

## Artigo

## Otimização e Validação da Metodologia para a Determinação de 5-Hidroximetilfurfural em Soluções Anticoagulantes e Preservadoras de Bolsas de Sangue por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Freitas, M. N. M.;\* Vale, R. F. D.; Fust, A. M. B. F.; Fernandes, F. S.; Feitoza-Silva, M.; Leandro, K. C.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (3), 665-677. Data de publicação na Web: 17 de fevereiro de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

### Optimization and Validation of the Methodology for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural on Anticoagulants Solutions and Preservers of Bags of Blood by Liquid Chromatography High Efficiency

**Abstract:** Anticoagulant and preserving solutions are designed to maintain the viability of blood and blood components. Plastic bags used for human blood storage are classified as Class III product for health. The RDC No. 35 of June 12, 2014 is the legislation that describes the quality control of blood units in Brazil. According to the resolution of the physical and chemical tests to be performed on anticoagulants solutions is the determination of 5-hydroxymethylfurfural content (5-HMF), a highly toxic pollutant formed by thermal decomposition of glucose present in the solutions, which may lead the patient even to death, justifying the need for their control. This work aimed to optimize and validate the methodology for determining the 5-HMF as recommended by ANVISA and the Inmetro. The parameters analyzed in the analytical validation were: specificity, linearity, detection limit, quantification limit, accuracy, precision and robustness. The results showed that the method is very effective for determining the 5-hydroxymethylfurfural which culminated in their integration into technical regulations published in June 2014.

**Keywords:** Analytical validation; liquid chromatography; quality control.

### Resumo

As soluções anticoagulantes e preservadoras têm o objetivo de manter a viabilidade do sangue e seus componentes. As bolsas plásticas utilizadas para armazenamento de sangue humano são classificadas como produto para saúde de classe III. A RDC nº 35 de 12 de junho de 2014 é a legislação que descreve o controle de qualidade das bolsas de sangue no Brasil. De acordo com esta resolução um dos ensaios físico-químicos que devem ser realizados em soluções anticoagulantes é a determinação do teor de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), um contaminante altamente tóxico formado pela decomposição térmica da glicose presente nas soluções, podendo levar o paciente até mesmo ao óbito, justificando a necessidade de seu controle. Este trabalho teve o objetivo de otimizar e validar a metodologia para determinação do 5-HMF conforme preconizado pela Anvisa e o Inmetro. Os parâmetros analisados na validação analítica foram: especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez. Os resultados encontrados comprovaram que o método é bastante eficaz para a determinação do 5-hidroximetilfurfural o que culminou com a sua inserção no regulamento técnico publicado em junho de 2014.

**Palavras-chave:** Validação analítica; cromatografia líquida; controle de qualidade.

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

✉ [mary.freitas@incqs.fiocruz.br](mailto:mary.freitas@incqs.fiocruz.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20160050](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160050)

## Otimização e Validação da Metodologia para a Determinação de 5-Hidroximetilfurfural em Soluções Anticoagulantes e Preservadoras de Bolsas de Sangue por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Mary Nei M. Freitas,\* Renata F. D. Vale, Anna Maria B. S. Fust, Fernanda S. Fernandes, Michele F. Silva, Kátia C. Leandro

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

\* [mary.freitas@incqs.fiocruz.br](mailto:mary.freitas@incqs.fiocruz.br)

*Recebido em 15 de maio de 2015. Aceito para publicação em 16 de fevereiro de 2016*

### 1. Introdução

### 2. Parte experimental

- 2.1. Equipamentos, materiais e amostragem
- 2.2. Preparo das amostras
- 2.3. Preparo da fase móvel
- 2.4. Preparo da curva analítica
- 2.5. Condições cromatográficas utilizadas nos experimentos
- 2.6. Otimização da metodologia
- 2.7. Estudo da cinética de degradação
- 2.8. Validação analítica

### 3. Resultados e Discussão

- 3.1. Otimização da metodologia
- 3.2. Estudo da cinética de degradação
- 3.3. Validação analítica

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

As soluções anticoagulantes e preservadoras presente em bolsas plásticas permitem manter a viabilidade do sangue e seus componentes durante o processo de

armazenamento, possibilitam a conservação do metabolismo energético das células sanguíneas e a prevenção de degradações físicas que são danosas a sua função.<sup>1</sup>

As bolsas de sangue utilizadas para a coleta e armazenamento do sangue humano são flexíveis, o que facilita seu

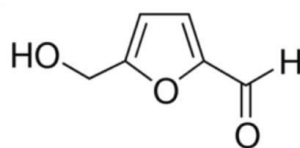
acondicionamento em centrifugas, além de serem transparentes, auxiliando na visualização dos componentes sanguíneos, são resistentes e apirogênicas, e devem se apresentar isentas de toxicidade.<sup>2</sup>

As bolsas de sangue estão classificadas de acordo com a sua alta complexidade como produto para saúde de Risco III, e são definidas como um produto destinado a coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e seus componentes.<sup>2,3</sup>

A Portaria Interministerial nº 03, de 01 de julho de 1988, foi o primeiro regulamento técnico para o controle de qualidade das bolsas de sangue no Brasil e esteve relacionada com as principais normas técnicas internacionais e compêndios oficiais. De acordo com essa legislação, o controle de qualidade das bolsas de sangue deve ser realizado pela avaliação de aspectos gerais e aspectos específicos, por meio de ensaios biológicos físicos e físico-químicos.

Recentemente, a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 35, de 12 de junho de 2014, reafirmou necessidade dos testes baseando-se principalmente em estudos metodológicos otimizados, desenvolvidos e validados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

A determinação do teor 5-hidroxiacetilfurfural (figura 1) presente nas soluções anticoagulantes e preservadoras está descrito entre os ensaios físico-químicos a serem realizados.<sup>4,5</sup> Essa substância é formada pela degradação térmica da glicose. É considerada um dos principais produtos de degradação, apresentando um elevado grau de toxicidade quando presentes em soluções injetáveis, podendo provocar febre e até mesmo óbito do paciente conforme concentração em que se encontra, sendo assim seu monitoramento de suma importância.<sup>6</sup>



**Figura 1.** Estrutura química do 5- hidroximetilfurfural

Além do ensaio realizado por cromatografia de alta eficiência a RDC 35/2014 descreve como metodologia a ser usada para determinação do 5- HMF o ensaio de espectrofotometria de acordo com o que está descrito na farmacopeia europeia, porém este não é tão eficiente quanto a cromatografia já que precisa de uma concentração maior do contaminante para que este seja detectado.<sup>5</sup> Na literatura foram encontrados para a determinação do 5-hidroxiacetilfurfural somente ensaios realizados de contaminantes do mel de abelha.<sup>11,12</sup>

O 5-HMF é considerado um importante marcador químico para a análise de contaminação de alimentos, como o leite por

exemplo.<sup>13</sup> O HPLC é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de 5-HMF como contaminante por se tratar de uma técnica de alta confiabilidade e apresentando bons limites de detecção.<sup>14,15</sup> O que é muito importante para o controle de qualidade de bolsas plásticas e as soluções anticoagulantes já que os níveis permitidos são extremamente pequenos.

Os níveis máximos permitidos em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue não devem ultrapassar 5 mg. L<sup>-1</sup> para soluções contendo adenina, citrato e glicose (ACD-A), citrato, fosfato e glicose (CPD), citrato, fosfato, glicose e adenina (CPDA) e adenina, citrato, glicose e manitol (SAG-M 2) e, 3 mg. L<sup>-1</sup> em soluções contendo adenina,

citrato e glicose (ACD-B) e adenina, citrato, glicose e manitol (SAG-M 1).<sup>3</sup>

Como os níveis permitidos de 5-hidroximetilfurfural são extremamente pequenos, para que haja a produção de resultados confiáveis é necessária uma comprovação da eficiência técnica do método estudado através da otimização da metodologia para uma melhor separação cromatográfica e da avaliação dos parâmetros de validação.<sup>7</sup>

A separação cromatográfica pode ser otimizada através da realização de variações nas condições analíticas, até que a eficiência na separação seja alcançada, com um menor tempo de análise e consumo mínimo de fase móvel.<sup>8</sup>

Conceitualmente, a validação analítica consiste em confirmar através de testes e evidências objetivas que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.<sup>7</sup> Atualmente, os critérios para a realização da validação analítica estão estabelecidos pela Anvisa, na resolução específica RE nº 899, de 29 de maio de 2003, e pelo Inmetro no Guia Orientativo de 2011 (orientação sobre validação de métodos analíticos), este último se apresentando sempre em constantes atualizações.<sup>9,10</sup> A ABNT ISO/IEC 17025 estabelece que é necessária a realização da validação analítica para que um método seja considerado confiável.<sup>7</sup>

Os parâmetros a serem analisados na validação analítica variam de acordo com a finalidade do método a ser estudado e, conforme especificado pela Anvisa e pelo Inmetro, são: especificidade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.<sup>9,10</sup>

## 2. Parte experimental

### 2.1. Equipamentos, materiais e amostragem

Os equipamentos e materiais utilizados na realização desta validação estavam todos calibrados e dentro das condições ideais de análise.

Foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de radiação ultravioleta (200 – 400 nm) Shimadzu Prominence, balança analítica AG204 Metler Toledo, banho de ultrassom 3210 Branson, Bomba de vácuo 75.301-00 Cole-ParmerInstrumentCo, Refrigerador Duplex Frostfree 470 continental, Capela de exaustão (1) Engelab, Sistema de obtenção de água tipo Milli-Q-A-10 Millipore. Metanol para CLAE J.T.Baker (lote L18C13) e padrão de 5-HMF Sigma Aldrich.

As amostras utilizadas foram selecionadas através do Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA), onde foi escolhida a amostra já analisada no INCQS que apresentou maior concentração de 5-HMF. Foi selecionada a amostra ACD 1505 / 2011 armazenada em condições adequadas.

### 2.2. Preparo das amostras

A amostra utilizada foi a solução anticoagulante do tipo ACD-A de bolsa de sangue filtrada em membrana de 0,45µm e analisada no cromatógrafo líquido de alta eficiência, sem a necessidade de diluição.

### 2.3. Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada a partir da diluição de 50 mL de metanol em 1000 mL de água Tipo I (concentração de 5% de metanol). Posteriormente a solução foi filtrada a vácuo em membrana de 0,22 µm, e degaseificada em ultrassom.

### 2.4. Preparo da curva analítica

A curva analítica foi preparada a partir da

diluição aproximada de 66 mg de padrão de 5-HMF em metanol em balão volumétrico de 50 mL (solução mãe). Desta solução mãe foi retirada uma alíquota de 2 mL que foi diluída com fase móvel em balão volumétrico de 50 mL (solução estoque). Da solução estoque foram retiradas alíquotas de 0,5 a 10 mL que foram diluídas com a fase móvel em balões volumétricos para obtenção de sete diferentes níveis de concentração: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0 e 10,0 mg.L<sup>-1</sup>.

### 2.5. Condições cromatográficas utilizadas nos experimentos

O método foi realizado nas seguintes condições cromatográficas: o equipamento utilizado foi o cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence com detector de radiação ultravioleta (200 – 400 nm), o comprimento de onda de 280 nm. A

coluna cromatográfica utilizada foi a RP18 (5 µm), fabricante Merck Hibar; a temperatura do forno foi de 40 °C e volume de injeção, 20 µL. A composição da fase móvel, como descrito antes, foi de 5% de metanol e 95% de água, e o fluxo da fase móvel de 0,5 mL/min. Para o ajuste do pH da fase móvel utilizou-se ácido ortofosfórico concentrado.

### 2.6. Otimização da metodologia

Para a realização da otimização da metodologia foram realizadas nove combinações nas variações dos parâmetros analíticos. As variações foram realizadas nos seguintes parâmetros: temperatura do forno, a temperatura da célula do detector, composição e fluxo da fase móvel e comprimento de onda, e as combinações podem ser vistas na tabela 1.

**Tabela 1.** Combinações nas variações dos parâmetros analíticos

Parâmetro / Experimento	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Composição FM	MeOH 5%	MeOH 10% pH 2,9	MeOH 10% pH 2,9	MeOH 5%	MeOH 10% pH 2,9	MeOH 10% pH 2,9	MeOH 10% pH 2,9	MeOH 5%	MeOH 5%
Fluxo de FM	0,6 mL/min	1,0 mL/min	0,5 mL/min	0,5 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min	0,6 mL/min	1,0 mL/min	0,6 mL/min
Temp. do Forno	40 °C	30 °C	40 °C	40 °C	30 °C	30 °C	40 °C	40 °C	30 °C
Temp. cél. do detector.	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C	40 °C	30 °C	40 °C	40 °C	30 °C
Comprimento de onda	280 nm	284 nm	284 nm	280 nm	284 nm	284 nm	284 nm	280 nm	280 nm

### 2.7. Estudo da cinética de degradação

No estudo da cinética de degradação foi preparada uma solução mãe com 67,7 mg de padrão de 5-HMF diluído em balão de 50 mL com metanol para CLAE. Uma alíquota de 2

mL desta solução mãe foi diluído em balão de 50 mL com fase móvel, para o preparo da solução estoque. Em seguida 3 mL da solução estoque foram diluídos com fase móvel em um balão volumétrico de 50 mL. Foram realizadas injeções deste padrão e da amostra nas condições analíticas durante 3

dias consecutivos (6 injeções/dia) para avaliação da possível degradação.

## 2.8. Validação analítica

### 2.8.1. Especificidade

Para a realização do ensaio da especificidade foi preparada uma solução de 200 mL contendo glicose, ácido cítrico e citrato de sódio, simulando uma solução ACD-A. A bolsa de sangue foi preenchida com aproximadamente 63 mL desta solução e foi autoclavada por 30 minutos a uma temperatura de 110 °C para simular o processo industrial.

Em seguida foram analisadas por cromatografia de alta eficiência (CLAE), nas condições da metodologia em estudo, as amostras preparadas em laboratório antes e depois de serem autoclavadas, e a amostra da solução anticoagulante do tipo ACD-A presente na bolsa de sangue (utilizada na validação analítica).

### 2.8.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Na avaliação da linearidade foram preparadas três curvas analíticas, onde se admitiu, em cada uma, sete níveis de concentração que variavam de 0,5 a 10 mg.L<sup>-1</sup>. Foram realizadas injeções em triplicata de cada um dos níveis da curva analítica.

No tratamento dos dados obtidos foram utilizadas ferramentas estatísticas relacionadas na planilha de avaliação de linearidade de Souza & Junqueira (2005) que permitiu a determinação dos limites de detecção e quantificação baseados no intervalo de confiança da curva analítica.

### 2.8.3. Exatidão

A exatidão foi realizada através do método de determinação da recuperação, onde a amostra utilizada foi quantificada a partir de uma curva analítica de sete níveis de concentração e análise de dez injeções repetidas da amostra. Este ensaio consiste em determinar a quantidade de analito que foi recuperado em relação à quantidade teórica presente na amostra.

Os sinais foram avaliados quanto à recuperação em cada nível de concentração, utilizando a equação: Recuperação (%) =  $(C_1 - C_2 / C_3) \times 10$ , onde:

C1 = Concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = Concentração do analito na amostra não fortificada;

C3 = Concentração teórica do analito fortificado.

### 2.8.4. Precisão

A avaliação da precisão foi realizada com base desvio padrão relativo (DPR) e incluiu a avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

#### 2.8.4.1. Repetitividade

Para avaliação da repetitividade foram analisadas, no equipamento CLAE, 20 injeções da amostra, quantificadas pela curva analítica preparada no mesmo dia por um único analista.

#### 2.8.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada utilizando a mesma amostra e mesmo procedimento da repetitividade, porém

foram realizadas alterações no dia de análise, analista devidamente treinado na técnica e cromatógrafo qualificado, ou seja, foi avaliada a precisão interdias.

### 2.8.5. Robustez

A robustez foi avaliada pela utilização do teste de Youden, e para isso foram realizados 16 experimentos divididos em dois níveis (superior e inferior) com variações nos parâmetros que poderiam alterar o resultado.

As variações realizadas foram feitas na: coluna cromatográfica, temperatura do forno, volume de injeção, na concentração de metanol da fase móvel e no comprimento de onda. Os resultados foram avaliados em função dos efeitos (%) na eficiência de

separação analítica.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Otimização da metodologia

Todas as combinações realizadas na otimização apresentaram resultados satisfatórios nos parâmetros de separação cromatográfica conforme a tabela 2, porém a combinação que correspondeu ao experimento de número 4 foi a que apresentou melhor eficiência na separação cromatográfica. Esta apresentou melhor fator de assimetria (1,093), segundo maior número de pratos teóricos e fator de retenção próximo a 5.

**Tabela 2.** Resultados nas variações dos parâmetros analíticos

Parâmetros de conformidade	Experimentos								
	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Tempo de retenção (Tr, min)	16,8	7,0	13,8	17,6	7,0	7,0	11,5	9,4	18,0
Fator de separação (K)	4,789	2,132	2,125	4,786	2,172	2,178	2,107	5,696	7,182
Fator de assimetria (Tf)	1,138	1,166	1,177	1,093	1,185	1,184	1,192	1,132	1,146
Número de pratos teóricos (N)	14029	11076	15441	14726	10958	10758	14510	13764	12104

### 3.2. Estudo da cinética de degradação

Com base na observação da variação de área das bandas cromatográficas durante o

período do estudo, verificou-se uma pequena degradação, mais expressiva no padrão (figura 2), porém inferior a 1,5%.



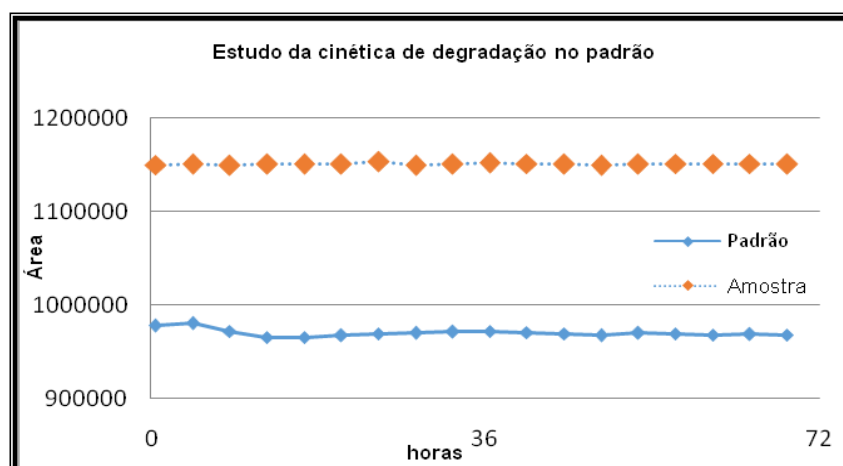


Figura 2. Gráfico de cinética de degradação

### 3.3. Validação analítica

#### 3.3.1. Especificidade

Os resultados obtidos na cromatografia foram avaliados e permitiram observar semelhanças entre a amostra simulada antes do processo de autoclavação (figura 3) e a

amostra simulada após a autoclavação (figura 4) e a amostra da solução ACD-A presente na bolsa de sangue, autoclavada no processo industrial (figura 5) com a formação do 5-HMF após o processo de autoclavação, além da visualização somente do analito na região de interesse, com tempo de retenção de aproximadamente 19,3 min. Os demais sinais são apenas da matriz.

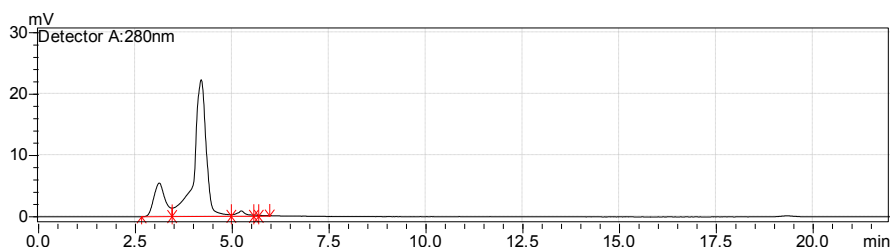


Figura 3. Cromatograma da amostra simulada antes da autoclavação

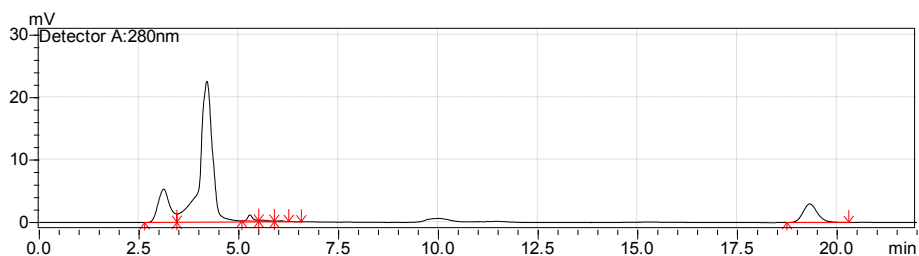
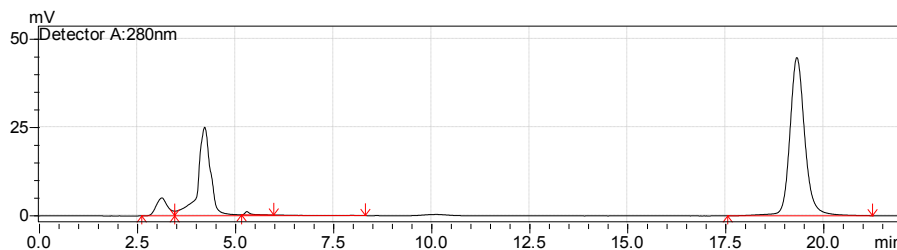


Figura 4. Cromatograma da amostra simulada depois da autoclavação





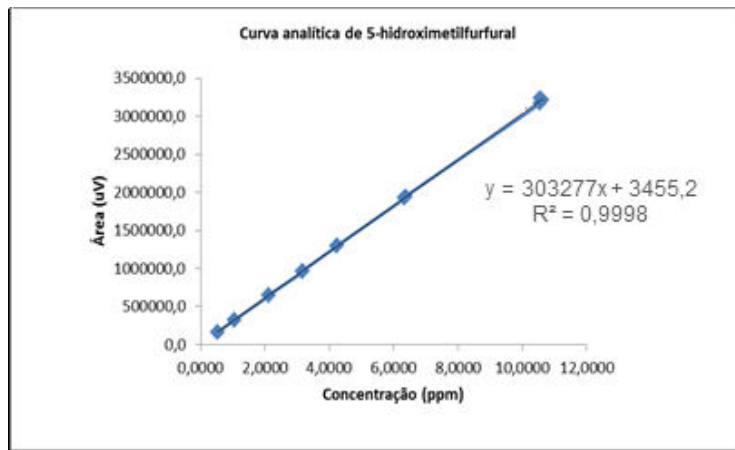
**Figura 5.** Cromatograma obtido da amostra da solução ACD-A presente na bolsa de sangue

### 3.3.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade indicaram satisfatoriedade em todos os testes estatísticos realizados com base na planilha proposta por Souza e Junqueira.<sup>16</sup> De acordo com os testes realizados, foi observado um coeficiente de correlação de 0,9998, um limite de detecção de 0,0984 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e um limite de quantificação de 0,295 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e ausência de valores extremos. Os resíduos se

apresentaram sob distribuição normal, a variabilidade de resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração demonstrou homoscedasticidade, e a independência dos resíduos da regressão foi comprovada.

Na análise do gráfico de resíduos foi observado que o último nível se apresentou disperso, porém isto não comprometeu a avaliação. A regressão realizada foi significativa e não se verificou desvio na linearidade (figura 6).



**Figura 6.** Curva analítica da linearidade

### 3.3.3. Exatidão

A recuperação apresentou resultados dentro do limite que é estabelecido por Horwitz,<sup>17</sup> como se pode observar na tabela

3. Os resultados obtidos se apresentaram um pouco divergentes em relação ao teor da amostra, pois nesta etapa da validação se utilizou uma nova unidade, de mesmo lote da amostra armazenada sob condição de estresse.

**Tabela 3.** Resultados da avaliação da exatidão

Avaliação da Tendência para Furfural	
Padrão	Recuperação %
B	96,7
C	94,3
D	99,7
E	99,4
F	99,8
G	99,8
<b>Recuperação Total</b>	<b>98,3</b>

## 3.3.4. Precisão

mostrou-se de acordo com a recomendação da Anvisa,<sup>9</sup> com valor de 5%, e do Inmetro,<sup>10</sup> que é um valor de DPR de 16% para a concentração utilizada, como observa-se na tabela 4.

## 3.3.4.1. Repetitividade

O desvio padrão relativo (DPR) das análises para avaliação da repetitividade

**Tabela 4.** Resultados da repetibilidade

Parâmetro	Resultado
Concentração mínima (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,8277
Concentração máxima (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,8620
Concentração Média	3,8415
S (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,0100
DPR	0,2602

## 3.3.4.2. Precisão intermediária:

encontrava de acordo com o que é recomendado, assim como na repetitividade inferior a 5% para a Anvisa,<sup>9</sup> e 16% para o Inmetro,<sup>10</sup> conforme tabela 5.

Após o término da análise da precisão interdiária, verificou-se que o DPR também se

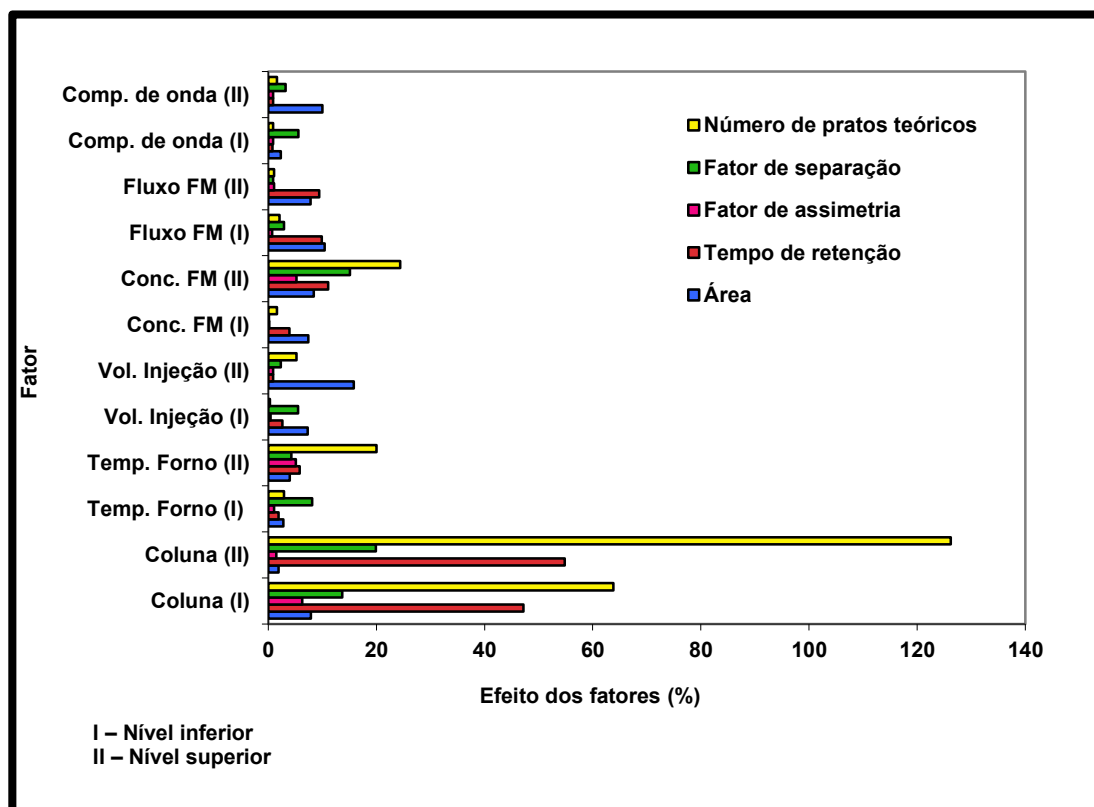
**Tabela 5.** Resultados da precisão intermediária

Parâmetros	Resultados
Si(o,i)	0,046615826
Concentração Mínima (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,7479
Concentração Máxima (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,9471
Concentração Média (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,8446
DPR	1,212506645

3.3.5. Robustez

Os resultados encontrados demonstraram satisfatoriedade em todos os parâmetros de eficiência de separação cromatográfica. Os efeitos de cada combinação estão

representados na figura 7, se apresentando mais evidente na variação do fator coluna cromatográfica e no resultado número de pratos teóricos. Em outras palavras, o método apresenta maiores variações de resposta quando há variação da coluna cromatográfica.



**Figura 7.** Resultados da robustez

## 4. Conclusão

A metodologia proposta para a determinação do teor de 5-hidroximetilfurfural é considerada eficaz pois apresentou resultados favoráveis. A metodologia foi otimizada, sendo possível determinar parâmetros considerados ideais para a análise e apresentou uma cinética de degradação inferior a 1,5% da amostra no período de estudo. Na validação analítica a curva analítica apresentou desvios, mas dentro da faixa aceitável pelos órgãos reguladores, a variação dos resíduos demonstrou homocedasticidade, e a linearidade do método foi atestada pelo coeficiente de correlação de 0,9998. O método apresentou uma recuperação de 98,3% em relação a quantidade teórica de analito, além de apresentar DPR de 0,26%, para a repetitividade, e DPR de 1,21%, para a precisão intermediária.

Após a avaliação dos resultados foi possível concluir que a metodologia estudada está devidamente apta para o fim a qual se destina, estando de acordo com todos os requisitos determinados tanto pela Anvisa quanto pelo Inmetro. Pode, desta forma, ser utilizada na análise de soluções anticoagulantes e preservadoras de bolsas de sangue, e conseqüentemente no controle de qualidade desse produto, reduzindo o risco à saúde.

### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva, *Programa Qualidade do sangue*. Brasília: Ministério da Saúde, dezembro de 2000. [Link]
- <sup>2</sup> Associação Brasileira de Normas Técnicas, *NBR ISO 3826-1*. ABNT: Rio de Janeiro, 2003.
- <sup>3</sup> Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 9, de 21 de abril de 1999. Disponível em: <[http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/vigil\\_s/ANVS\\_RES9\\_99vigil\\_s.doc](http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/vigil_s/ANVS_RES9_99vigil_s.doc)>. Acesso em: 2 novembro 2014.
- <sup>4</sup> Brasil. Ministérios da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998. Disponível em: <[http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/p\\_s/ps17.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/p_s/ps17.pdf)>. Acesso em: 30 outubro 2014.
- <sup>5</sup> Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 35, de 12 de junho de 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9792d7004464d4f68d75ed6f5f8f405d3/rdco035\\_12\\_06\\_2014.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9792d7004464d4f68d75ed6f5f8f405d3/rdco035_12_06_2014.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 30 outubro 2014.
- <sup>6</sup> Xu, H.; Templeton, A. C.; Reed, R. A. Quantification of 5-HMF and dextrose in commercial aqueous dextrose solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, *32*, 451. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>7</sup> Associação Brasileira de Normas Técnicas, *NBR ISO/IEC 17025*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.
- <sup>8</sup> Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5a ed., Bookman: São Paulo, 2002.
- <sup>9</sup> Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/86507473/RE-899-2003-Validacao>>. Acesso em: 30 de outubro 2014.
- <sup>10</sup> Instituto Nacional de Metrologia, *Orientações sobre validação de métodos analíticos*. INMETRO: Rio de Janeiro, 2011.
- <sup>11</sup> Silva, S. J. N.; Schuch, P. Z.; Vainstein, M. H.; Jablonski, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínica capilar micelar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 46. [CrossRef]
- <sup>12</sup> Melo, Z. F. N.; Duarte, M. E. M.; Mata, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* **2003**, *5*, 89. [Link]
- <sup>13</sup> Neves, L. N. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015. [Link]
- <sup>14</sup> Santos, A. F.; Ribeiro, C. A.; Polese, L.; Ernandes, J. R.; Kessleringh, S. M.; Nonato,

R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. *Eclética Química* **2006**, *31*, 13. [[CrossRef](#)]

<sup>15</sup> Silva, J. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, 2014. [[Link](#)]

<sup>16</sup> Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *552*, 25. [[CrossRef](#)]

<sup>17</sup> Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method – performance studies. *Pure and Applied Chemistry* **1995**, *67*, 331. [[Link](#)]