Dissertação de Mestrado*, Fundação Oswaldo Cruz, 2011. [\[Link\]](#)
- Brasil. Ministério da saúde. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de outubro de 2001. [\[Link\]](#)
- Brasil. 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 União, Brasília, Seção 1, 16 de junho de 2014. [\[Link\]](#)
- Fust, A. M. B. S.; *Dissertação de Mestrado*, Fundação Oswaldo Cruz, 2011. [\[Link\]](#)

- ⁵ Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. [\[Link\]](#)
- ⁶ Brasil. Resolução 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 União, Brasília, Seção 1, 2 de junho de 2003. [\[Link\]](#)
- ⁷ Instituto Nacional de Metrologia. Orientações sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. (Rio de Janeiro: INMETRO, 2011). [\[Link\]](#)
- ⁸ Cadalti, T. R. I.; Angeloti, M.; D'Erchia, L.; Altieri, G.; Di Renzo G. C. Ion-exchange chromatographic analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey. *European Food Research & Technology* **2003**, *216*, 75. [\[CrossRef\]](#)
- ⁹ Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *552*, 25. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁰ Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method – performance studies. *Pure and Applied Chemistry* **1995**, *67*, 341. [\[CrossRef\]](#)
- ¹¹ César, I. C.; Pianetti; G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *45*, 235. [\[CrossRef\]](#)
- ¹² Jastrzebska, A.; Kurzawa, M.; Hrynczyszyn, P.; Szlyk, E. Determination of Benzoate, Sorbate, Citrate and Orthophosphate Ions in Beverage Samples Using Two-Dimensional Isotachophoretic Method. *Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *67*, 172. [\[CrossRef\]](#)
- ¹³ Alves, I. A. B. S.; Miranda, H. M.; Barbosa, A. P.; Randau, K. P.; Soares, L. A. L. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por espectrofotometria no visível para quantificação de taninos totais na casca do caule de *Simarouba amara* Aubl. *Árvore* **2015**, *39*, 37. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁴ Roggia, I.; Ferrony, D.; Alves, M. P.; Laporta, L. V.; Friedrich, M.; Santos, M. R.; Rubim, A.; Peixoto, S. C.; Paese, K. Validação da metodologia analítica para determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química. *Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2014**, *35*, 223. [\[Link\]](#)
- ¹⁵ 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. *Química Nova* **2014**, *37*, 540. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁶ Souza, S. J.; Kaufmann, K. C.; Souza, M. F.; Feriberger, E. B.; Araújo, P. H. H.; Gonçalves, O. H.; Leimann, F. V. *Resumos do 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*. Campinas, Brasil, 2015. [\[Link\]](#)
- ¹⁷ Prestes; O., D.; Presta, M. A.; Kolberg, D. I. S.; Zanella, R.; Rossato, S. B.; Penna, N. G.; Hecktheuer, L. H. R. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Química Nova* **2007**, *30*, 18. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Mello, M. R. P. A.; Barbosa J. Confiabilidade dos resultados analíticos no monitoramento do teor de iodo em sal para o consumo humano - Validação da metodologia e incerteza de medição. *Visa em Debate* **2015**, *3*, 65. [\[CrossRef\]](#)