

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE CONCENTRADOS  
POLIELETROLÍTICOS PARA HEMODIÁLISE POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

FLÁVIA ESCOUTO SCHWARTZHAUPT

Porto Alegre, 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE CONCENTRADOS  
POLIELETROLÍTICOS PARA HEMODIÁLISE POR ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

Dissertação apresentada por Flávia Escoto  
Schwartzhaupt para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez

Coorientadora: Prof. Dra. Morgana Bazzan Dessuy

Porto Alegre, 2023

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28/06/2023, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim

Universidade Federal do Pampa

Profa. Dra. Lisia Maria Gobbo dos Santos

Fundação Oswaldo Cruz

#### CIP - Catalogação na Publicação

Escouto Schwartzhaupt, Flávia  
Desenvolvimento de método para análise de  
concentrados polieletrólíticos para hemodiálise por  
espectrometria atômica / Flávia Escouto  
Schwartzhaupt. -- 2023.

104 f.

Orientador: Andreas Sebastian Loureiro Mendez.

Coorientadora: Morgana Bazzan Dessuy.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2023.

1. Validação analítica. 2. Concentrados  
polieletrólíticos para hemodiálise. 3. Planejamento de  
experimentos. 4. Espectrometria atômica. I. Sebastian  
Loureiro Mendez, Andreas, orient. II. Bazzan Dessuy,  
Morgana, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Traços do Instituto de Química com o suporte do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico da Faculdade de Farmácia, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, por todo o apoio, incentivo e compreensão mesmo nos momentos de ausência.

Ao Professor Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez, pela orientação, incentivo e confiança para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Morgana Bazzan Dessuy, pela oportunidade de realizar o estudo nos laboratórios do Instituto de Química, pela sua contribuição e orientação, que foram essenciais na condução deste trabalho.

Ao Dr. Leandro Kolling, pela sua imprescindível ajuda e paciência na condução dos experimentos e na discussão dos resultados.

Ao Dr. Wiliam Boschetti, pela ajuda e por ter contribuído para o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas do Grupo de Análise de Traços, pela ajuda e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade.

A todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho.



## RESUMO

A doença renal crônica é uma patologia caracterizada por uma lesão renal com perda progressiva e irreversível das funções dos rins, e é considerada um problema de saúde pública. A hemodiálise é um dos métodos dialíticos mais empregados na terapia renal substitutiva e durante as sessões são utilizadas soluções de diálise compostas por concentrados polieletrólíticos e água purificada. No presente trabalho, foi desenvolvido e validado um método analítico multielementar sequencial por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua por chama para quantificar os eletrólitos no produto farmacêutico. O método foi desenvolvido empregando ferramentas de planejamento de experimentos. Um planejamento fatorial completo em dois níveis foi utilizado como um estudo de triagem. A combinação da Matriz de Doehlert com a função desejabilidade foi empregada para estabelecer uma condição compromisso na otimização das variáveis significativas estudadas. O método foi validado e a seletividade evidenciou que o método é capaz de quantificar os analitos inequivocamente, mesmo na presença dos demais componentes da matriz. Faixas lineares foram estabelecidas para cada analito (25 – 130 mgL<sup>-1</sup> para Na, de 1,0 – 5,0 mgL<sup>-1</sup> para K e Ca e de 0,30 – 0,70 mgL<sup>-1</sup> para Mg) e não foram observados desvios no modelo linear. A homocedasticidade dos dados foi confirmada através do Teste de Cochran e a ANOVA indicou que o coeficiente angular é estatisticamente diferente de zero. A metodologia demonstrou ser precisa (RSD inferior a 2,7%) e exata (média de recuperação de 103,0% para Na, 100,5% para K, 101,3% para Ca e 101,5% para Mg). A robustez foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo e os resultados demonstraram não haver diferença significativa na determinação dos analitos. O método descrito nesse trabalho cumpriu com os requisitos preconizados tanto pela RDC nº 166/2017 da ANVISA, como também pelo Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do ICH, demonstrando-se adequado para a quantificação de sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de soluções para hemodiálise. O método desenvolvido foi comparado com a metodologia de referência da Farmacopeia Europeia, não havendo diferença significativa nos resultados obtidos ( $p > 0,05$ ).

**Palavras-chave:** controle de qualidade; concentrado polieletrólítico; determinação multielementar; HR-CS FAAS; validação analítica.



## ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a pathology characterized by kidney damage with progressive and irreversible loss of kidney function and it is considered a public health problem. Hemodialysis is one of the most used dialysis methods in renal replacement therapy and during the sessions hemodialysis solutions and purified water are used. In this work, a sequential multielement analytical method by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS) was developed and validated to quantify the analytes in the pharmaceutical product. The method was developed using Design of Experiments (DOE). A two-level full factorial design was performed as a screening study. The combination of the Doehlert Matrix with the desirability function was used to establish a compromise condition in the optimization of the significant variables studied, including acetylene flow rate, burner height and lanthanum and cesium concentration. The method described in this work was validated and the selectivity showed that the method is able to unequivocally determine the analytes, even in the presence of the other components of the matrix. Linear ranges were established for each analyte (25 – 130 mgL<sup>-1</sup> for Na, 1.0 – 5.0 mgL<sup>-1</sup> for K and Ca and 0.30 – 0.70 mgL<sup>-1</sup> for Mg) and no deviations were observed in the linear model. The homoscedasticity of the data was confirmed through the Cochran Test and the ANOVA indicated that the slope is statistically different from zero. The methodology proved to be precise (RSD lower than 2.7%) and accurate (mean analyte recovery between 96.7% and 104.2%). Robustness was assessed using a two-level full factorial design and the results showed no significant difference in analyte determination. The method described in this work complied with the requirements established by the normative base, demonstrating to be suitable for the quantification of sodium, potassium, calcium and magnesium in samples of hemodialysis solutions. The developed method was compared with the European Pharmacopoeia reference methodology, with no significant difference in the obtained results ( $p > 0.05$ ).

**Keywords:** analytical validation; hemodialysis solution; HR-CS FAAS; multielement determination; quality control.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Representação esquemática dos principais componentes da hemodiálise (adaptado de CHAN et al., 2013) .....	36
<b>Figura 3.2.</b> Representação esquemática dos principais componentes de um LS AAS. TFM: Tubo fotomultiplicador (Fonte: SKOOG et al., 2008) .....	46
<b>Figura 3.3.</b> Representação esquemática dos principais componentes de um HR-CS AAS. No esquema estão representados os seguintes componentes: (1) lâmpada de arco curto de xenônio; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabólicos; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede <i>echelle</i> e (9) detector CCD (Adaptado de BORGES et al., 2005). .....	47



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Faixas de concentrações usuais do CPHD (adaptado de SALBEGO, 2018).....	37
<b>Tabela 3.2.</b> Parâmetros avaliados de acordo com a finalidade do teste (adaptado de BRASIL, 2017a; ICH, 2005). ....	42



## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> )
AES	Espectrometria de emissão atômica (do inglês <i>Atomic Emission Spectrometry</i> )
AFS	Espectrometria de fluorescência atômica (do inglês <i>Atomic Fluorescence Spectrometry</i> )
$A_{int}$	Absorbância integrada
ANOVA	Análise de variância (do inglês <i>Analysis of Variance</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês <i>Charge-Coupled Device</i> )
CKD	Doença renal crônica (do inglês <i>Chronic kidney disease</i> )
Co	Concentração característica
CP	Pixel central (do inglês <i>Center pixel</i> )
CPHD	Concentrado polieletrólítico para hemodiálise
CQ	Controle de qualidade
DOE	Planejamento de experimentos (do inglês <i>Design of Experiments</i> )
DPR	Desvio padrão relativo
DRC	Doença renal crônica
GMP	Boas Práticas de Fabricação (do inglês <i>Good Manufacturing Practices</i> )
HCL	Lâmpada de cátodo oco (do inglês <i>Hollow Cathode Lamp</i> )
HR-CS AAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do inglês <i>High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
HR-CS FAAS	Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e chama (do inglês <i>High-Resolution Continuum Source Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> )
ICH	Conselho Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (do inglês <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> ).
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> )
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i> )

LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i> )
LS AAS	Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (do inglês <i>Line Source Atomic Absorption Spectrometry</i> )
R	Fator de correlação
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i> )
SFS	Sistema de introdução de pequenos volumes de amostra (do inglês <i>Segmented Flow Star</i> )
SQR	Substância química de referência
SD	Desvio padrão (do inglês <i>Standard Deviation</i> )
TFM	Tubo fotomultiplicador
TRS	Terapia renal substitutiva
UE	Unidade de endotoxina
UFC	Unidade formadora de colônia
UV-vis	Ultravioleta – visível





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>33</b>
3.1 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA .....	35
3.2 CONCENTRADOS POLIELETROLÍTICOS PARA HEMODIÁLISE.....	36
<b>3.2.1 Controle de qualidade do CPHD</b> .....	<b>37</b>
3.3 TÉCNICAS DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	39
3.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA .....	41
3.5 ESPECTROMETRIA ATÔMICA.....	43
<b>3.5.1 Espectrometria de absorção atômica</b> .....	<b>44</b>
3.5.1.1 Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha .....	45
3.5.1.2 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua	46
3.6 APLICAÇÕES ANALÍTICAS .....	49
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>79</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>101</b>







A doença renal crônica (DRC) é uma patologia caracterizada por uma lesão renal com perda progressiva e irreversível das funções dos rins, e é considerada um problema de saúde pública (ROMÃO, 2004). As modalidades de tratamento são definidas de acordo com o avanço da doença e contemplam a hemodiálise, a diálise peritoneal e o transplante. A hemodiálise é uma terapia renal substitutiva (TRS) empregada para retirar os solutos que estão acumulados, assim como também para preservar e/ou restaurar os componentes normais do sangue (RIELLA, 2018; RUDNICKI, 2014; SANTOS et al., 2017).

A solução da diálise (dialisato) é composta por duas frações: uma básica e uma ácida. Durante a sessão de hemodiálise, as duas frações são misturadas com água purificada, através de um sistema de mistura proporcional (RIELLA, 2018). As frações da solução da diálise (ácida e básica) são denominadas como concentrados polieletrólíticos para hemodiálise (CPHD) e são classificadas como medicamentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A solução ácida é composta por eletrólitos (sódio, potássio, cálcio e magnésio), com ou sem glicose na formulação. Já a solução básica contém apenas bicarbonato de sódio.

A fabricação do CPHD é regulamentada pela RDC nº 08 de 2001, que estabelece o Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação do CPHD, bem como pela RDC nº 658 de 2022 que institui as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

Nesse cenário, o controle de qualidade é fundamental para garantir qualidade, segurança e eficácia aos medicamentos. As indústrias farmacêuticas são regulamentadas por normas sanitárias e precisam adotar rigorosos padrões de qualidade para atender aos requisitos mínimos exigidos pelos órgãos reguladores (ROCHA e GALENDE, 2014).

A validação analítica é um requisito regulatório e é fundamental no controle de qualidade de medicamentos, pois assegura confiabilidade aos resultados e garante que as análises que estão sendo realizadas são seletivas, precisas, exatas e robustas. A validação consiste em uma avaliação sistemática, realizada através de ensaios experimentais, para confirmar e fornecer evidências de que o método analítico é adequado para o seu uso pretendido (BRASIL, 2017a).

O desenvolvimento de metodologias analíticas empregando técnicas de planejamento de experimentos tanto para planejar, como também para otimizar os

ensaios, proporciona inúmeras vantagens. Nesse contexto, destaca-se a redução do número de experimentos, que conseqüentemente resulta em um menor consumo de reagentes e de tempo gasto na condução dos ensaios. Essas ferramentas quimiométricas baseiam-se em modelos matemáticos que permitem avaliar a relevância e a significância estatística dos efeitos das variáveis estudadas, como também das suas interações (FERREIRA, 2015; NOVAES et al., 2017).

Destaca-se que o CPHD não possui monografia na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019) nem na Farmacopeia Americana, e que a metodologia disponível na Farmacopeia Europeia (EP 10, 2019) apresenta limitações. A determinação de cada elemento de forma individual é uma das principais desvantagens do método compendial, pois torna o preparo demorado e mais suscetível a erros analíticos, devido às diluições necessárias para ajustar a concentração da amostra à faixa linear de trabalho do método analítico. Verifica-se também que há poucos estudos na literatura referentes ao desenvolvimento de método analítico para esse produto.

Considerando a importância do CPHD na terapia renal substitutiva, justifica-se desenvolver e validar um método analítico multielementar, utilizando ferramentas de planejamento experimental e uma técnica analítica que possibilite o controle da sensibilidade a partir de ajustes instrumentais, para determinar os analitos, a partir da mesma solução da amostra, de forma sequencial, rápida e confiável. Com isso, além de minimizar possíveis erros analíticos, simplificará a rotina do controle de qualidade dos lotes de produção desse medicamento, pois reduzirá o tempo gasto no preparo tanto das amostras, como também das curvas de calibração.









## 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, otimizar e validar um método analítico preciso e exato para determinação dos eletrólitos sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de CPHD.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e otimizar método analítico multielementar pela técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e chama (HR-CS FAAS) para quantificar os eletrólitos sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de CPHD mediante o uso de técnicas de planejamento de experimentos;
- ✓ Validar o método analítico desenvolvido de acordo com a RDC nº 166/2017 da ANVISA e o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH, 2005);
- ✓ Quantificar os analitos presentes em amostras reais e comparar os resultados com as especificações preconizadas para o CPHD;
- ✓ Comparar os resultados obtidos pela técnica de HR-CS FAAS com aqueles obtidos pelo método por espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS).







A presente revisão visa apresentar os principais tópicos referentes ao CPHD, com foco em controle de qualidade e validação analítica. Primeiramente, será abordada a doença renal crônica e suas modalidades de tratamento, em especial a hemodiálise. Em seguida, será apresentado o CPHD, seu controle de qualidade e as regulamentações aplicáveis. Uma breve contextualização sobre planejamento de experimentos, validação de métodos analíticos e espectrometria atômica também serão descritas ao longo da revisão. Por fim, serão relatados alguns estudos publicados na literatura relacionados à temática desse trabalho.

### 3.1 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

Os rins são órgãos vitais e são responsáveis pela filtração do sangue, pelo equilíbrio hidroeletrolítico, pelo controle da pressão arterial sistêmica, assim como também pela síntese de hormônios. Além disso, eliminam substâncias tóxicas através da urina e participam da excreção de água e de sais minerais (RUDNICKI, 2014).

A doença renal crônica (DRC) é considerada um problema de saúde pública, e é caracterizada pela perda progressiva e irreversível da função renal. Os principais fatores de risco são diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, envelhecimento e histórico familiar. A associação da DRC com fatores, como: obesidade, dislipidemia e tabagismo aceleram a progressão da doença e a fase mais avançada é denominada insuficiência renal crônica (CHERCHIGLIA et al., 2010; FERNANDES et al., 2020; GOUVEIA et al., 2017; ROMÃO, 2004).

As modalidades de tratamento renal são a hemodiálise, a diálise peritoneal e o transplante (RUDNICKI, 2014). As indicações para um paciente iniciar o tratamento dialítico podem ser decorrentes de situações de urgência ou em casos eletivos. Hiperpotassemia ou hipervolemia (refratária às medidas clínicas prévias ou em casos de risco iminente de vida), pericardite ou encefalopatia urêmica são condições clínicas, em caráter de urgência, que podem requerer o início da terapia renal substitutiva. Já os casos eletivos são determinados pelo nível da função renal, pela impossibilidade de manejo clínico das alterações metabólicas e da volemia, pelo estado nutricional, pela presença de sintomas urêmicos ou pela combinação desses critérios (RIELLA, 2018).

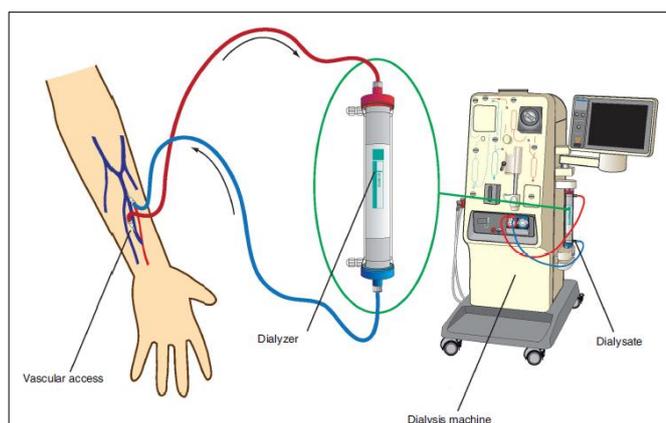
### 3.2 CONCENTRADOS POLIELETROLÍTICOS PARA HEMODIÁLISE

Concentrados polieletrólíticos são medicamentos compostos por eletrólitos, com ou sem glicose e podem ser apresentados na forma farmacêutica sólida ou líquida. São produtos empregados na terapia de diálise renal, após a diluição recomendada pelo fabricante (BRASIL, 2001).

A hemodiálise é uma TRS empregada para retirar os solutos que estão acumulados em decorrência da função renal deficiente, bem como para preservar e/ou restaurar os componentes normais do sangue. Dessa forma, os solutos que serão retirados na solução de troca devem estar ausentes ou em concentrações inferiores à do plasma. Já os que se quer preservar ou oferecer, devem estar em concentrações similares ou superiores (RIELLA, 2018).

O processo consiste na circulação extracorpórea do sangue por tubos ou compartimentos constituídos por uma membrana semipermeável que é banhada constantemente pela solução de diálise. Com isso, o sangue flui dos tubos para o dialisador, que por sua vez filtra os resíduos e retira o excesso de líquidos. Após, o sangue flui por meio de outro tubo e retorna para o organismo do paciente (RUDNICKI, 2014).

A Figura 3.1 apresenta a representação esquemática dos principais componentes da hemodiálise.



**Figura 3.1.** Representação esquemática dos principais componentes da hemodiálise (adaptado de CHAN et al., 2013)

O dialisato é a solução da diálise obtida após a diluição do CPHD, na proporção adequada para o uso e é composto por duas frações: uma básica, que contém bicarbonato de sódio e uma ácida, que contém cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e uma pequena quantidade de um

ácido orgânico (ácido acético, láctico ou cítrico). Durante a sessão de hemodiálise, as duas frações são misturadas com água purificada, de forma contínua na máquina, através de um sistema de mistura proporcional (BRASIL, 2001; RIELLA, 2018).

As concentrações das soluções são definidas de acordo com a necessidade clínica de cada paciente. Com isso, várias formulações de soluções concentradas ácidas (com ou sem glicose) com diferentes diluições de uso (35 e 45x) estão disponíveis no mercado do segmento renal. A Tabela 3.1 apresenta as faixas de concentrações usuais dos sais presentes na formulação, bem como as faixas de concentrações dos íons, após a diluição no volume indicado pelo Fabricante e antes da neutralização com bicarbonato de sódio.

**Tabela 3.1.** Faixas de concentrações usuais do CPHD (adaptado de SALBEGO, 2018).

Composição quantitativa dos sais (Solução concentrada)		Composição quantitativa dos íons (após diluição)	
NaCl	210,70 – 262,06 gL <sup>-1</sup>	Na	138,0 – 140,0 mEqL <sup>-1</sup>
KCl	2,61 – 6,71 gL <sup>-1</sup>	K	1,00 – 2,00 mEqL <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, sol. 50% (p/v)	12,86 – 23,20 gL <sup>-1</sup>	Ca	2,50 – 3,50 mEqL <sup>-1</sup>
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	3,56 – 4,58 gL <sup>-1</sup>	Mg	1,00 mEqL <sup>-1</sup>
Ácido acético	6,31 – 10,81 gL <sup>-1</sup>	Acetatos	4,0 – 5,00 mEqL <sup>-1</sup>
Glicose	31,50 – 40,50 gL <sup>-1</sup>	Glicose	5 mMolL <sup>-1</sup>
Água	q.s.p. <sup>(1)</sup> 1000 mL		

<sup>(1)</sup> q.s.p = Quantidade suficiente para

A glicose é um componente opcional e a sua ausência nos banhos de diálise está associada a sua perda e, conseqüentemente, estímulo à cetogênese e gliconeogênese, maior redução na osmolaridade plasmática durante a sessão e, possíveis sinais clínicos de hipoglicemia podem ser observados, principalmente em pacientes diabéticos (RIELLA, 2018).

### 3.2.1 Controle de qualidade do CPHD

A fabricação do CPHD é regulamentada pela RDC nº 08 de 02 de janeiro de 2001 que estabelece o Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação do CPHD, bem como pela RDC nº 658 de 30 de março de 2022 que institui as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

O Controle de Qualidade é responsável por assegurar que os testes relevantes e necessários sejam executados, e que os materiais não sejam liberados para uso, ou que produtos não sejam liberados para comercialização ou distribuição, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória. Além disso, não se limita apenas às operações de laboratório, devendo estar envolvido em todas as decisões que possam afetar a qualidade do produto (BRASIL, 2022).

Dessa forma, nas indústrias farmacêuticas o controle de qualidade é fundamental para assegurar qualidade, segurança, eficácia, bem como credibilidade aos medicamentos fabricados junto ao mercado consumidor (ROCHA e GALENDE, 2014).

No que tange ao CPHD, a RDC nº 08/2001 estabelece que sejam realizados os seguintes testes de controle de qualidade:

- Inspeção visual em 100% das amostras, para assegurar a integridade física da embalagem;
- Verificação da exatidão das informações do rótulo;
- Aspecto: o CPHD líquido deve ser límpido, de incolor a levemente amarelado, com odor característico e ausência de partículas visíveis a olho nu. Já o CPHD sólido, deve ser um particulado ou granulado uniforme, sem elementos estranhos, de cor e odor característicos e facilmente solúvel em água;
- A quantidade contida nos recipientes não deve ser inferior à quantidade declarada, sendo aceitável uma variação positiva de até 4% (100-104 %).

Já o CPHD diluído (dialisato) deve ser submetido aos seguintes testes de controle de qualidade:

- Condutividade entre  $11 \text{ mS.cm}^{-1}$  e  $15 \text{ mS.cm}^{-1}$ ;
- pH entre 6,8 e 7,5;
- Contagem microbiana inferior a 100 UFC/mL;
- Endotoxinas bacterianas inferior a 0,5 UE/mL, até o término do prazo de validade determinado pelo fabricante;
- Variação dos teores dos componentes entre 2,5 % para o sódio e 5% para os demais sais em relação ao declarado no rótulo do produto (BRASIL, 2001).

A Farmacopeia Brasileira é o compêndio oficial que apresenta as monografias e especificações para a realização dos testes de controle de qualidade tanto de medicamentos como de insumos farmacêuticos (BRASIL, 2019). No entanto, tanto a versão vigente do compêndio oficial, assim como também a Farmacopeia Americana não apresentam monografia para o CPHD. Já a Farmacopeia Europeia apresenta monografia cuja metodologia utiliza a técnica de espectrometria de emissão atômica (AES) para quantificar o íon sódio e a espectrometria de absorção atômica (AAS) para determinar os íons potássio, cálcio e magnésio no CPHD (EP 10, 2019). O método compendial está descrito no Anexo I.

### 3.3 TÉCNICAS DE PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

As técnicas de planejamento de experimentos são ferramentas estatísticas empregadas tanto no planejamento, como também na otimização de experimentos em diversas áreas da química analítica. A otimização de métodos analíticos é fundamental para garantir que as condições que estão sendo aplicadas produzam a melhor resposta possível, proporcionando maior sensibilidade e melhores características analíticas. Nas técnicas de planejamento de experimentos (DOE), são empregados conceitos, como: fator, resposta, nível e modelo (FERREIRA, 2015; NOVAES et al., 2017).

Os fatores são as variáveis passíveis de controle, enquanto que as respostas são as variáveis resultantes que podem ser ou não alteradas em função da variação dos fatores. Os fatores e as respostas podem ser quantitativos ou qualitativos. Já o nível de um fator determina quantas vezes este é alterado durante a otimização. Por fim, o modelo pode ser definido como a função matemática que tem como variável dependente as respostas e independente os fatores (FERREIRA, 2015).

Os métodos empregados em DOE podem ser univariados ou multivariados. No método univariado cada fator é otimizado de forma independente, ou seja, os experimentos são realizados variando apenas o nível de um determinado fator, enquanto os demais são mantidos constantes. Dessa forma, os níveis dos outros fatores são variados um de cada vez, até que o melhor resultado seja obtido (BREITKREITZ et al., 2014).

Já no método multivariado, todos os fatores são alterados simultaneamente e os resultados obtidos são utilizados para construir modelos matemáticos. Com isso,

a técnica de otimização multivariada se destaca em comparação ao modelo univariado nos seguintes aspectos:

- Possibilidade de identificar interações entre as variáveis estudadas;
- Redução no número de experimentos;
- Identificação da significância dos fatores nos processos;
- Os modelos de regressão gerados permitem construir uma superfície de resposta que descreve como as respostas variam em função dos níveis dos fatores, prevendo o que ocorre dentro de todo o domínio experimental (FERREIRA, 2015; BREITKREITZ et al., 2014).

Depois de definidas as variáveis que serão estudadas, a próxima etapa é a escolha do tipo de planejamento que será empregado para estimar o efeito das variáveis no resultado. Estudos de triagem objetivam identificar as variáveis que possuem maior influência na resposta (interações principais e de segunda ordem) e, geralmente, são empregados planejamentos fatoriais completos ou fracionários (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; BREITKREITZ et al., 2014).

O planejamento fatorial completo de dois níveis é uma das ferramentas quimiométricas mais usadas e a quantidade de experimentos é determinada pela expressão  $n=2^k$ , onde  $n$  corresponde ao número de experimentos e  $k$  ao número de fatores. Dessa forma, são avaliadas as combinações dos fatores em dois níveis, inferior e superior, que são codificados com os sinais (-1) e (+1), respectivamente. Estudos com repetições no ponto central, codificado como (0), são realizados para determinar o erro experimental, evitando assim repetições de todo o planejamento (FERREIRA, 2015).

Os resultados oriundos de planejamentos fatoriais proporcionam a construção de modelos lineares que descrevem superfícies de respostas planas. No entanto, se a superfície apresentar curvatura é necessário construir modelos quadráticos, adicionando novos níveis ao planejamento. Planejamentos do tipo fatorial de três níveis, composto central, Box-Benken e Doehlert podem ser empregados (BREITKREITZ et al., 2014).

A Matriz Doehlert é uma alternativa de planejamento experimental de segunda ordem e a quantidade de experimentos é determinada pela expressão  $n=k^2 + k + PC$ , onde  $n$  corresponde ao número de experimentos,  $k$  ao número de fatores e  $PC$  ao número de réplicas do ponto central.

O planejamento Doehlert demonstra ser mais vantajoso que o Box-Behnken, apesar de ambos apresentarem a mesma eficiência, já que possibilita construir planejamentos com um número de níveis diferenciados para os fatores, o que possibilita estudar as variáveis consideradas mais importantes em um número maior de níveis. Além disso, descreve uma distribuição uniforme dos pontos sobre um espaço experimental esférico, requerendo um número menor de experimentos, possibilitando construir planejamentos sequenciais direcionados para a região de máxima resposta (FERREIRA et al., 2004; NOVAES, 2011; TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

### 3.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação de um método analítico pode ser definida como uma avaliação sistemática de um método, através de ensaios experimentais, cuja finalidade é confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017a).

A base normativa preconizada pelos órgãos reguladores para atender os critérios estabelecidos para validação de métodos analíticos está descrita na RDC nº 166/2017 e no Guia nº 10/2017 da ANVISA, no Guia Orientativo do INMETRO (DOQ-CGCRE-008, revisão 09), bem como em referências internacionais como o Guia de Validação de Procedimentos Analíticos do Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (ICH, 2005).

Parâmetros como seletividade, linearidade, efeito de matriz, precisão, limite de quantificação e detecção, exatidão e robustez são avaliados para assegurar a qualidade e a confiabilidade nos resultados obtidos.

Os parâmetros que serão avaliados e os seus respectivos critérios de aceitação são definidos de acordo com as características do analito, natureza do método e finalidade do ensaio. A Tabela 3.2 apresenta os parâmetros analíticos avaliados de acordo com a finalidade do teste.

**Tabela 3.2.** Parâmetros avaliados de acordo com a finalidade do teste (adaptado de BRASIL, 2017a; ICH, 2005).

Parâmetro avaliado	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão intermediária	Não	Sim	Não	Sim
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Não	Sim	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	Não
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

A determinação de sódio, potássio, cálcio e magnésio em concentrados polieletrólíticos é categorizada como um método quantitativo de doseamento. Nesse contexto, os parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo (faixa de trabalho), precisão, exatidão e robustez são avaliados.

A seletividade demonstra a capacidade do método de identificar e/ou quantificar o analito de forma inequívoca, mesmo na presença de outras substâncias, como impurezas, diluentes e componentes da matriz. Além disso, o método deve demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação. Destaca-se que o CPHD é isento de demonstração de produtos de degradação, pois é classificado como um medicamento específico pela RDC nº 24/2011 (categoria isentada pela RDC nº 53/2015 que estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos) e pelo fato do método usado na quantificação dos eletrólitos ser classificado como não cromatográfico (BRASIL, 2011; BRASIL, 2015; BRASIL, 2017a).

Já a linearidade demonstra a capacidade do método de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra. A faixa de trabalho é estabelecida a partir dos estudos de linearidade, precisão e exatidão, e é definida de acordo com a aplicação do método. No caso do CPHD, a faixa de trabalho é de 80 a 120%, pois é um método de determinação de teor. As faixas podem ser ampliadas, desde que justificadas tecnicamente. Nesse contexto, o range pode ser estendido para contemplar todas as concentrações dos analitos nas

diversas apresentações do CPHD disponíveis no mercado do segmento renal (BRASIL, 2017a).

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos, através de ensaios com amostras preparadas de maneira independente, conforme descrito no método analítico a ser validado. Pode ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. Esse parâmetro é calculado pela dispersão dos resultados, através do desvio padrão relativo (DPR) das medições (BRASIL, 2017a).

Em relação à exatidão, essa é avaliada por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro. A abordagem escolhida para avaliar esse parâmetro é baseada no tipo de produto (insumo farmacêutico ativo, produto terminado ou impurezas) que está sendo determinado. Considerando que o CPHD é um produto terminado, o método de adição de quantidades conhecidas de substância química de referência (SQR) ao produto, é uma abordagem adequada para essa finalidade (BRASIL, 2017a).

Por fim, a robustez indica a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações nas condições analíticas. Esse parâmetro pode ser avaliado empregando ferramentas, como planejamento fatorial ou desenho experimental de Plackett–Burman, que permitem variar um número maior de fatores com um número reduzido de experimentos (BRASIL, 2017a; HEYDEN et al., 2001).

### 3.5 ESPECTROMETRIA ATÔMICA

O presente trabalho utilizou a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama que será abordada em maiores detalhes no decorrer dessa revisão. No entanto, a espectroscopia atômica será contextualizada de um modo geral.

A espectroscopia atômica é empregada tanto em determinações quantitativas (espectrometria atômica), como também qualitativas. Os métodos espectroscópicos apresentam alta sensibilidade, possibilitando detectar concentrações muito baixas, de partes por milhão (ppm) a partes por bilhão (ppb) ou menores. Além disso, são rápidos, convenientes e geralmente apresentam alta seletividade (SKOOG et al., 2008).

A determinação das espécies atômicas é realizada em meio gasoso, ou seja, os analitos passam pelo processo de atomização. Essa etapa consiste em volatilizar

e decompor a amostra para gerar uma fase gasosa composta por átomos e íons. Dessa forma, a eficiência e a reprodutibilidade dessa etapa são fundamentais para garantir sensibilidade, precisão e exatidão ao método analítico (SKOOG et al., 2008).

A espectroscopia atômica óptica contempla três técnicas analíticas: absorção, emissão e fluorescência atômica. A espectrometria de absorção atômica (AAS) é baseada na propriedade que os átomos, no estado gasoso fundamental, possuem de absorver radiação em determinados comprimentos de onda. Já na espectrometria de emissão atômica (AES), os átomos são excitados, geralmente pelo calor de uma chama ou plasma, para que emitam energia na forma de radiação eletromagnética. Por fim, na espectrometria de fluorescência atômica (AFS), os átomos são excitados por radiação eletromagnética e determina-se a radiação emitida por esses átomos ao retornarem para estados de menor energia (SKOOG et al., 2008; WATSON, 2012; WELZ e SPERLING, 1999).

### **3.5.1 Espectrometria de absorção atômica**

A espectrometria de absorção atômica é comumente empregada para determinar elementos químicos em baixas concentrações e contempla quatro técnicas: absorção atômica com chama, geração de hidretos, geração de vapor frio e forno de grafite (AMORIM et al., 2008; BORGES et al., 2005; BRASIL, 2019).

A técnica que emprega a atomização por chama é amplamente utilizada devido à simplicidade, efetividade e o custo relativamente baixo. Nessa técnica, a amostra líquida é aspirada por um nebulizador, misturada com os gases combustível (acetileno) e oxidante (ar ou óxido nitroso), formando um aerossol que ao chegar ao queimador, forma a chama. Esta chama é responsável por vaporizar e dissociar os compostos do analito, formando átomos gasosos no estado fundamental. Para determinar a concentração do analito, a radiação proveniente de uma lâmpada incide sob o vapor atômico contendo os átomos livres desse elemento no seu estado fundamental. Esses átomos absorvem parte dessa radiação, em comprimentos de onda específicos, ao serem excitados. O detector mede a atenuação da radiação, a qual é diretamente proporcional à concentração do analito de acordo com os princípios da Lei de Lambert-Beer (BRASIL, 2019; SKOOG et al., 2008).

No segmento farmacêutico, a técnica é comumente empregada em ensaios limites para quantificação de impurezas elementares e na determinação de metais em sais inorgânicos e em soluções de infusão e diálise (WATSON, 2012).

#### 3.5.1.1 Espectrometria de absorção atômica com fonte de linha

Os primeiros espectrômetros foram desenvolvidos na segunda metade do século XIX e utilizavam uma fonte contínua como fonte de radiação. No entanto, devido às limitações instrumentais da época, os monocromadores não conseguiam isolar as linhas espectrais e garantir a relação entre a absorção e a concentração. O problema foi solucionado empregando fontes de emissão de linhas, ou seja, lâmpadas com o cátodo constituído pelo elemento que se quer determinar. Dessa forma, essas lâmpadas emitem uma linha bem estreita e com comprimento de onda específico para cada elemento (AMORIM et al., 2008; BORGES et al., 2005; SKOOG et al., 2008; WELZ et al., 2003).

Dessa forma, a espectrometria de absorção atômica com fonte de linha (LS AAS) se tornou altamente seletiva e específica. Quando comparada com outras técnicas analíticas, como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) apresenta vantagens e desvantagens. A técnica se destaca em relação à instrumentação relativamente simples e barata, já que dispensa o uso de monocromadores de alta resolução. Além disso, a facilidade na operação e o reduzido número de linhas espectrais diminui a possibilidade de interferências por sobreposição de linhas. Quanto às desvantagens, a LS AAS apresenta faixa linear de trabalho relativamente pequena e é considerada uma técnica monoelementar (AMORIM et al., 2008; BORGES et al., 2005).

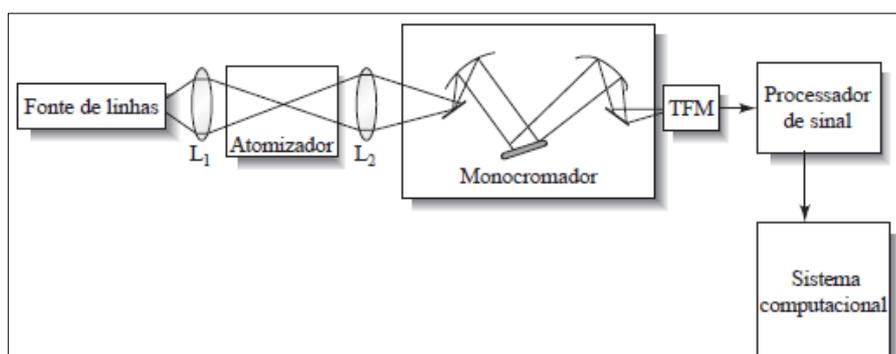
A principal limitação da técnica é o fato de ser monoelementar, ou seja, ocorre a determinação de um elemento por vez, o que torna o procedimento relativamente demorado quando há um grande número de elementos para serem determinados. Além disto, requer o uso de uma lâmpada para cada analito (BORGES et al., 2005).

Outra limitação considerável é o fato da absorção ser determinada apenas em intervalos espectrais relativamente estreitos, condição que restringe a avaliação do ambiente espectral. A absorção medida pode ser proveniente não somente de átomos, mas também causada por moléculas (absorvem radiação) e por partículas

(espalham radiação) oriundas da matriz, originando o chamado “fundo”. Essa situação é decorrente da técnica de LS AAS só permitir a determinação da absorção total. Dessa forma, o fundo deve ser determinado em uma segunda medida e subtraído da absorção total, a fim de obter o valor da absorção atômica absoluta. Para minimizar esses erros foram desenvolvidos sistemas de correção de fundo, como: o uso da lâmpada de deutério como fonte secundária, o pulso em alta corrente da fonte primária, bem como a correção de fundo baseada no efeito Zeeman (BORGES et al., 2005).

Por fim, a instrumentação da LS AAS é composta por uma fonte de radiação, atomizador, monocromador, detector e um sistema de processamento de dados. Lâmpadas de cátodo oco (HCL) e lâmpadas de descarga sem eletrodo são empregadas como fontes de radiação. Já o atomizador pode ser constituído de uma chama ou de um forno de grafite. O monocromador é o componente responsável pela separação do comprimento de onda escolhido. Dessa forma, a radiação incide no monocromador por uma fenda estreita, o qual isola a linha de interesse em uma rede de difração. Em seguida, a potência radiante da fonte inicial e a atenuada pela absorção, é medida pelo tubo fotomultiplicador (TFM), o qual transforma a energia luminosa em corrente elétrica. Por fim, o sinal é processado e encaminhado para um sistema de leitura (BRASIL, 2019; SKOOG et al., 2008).

A Figura 3.2 apresenta a representação esquemática dos principais componentes de um LS AAS.



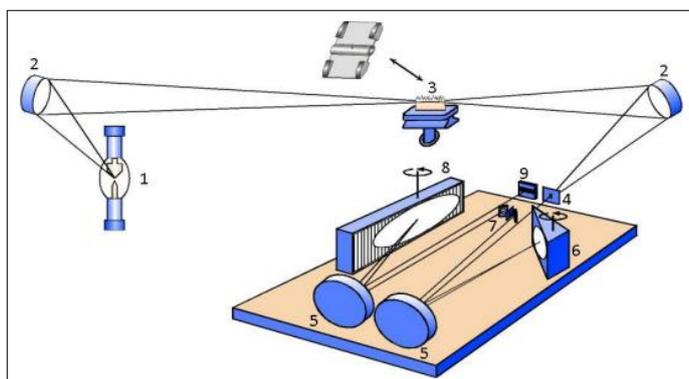
**Figura 3.2.** Representação esquemática dos principais componentes de um LS AAS. TFM: Tubo fotomultiplicador (Fonte: SKOOG et al., 2008)

### 3.5.1.2 Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) é uma técnica analítica frequentemente empregada em determinações

multielementares, que permite determinar de forma sequencial e/ou simultânea elementos químicos em uma mesma alíquota de amostra (FERREIRA et al., 2018).

O termo “fonte contínua” é empregado para descrever uma fonte de radiação capaz de gerar um espectro com uma distribuição espectral contínua em uma ampla faixa de comprimentos de onda (WELZ et al., 2005). O primeiro espectrômetro de HR-CS AAS foi comercializado em 2004 pela empresa Analytik Jena (WELZ, et al., 2014) e a representação esquemática dos principais componentes é apresentada na Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Representação esquemática dos principais componentes de um HR-CS AAS. No esquema estão representados os seguintes componentes: (1) lâmpada de arco curto de xenônio; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabólicos; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede *echelle* e (9) detector CCD (Adaptado de BORGES et al., 2005).

A fonte de radiação consiste em uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão, que opera no modo *hot spot*, caracterizado pela formação de um plasma extremamente pequeno que emite radiação em uma faixa contínua entre 190 a 850 nm. A radiação incidente, após passar pelo atomizador, é dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), onde incide em um prisma e em uma rede de difração *echelle*. O prisma é o pré-dispersor, sendo responsável por selecionar a parte do espectro de interesse, enquanto a rede *echelle* fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado. O comprimento de onda de interesse é selecionado através do ajuste da rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas (BORGES et al., 2005; WELZ, 2005).

Um sistema com uma lâmpada de neônio posicionada em frente à fenda intermediária é empregado para emitir várias linhas estreitas, estabilizando os

comprimentos de onda. Após, essas linhas são separadas pela rede *echelle* e são atribuídas a um pixel correspondente no detector (BORGES et al., 2005).

A radiação emitida e transmitida, após todo o processo de separação, atinge o detector que é constituído por um arranjo de dispositivos de carga acoplada (CCD) com 576 pixels. O diferencial desse detector é que ele adiciona o comprimento de onda como uma terceira dimensão. Dessa forma, é obtida uma exibição tridimensional que mostra a absorbância como função do tempo e do comprimento de onda, fornecendo informações importantes para detectar e evitar interferências espectrais (BORGES et al., 2005; WELZ et al., 2005; WELZ et al., 2014).

O equipamento é gerenciado por um software que permite o processamento total dos dados após as leituras. Um dos diferenciais desse software é a capacidade de corrigir automaticamente eventos que afetam de maneira semelhante todos os pixels do detector (BORGES et al., 2005).

Por fim, a HR-CS AAS é descrita como um “novo conceito instrumental”, já que apresenta muitas vantagens em relação à técnica convencional de AAS (LS AAS). Entre as principais vantagens do sistema destacam-se:

- Possibilidade de realizar determinações multielementares sequenciais e simultâneas. Além do comprimento de onda desejado, a estequiometria da chama e a altura do queimador podem ser selecionadas de forma independente para cada elemento;
- Uso de uma única fonte de radiação (lâmpada de xenônio) para todos os elementos, cuja determinação é possível por AAS;
- Melhora na razão sinal/ruído devido à elevada intensidade da fonte de radiação, resultando em melhor precisão e limites de detecção do que os da LS AAS;
- Possibilidade de utilizar linhas secundárias, ou seja, não há “linhas fracas”, já que a emissão é contínua e a intensidade é aproximadamente uniforme nas diversas regiões do espectro UV-Vis;
- Utilização de um sistema de feixe duplo simultâneo que permite corrigir as variações na intensidade da lâmpada e na transmissão de radiação, sem prejuízo à razão sinal/ruído;

- Visualização do ambiente espectral da linha do analito, possibilitando não só obter informações, mas também realizar correções simultâneas de fundo nas proximidades da linha analítica;
- O software possibilita realizar o processamento total pós-leitura dos sinais, permitindo selecionar pixels de referência adequados, bem como definir os limites de integração;
- Melhor desempenho analítico na determinação de elementos traços em amostras complexas (AMORIM et al., 2008; BORGES et al., 2005; FERREIRA et al., 2018; WELZ et al., 2003).

### 3.6 APLICAÇÕES ANALÍTICAS

Com a consolidação da HR-CS AAS como uma técnica multielementar muitos trabalhos foram publicados na literatura nos últimos anos. No entanto, essa revisão irá contextualizar alguns trabalhos que empregaram a técnica de HR-CS FAAS, em diferentes matrizes, para quantificar os analitos sódio, potássio, cálcio e magnésio, bem como publicações com a técnica de AAS envolvendo matrizes semelhantes a do CPHD.

Paschen e Fuchs (1971) reportam o desenvolvimento de um método simples e rápido para a dosagem dos eletrólitos sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de soro, com uma única diluição, na proporção 1:100, utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica. Na determinação do elemento sódio, foi utilizada a linha de 330 nm (menos sensível) para evitar uma diluição adicional, bem como a necessidade de colocar o queimador em uma posição perpendicular em relação ao feixe de luz. Nesse estudo, a seletividade foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas dos elementos a serem determinados, assim como também pela adição de possíveis interferentes presentes nas amostras de soro, como proteínas, fosfatos, heparina, creatina, ureia e medicamentos diuréticos (furosemida e hidroclorotiazida). As interferências químicas foram eliminadas utilizando cloreto de estrôncio.

Já Pistón e colaboradores (2006) desenvolveram um sistema de análise em fluxo multiparamétrico baseado em multicomutação e amostragem binária para determinar sódio, potássio, cálcio e magnésio, de forma automatizada, em soluções parenterais de grande volume e soluções de hemodiálise. O sistema utiliza válvulas

solenoides controladas por um software para estabelecer as condições apropriadas para cada analito. Sódio e potássio foram determinados por espectrometria de emissão atômica. Já cálcio e magnésio por absorção atômica. O método foi validado avaliando parâmetros, como linearidade, precisão e exatidão. A linearidade foi validada na faixa de concentração de 0,5 – 3,5 gL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> > 0,999) para sódio, de 50 – 150 mgL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> > 0,996) para potássio, de 30 – 120 mgL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> > 0,999) para cálcio e de 20 – 40 mgL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> > 0,999) para magnésio. A precisão apresentou RSD inferior a 2,1%, e a exatidão ficou na faixa de 99,8% – 101,0% (sódio), 100,8 – 102,5% (potássio), 97,3% – 101,3% (cálcio) e 97,1% – 99,8% (magnésio). Nesse estudo, lantânio (3% m/v) foi usado como agente liberador e cloreto de sódio em excesso (15 gL<sup>-1</sup>) como supressor de ionização. No entanto, apesar do estudo propor um sistema automatizado, o CPHD precisou ser diluído manualmente antes do processamento, em decorrência das concentrações altas dos analitos.

KLEIN (2010) propôs um método por cromatografia iônica para determinar sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de CPHD. Para determinar os analitos, foi necessário obter um cromatograma para cada solução padrão preparada e posteriormente construir uma curva de calibração para cada um dos elementos. O método foi comparado com a técnica por eletrodos íons-seletivos (determinação de sódio, potássio e cálcio) e espectrometria no UV/vis (determinação de magnésio). O tempo de análise, a confiabilidade do método e os custos operacionais foram comparados. De acordo com o estudo, o principal fator é a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos pela técnica por cromatografia iônica, que são mais precisos e confiáveis em comparação com a técnica por eletrodos íons-seletivos.

Boschetti et al. (2013) desenvolveram um método para determinar 10 elementos (Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb, Be, Ca e Sr) em vinhos tintos brasileiros usando HR-CS FAAS. A altura do queimador e a estequiometria da chama foram otimizadas através do software do equipamento. Um dos diferenciais desse estudo foi a utilização da válvula SFS 6 para introdução das amostras. Com esse sistema, a injeção das soluções foi controlada, variando entre amostra e água. Dessa forma, perdas foram evitadas em relação à temperatura da chama, bem como o consumo de amostra foi reduzido significativamente se comparado ao método clássico de espectrometria de absorção atômica com chama. As medições foram realizadas sem

preparo de amostra, usando soluções padrão para calibração. Considerando que potássio era um dos elementos investigados no estudo, cloreto de cério (1% m/v) foi empregado como supressor de ionização, devido a sua baixa energia de ionização, que faz com que ele se ionize mais facilmente, aumentando a quantidade de elétrons na chama e conseqüentemente evitando que outros elementos sejam ionizados. Os resultados obtidos foram comparados com ICP-OES e concordaram com 99% de confiança.

Já Santos et al. (2014) reportam o uso da HR-CS FAAS e atomização eletrotérmica para quantificar o teor de minerais (P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn e Cu) em amostras de vegetais denominadas “*baby leaf*s”. Os métodos foram otimizados e validados. Limites de quantificação baixos, boa repetibilidade e linearidade, assim como recuperações variando entre 91% a 110% foram obtidas para os minerais analisados. A exatidão do método foi avaliada através da análise de um material de referência certificado.

Outro trabalho empregando HR-CS FAAS foi reportado por Gómez-Nieto et al. (2015). Nesse estudo foram investigados 11 elementos (Cu, Ni, Zn, Cd, Pb, Mn, Fe, Ca, Na, K e Mg) em amostras de água (ambientais e potáveis) empregando um método de determinação multielementar sequencial por HR-CS FAAS. Um sistema de injeção de fluxo para introduzir as amostras foi utilizado para reduzir o consumo das amostras. A altura do queimador e a estequiometria da chama foram otimizadas pelo software do equipamento. Além disso, foi abordada a estratégia de usar os pixels laterais para o elemento Mg para reduzir a sensibilidade e estender a faixa de trabalho linear.

Guida et al. (2016) relatam o desenvolvimento de um método analítico para determinação de micronutrientes (Na, K, Ca e Mg) em amostras de própolis *in natura* empregando HR-CS FAAS, após digestão assistida por radiação micro-ondas. No presente estudo foi conduzida a validação do método analítico, bem como a avaliação dos parâmetros de mérito. A exatidão foi demonstrada através do uso de material de referência certificado, ensaio de recuperação e comparação dos resultados obtidos com ICP-OES. O método apresentou recuperação na faixa de 86 a 110%.

Por fim, no estudo reportado por Pohl et al. (2018), foi desenvolvido um método de determinação multielementar sequencial para quantificar Ca, Fe, K, Mg,

Mn e Na em amostras de suco de maçã por HR-CS FAAS. O método de preparo das amostras foi otimizado combinando a metodologia de superfície de resposta (Box- Behnken) com a função desejabilidade para estabelecer as condições compromisso.

Adicionalmente, destaca-se que não foi encontrado na literatura publicações empregando a técnica por HR-CS FAAS em amostras de CPHD.









**A clever method for Na, K, Ca and Mg determination in hemodialysis solutions by HR-CS F AAS: development, validation and application on real samples**

O capítulo 4 desse documento é constituído por um artigo científico a ser submetido para publicação, que no texto completo da dissertação defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 57 e 76. Trata-se do desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de concentrados polieletrólíticos por espectrometria atômica de alta resolução e fonte contínua (HR-CS FAAS), aplicando ferramentas de planejamentos de experimentos (DOE).















































O Controle de Qualidade é parte integrante do Sistema de Gestão da Qualidade nas indústrias farmacêuticas e é essencial no contexto das Boas Práticas de Fabricação para assegurar que os medicamentos são seguros e que cumprem com os requisitos de qualidade determinados pelos órgãos reguladores.

Os concentrados polieletrólíticos para hemodiálise são produtos sujeitos à vigilância sanitária, classificados como medicamentos pela ANVISA e devem cumprir os requisitos estabelecidos pelas normas sanitárias. No entanto, devido à ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira (6 ed.) e considerando as limitações da metodologia descrita na Farmacopeia Europeia (10 ed.) foi desenvolvido um método analítico sequencial, empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em chama.

Inicialmente, foram realizados estudos preliminares para determinar uma diluição adequada para ajustar as concentrações dos analitos. Considerando que o CPHD apresenta uma alta concentração salina, o produto foi diluído nas proporções 1:100, 1:250 e 1:500. Nessa avaliação inicial, a diluição 1:100 demonstrou ser adequada para quantificar cálcio e potássio, de forma sequencial, utilizando as linhas principais desses elementos. Além disso, foi possível determinar magnésio e sódio, de forma simultânea, utilizando o comprimento de onda de 285 nm (linha principal do magnésio e secundária do sódio).

A próxima etapa foi avaliar quais variáveis poderiam influenciar na resposta analítica. Considerando que o preparo das amostras não requer um pré-tratamento, a otimização foi direcionada aos parâmetros instrumentais (altura do queimador e vazão de acetileno) e para eliminar possíveis interferências. A altura de observação e a estequiometria da chama interferem diretamente no processo de atomização dos elementos, e conseqüentemente na sensibilidade do método. Em relação às interferências, foi avaliada a utilização de céσιο como supressor de ionização e cloreto de lantânio como agente liberador.

O software do equipamento (ASpect CS, Analytik Jena) possibilita otimizar automaticamente a altura do queimador e a estequiometria da chama, mas de forma univariada. Objetivando avaliar tanto os efeitos principais das variáveis, como também suas interações, um planejamento fatorial completo em dois níveis foi realizado como um estudo de triagem. Os níveis (inferior e superior) de cada fator foram estabelecidos com base nas recomendações do manual do equipamento.

Os resultados foram apresentados na forma de gráfico de Pareto, com um nível de confiança de 95%. Em relação ao modelo estatístico, o tipo de erro escolhido para a ANOVA foi o erro puro, tendo em vista que foram adicionados quatro pontos centrais no experimento. O efeito da interação entre a vazão de acetileno e a altura do queimador foi positivo para os quatro elementos. Além disso, a concentração de lantânio também apresentou efeito positivo na determinação dos elementos cálcio e magnésio, ou seja, maiores sinais analíticos foram observados quando esse fator estava no nível superior (+1). Além disso, a altura do queimador também apresentou efeito positivo na determinação de sódio, potássio e magnésio. A adequação do modelo foi avaliada através do teste *lack of fit*. A variabilidade residual obtida para os quatro elementos foi significativamente maior que o erro puro, indicando que o modelo não estava adequado. A falta de adequação ao modelo de primeira ordem foi confirmada através do teste de curvatura, indicando a necessidade de utilização de um modelo de superfície de resposta de segunda ordem (modelo quadrático).

Tendo em vista que o método ainda não estava otimizado, um segundo planejamento foi realizado empregando a Matriz de Doehlert. Essa ferramenta foi escolhida porque possibilita avaliar os principais efeitos em um número maior de níveis. Desse modo, as quatro variáveis foram estudadas em diferentes níveis, pois todas apresentaram efeitos significativos para pelo menos um dos elementos avaliados. Considerando que a vazão de acetileno e a altura do queimador foram as variáveis que apresentaram maior influência no sinal analítico, esses parâmetros foram investigados em sete níveis. No entanto, devido a limitações instrumentais, esses fatores já estavam sendo investigados nas condições máximas e mínimas. Dessa forma, foram adicionados níveis intermediários no planejamento. Já as concentrações de lantânio e cério foram avaliadas em cinco e três níveis, respectivamente. A mesma estratégia para definir os níveis foi empregada, ou seja, concentrações intermediárias foram inseridas no estudo, considerando as recomendações do manual do equipamento, bem como a viabilidade econômica das análises.

O modelo foi validado através do método de regressão linear, comparando os resultados obtidos com os valores preditos. Os coeficientes de determinação apresentaram valores superiores a 0,90, demonstrando que há uma correlação

adequada, ou seja, o modelo é apropriado para descrever as respostas (FERREIRA, 2015).

Considerando que um dos objetivos desse estudo era desenvolver um método de análise multielementar, para quantificar todos os analitos com um único preparo de amostra, a próxima etapa foi determinar uma condição compromisso para otimizar todas as respostas. Dessa forma, foi empregada a técnica de otimização com restrição, utilizando a função desejabilidade. Após o processamento dos dados, o software indicou as condições que resultam nos valores ótimos das respostas. A altura do queimador foi definida em 8 mm, a vazão de acetileno em 60 Lh<sup>-1</sup> e as concentrações de céσιο e lantânio em 0,25% e 0,60%, respectivamente. As condições indicadas pela otimização foram comparadas com as recomendadas pelo software do equipamento (ASpect CS). Em relação à altura do queimador, a recomendação para o elemento Na é entre 4 – 8 mm, para K entre 5 – 9 mm e para Mg entre 5 – 8 mm. No que tange a vazão de acetileno, a recomendação para os elementos Na e K é de 55 Lh<sup>-1</sup>, já para Mg 70 Lh<sup>-1</sup>. Dessa forma, concluiu-se que as condições estabelecidas para os parâmetros instrumentais estão de acordo com as recomendadas pelo fabricante do equipamento.

No que se refere ao elemento cálcio, não foi possível estabelecer essa comparação, pois o software apresenta apenas recomendações quando a chama de óxido nitroso-acetileno é utilizada. Entretanto, no estudo foi utilizada a chama ar-acetileno. A utilização dessa chama para quantificar cálcio é uma das vantagens do método desenvolvido, tanto do ponto de vista econômico (a vazão de acetileno empregada nesse tipo de chama é menor, o que conseqüentemente reduz o consumo do gás durante as medições), como também da execução da análise. Dessa forma, a determinação dos elementos é realizada de forma sequencial, não requerendo a troca do tipo de chama entre um elemento e outro, proporcionando uma redução no tempo de execução das medições.

Em relação à concentração de céσιο e de lantânio (supressor de ionização e agente liberador, respectivamente), a otimização multivariada proporcionou adequar as concentrações dessas soluções de acordo com o requerido pelas amostras de CPHD. Dessa forma, a otimização influencia tanto no desempenho do método, como também na viabilidade econômica das análises. O método compendial (EP 10, 2019) recomenda a utilização de 0,5% de lantânio no preparo tanto das soluções de

amostras, como também das curvas analíticas para determinar os elementos cálcio e magnésio. Considerando que os preparos são individuais, o consumo de lantânio é superior ao método desenvolvido. Além disso, o método desenvolvido apresenta vantagens em comparação ao proposto por Piston et al. (2006) para determinar sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de CPHD. No estudo supracitado, uma quantidade superior de lantânio (3% m/v) foi usada para corrigir as interferências químicas e cloreto de sódio em excesso ( $15 \text{ gL}^{-1}$ ) como supressor de ionização. Apesar do reagente cloreto de sódio apresentar um custo mais baixo em comparação com o céσιο, o seu uso em uma determinação multielementar não seria adequado, já que esse elemento é um dos analitos que estão sendo determinados. Já Boschetti et al. (2013) utilizou cloreto de céσιο 1% m/v para determinar potássio em amostras de vinho. Além disso, o sistema de análise em fluxo desenvolvido por Piston e colaboradores (2006) requer o uso de uma bomba peristáltica, uma série de válvulas solenoides e um sistema para controlá-las. O método aqui proposto utiliza apenas uma válvula (modelo SFS 6) para o controle de introdução da amostra, comercializada como acessório do HR-CS FAAS, que é controlada pelo mesmo software que controla o espectrômetro.

A proporção de diluição das amostras foi ajustada de 1:100 para 1:1000, em decorrência dos valores de RSD observados entre as réplicas (superiores a 5,0%) e para ajustar as concentrações dos analitos à faixa linear de trabalho. Durante a execução dos experimentos, foi observada a formação de um depósito de resíduos no queimador, provenientes da amostra, que mesmo diluída na proporção 1:100 ainda apresentava alta concentração salina (aproximadamente  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  para sódio). Além disso, os valores de RSD elevados eram em decorrência dos valores de absorvância obtidos estarem fora da faixa linear de trabalho, impossibilitando distinguir concentrações próximas. Com isso, foi necessário alterar a linha analítica escolhida para quantificar o elemento Na, para uma linha mais sensível, porém ainda uma linha secundária com apenas 0,5% (330,237 nm) de sensibilidade relativa. A proposta inicial era realizar a determinação simultânea de Na com Mg, utilizando uma linha secundária (285 nm), com sensibilidade relativa de 100% para Mg (285,212 nm) e 0,05% para Na (285,281 nm). Porém, devido ao aumento da diluição, optou-se pela linha analítica de 330 nm para quantificar esse analito, devido à maior sensibilidade.

Paralelamente, foram realizados testes para determinar a taxa de aspiração, bem como o tempo de injeção usando a válvula SFS 6. As condições foram estabelecidas considerando a maior intensidade do sinal analítico (absorbância integrada) e os menores valores de RSD. A taxa de aspiração foi ajustada para 4 mLmin<sup>-1</sup> e o tempo de injeção para 1 s.

Outra vantagem do método desenvolvido foi a utilização da válvula SFS 6 para introdução das amostras, de forma semelhante ao reportado por Boschetti et al. (2013) e por Gómez-Nieto et al. (2015). Através do uso desse sistema, a injeção das soluções foi controlada, variando entre amostra e água. Desse modo, perdas foram evitadas em relação à temperatura da chama, bem como o consumo de amostra foi reduzido significativamente se comparado com LS AAS. Com isso, destaca-se novamente o impacto econômico na rotina analítica, já que com o uso da válvula SFS 6 é possível reduzir o volume das soluções preparadas, e conseqüentemente o consumo dos reagentes utilizados nos preparos das amostras e das curvas analíticas.

Conforme discutido por Boschetti et al. (2013), um dos diferenciais da técnica por HR-CS AAS é que não existem linhas fracas. O uso de linhas menos sensíveis é uma das estratégias empregadas para reduzir a sensibilidade, que pode ser associada com o uso de pixels laterais, sem prejuízos na razão sinal/ruído. Dessa forma, a influência dos pixels (centrais e laterais) foi investigada de forma semelhante ao estudo supracitado. Curvas de calibração foram preparadas e a relação entre a faixa linear de trabalho (avaliada através do coeficiente de determinação) e os valores de RSD obtidos foi comparada através do número de pixels utilizados. O critério de escolha foi o maior coeficiente de determinação, permitindo estender a resposta linear, e o menor RSD. Adicionalmente, destaca-se que à medida que são usados apenas os pixels laterais, um aumento nos valores de RSD pode ser observado, devido a maior contribuição do ruído no sinal nessas regiões de menor absorbância. Entretanto, foi utilizada a linha analítica de 330,237 nm, que apresenta baixíssima sensibilidade (0,5%) para determinar o elemento sódio e o RSD não foi afetado. No caso da análise ser realizada por LS AAS, provavelmente seria observado um aumento expressivo no RSD das medidas em decorrência da diminuição da intensidade dessa linha, devido ao uso da lâmpada de cátodo oco como fonte de radiação.

Após a conclusão da otimização do método, procedeu-se à validação analítica. Na avaliação da seletividade, soluções placebos (sem um dos analitos de interesse) foram preparadas para avaliar possíveis interferências nos comprimentos de onda de cada elemento. A interferência do branco (solução de céσιο e lantânio) e da matriz da amostra (ácido acético e glicose) também foi investigada. Nas determinações efetuadas sem o analito, as respostas analíticas apresentaram valores abaixo dos limites de detecção e quantificação, não sendo consideradas significativas. Resultados semelhantes foram também obtidos na análise do branco e de seus componentes, bem como na avaliação da matriz da amostra. Além disso, foi calculada a recuperação dos analitos e os resultados obtidos estão dentro das especificações estabelecidas para o CPHD. Os resultados demonstram que o método foi capaz de quantificar cada analito individualmente, mesmo na presença dos demais componentes da matriz e do branco, sendo considerado específico para a finalidade proposta.

A linearidade foi validada na faixa de concentração de 25 – 130 mgL<sup>-1</sup> para o Na, de 1,0 – 5,0 mgL<sup>-1</sup> para K e Ca e de 0,30 – 0,70 mgL<sup>-1</sup> para Mg, não apresentando desvio do modelo linear. As faixas foram estabelecidas para contemplar todas as concentrações dos analitos nas diversas apresentações do CPHD disponíveis no mercado do segmento renal. Através da análise visual das curvas, foi possível verificar uma aparente correlação linear entre os eixos X e Y. A homocedasticidade dos dados foi confirmada através do Teste de Cochran. A análise de variância (Teste F da ANOVA) indicou que o coeficiente angular é estatisticamente diferente de zero. Já o teste de Grubbs comprovou a ausência de *outliers* entre os dados. Dessa forma, o método demonstrou linearidade adequada, conforme preconiza a base normativa dos órgãos reguladores (BRASIL, 2017a; ICH, 2005; INMETRO, 2020).

A metodologia demonstrou ser precisa apresentando valores de RSD inferiores a 2,7%. De acordo com o Guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO, os critérios de aceitação para a precisão estão atrelados à concentração do analito. Tendo em vista que o Na está na faixa de concentração de 100 ppm (DPR < 5,3%) e que K, Ca e Mg estão na faixa de 1 a 10 ppm (DPR < 7,3%), os resultados obtidos demonstraram precisão adequada à finalidade proposta (INMETRO, 2020).

Em relação à exatidão, a média de recuperação dos analitos, contemplando os três níveis adicionados foi de 103,0% para Na, 100,5% para K, 101,3% para Ca e 101,5% para Mg. De forma semelhante à precisão, o Guia do INMETRO também estabelece os critérios de aceitação de acordo com a concentração do analito. Considerando que o Na está na faixa de concentração de 100 ppm (90 – 107%) e que K, Ca e Mg estão na faixa de 1 a 10 ppm (80 – 110%), os resultados obtidos demonstraram exatidão adequada (INMETRO, 2020).

A robustez do método foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo em dois níveis, através de pequenas modificações nas concentrações das soluções de lantânio e cério ( $\pm 0,01\%$ ) empregadas no preparo das amostras e padrões. Os resultados foram avaliados através de gráficos de Pareto e demonstraram não haver diferença significativa nas determinações quantitativas dos analitos.

Dessa forma, concluiu-se que o método desenvolvido cumpriu com os requisitos preconizados pela base normativa (BRASIL, 2017a; ICH, 2005), podendo ser empregado com segurança na determinação quantitativa de sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de soluções para hemodiálise, apresentando-se como uma alternativa ao método compendial (EP 10, 2019) para a realização do controle de qualidade do CPHD.







- A otimização do método, através das ferramentas de planejamento de experimentos empregadas, demonstrou ser adequada, já que foram estabelecidas as condições ótimas para cada variável estudada no método por HR-CS FAAS a partir de um número relativamente reduzido de experimentos;
- O método desenvolvido e validado por HR-CS FAAS, nas condições experimentais avaliadas, demonstrou ser específico, linear, preciso, exato e robusto para quantificar, de forma sequencial, sódio, potássio, cálcio e magnésio em amostras de CPHD;
- O método desenvolvido apresenta-se como uma alternativa à área de controle de qualidade, pois possibilita quantificar os quatro analitos com um único preparo de amostra, utilizando uma curva de calibração multielementar. Dessa forma, não só reduz o tempo consumido no preparo das soluções, como também minimiza a possibilidade de erros relacionados às diluições das amostras e padrões;
- A análise estatística comparativa do método proposto (HR-CS FAAS) com o método de referência da Farmacopeia Europeia (LS AAS) demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos.







AMORIM, F. A. C. et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multielementares. **Revista Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.

BORGES, D. L. G. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**, v. 18, n. 18, p. 58-67, 2005.

BOSCHETTI, W. et al. Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS. **Talanta**, v. 111, p. 147-155, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 08, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico que institui as Boas Práticas de Fabricação do Concentrado Polieletrólitos para Hemodiálise – CPHD. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 24, de 14 de junho de 2011. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica** (Guia nº 10/2017 – Versão 1), Brasília, 2017b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 658, de 30 de março de 2022. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2022.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro com o-fenantrolina. Um tutorial, Parte III. **Revista Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2003.

CHAN, C.T. et al. Novel techniques and innovation in blood purification: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes. **Kidney international**, v. 83, n. 3, p. 359-371, 2013.

CHERCHIGLIA, M. L. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes em terapia renal substitutiva no Brasil, 2000-2004. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 639-649, 2010.

EP 10. **European Pharmacopoeia**. 10 ed. Strasbourg, France: Council of Europe, 2019.

FERNANDES, D. et al. Qualidade de vida de pacientes em terapia renal substitutiva: uma análise da doença renal crônica e perfil populacional de risco. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 12, p. 1-9, 2020.

FERREIRA, S. L. C. et al. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry, review. **Talanta**, v. 63, n.4, p. 1061–1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamentos de experimentos**. 1. ed. Salvador: Editora Vento Leste, 2015.

FERREIRA, S. L. C et al. Atomic absorption spectrometry: A multi element technique. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 1-6, 2018.

GÓMEZ-NIETO, B. et al. Fast sequential multi-element determination of major and minor elements in environmental samples and drinking waters by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 854, p. 13-19, 2015.

GOUVEIA, D. S. S. et al. Análise do impacto econômico entre as modalidades de terapia renal substitutiva. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 2, p. 162-171, 2017.

GUIDA, M. A. B. et al. Desenvolvimento e avaliação de metodologia analítica para determinação de micronutrientes (Na, K, Mg e Ca) em Amostras de Própolis in natura Empregando HR-CS FAAS. 2016. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1792-1804, 2016.

HEYDEN, Y. V. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

ICH. International Conference on Harmonization. **Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology Q2 (R1)**, 2005.

INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. rev. 9, Rio de Janeiro, 2020.

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

MARSON, B. M. et al. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. **Química Nova**, v. 43, n. 8, p. 1190-1203, 2020.

MILLER, J. N; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. Ed. England: Pearson, 2010.

NOVAES, C. G. **Aplicação de técnicas quimiométricas na otimização de métodos usando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de absorção atômica com chama visando a análise de amostras ambientais**. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184-1215, 2017.

PASCHEN, K.; FUCHS, C. A new micro-method for Na, K, Ca, and Mg determinations in a single serum dilution by atomic-absorption spectrophotometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 35, n. 2, p. 401-408, 1971.

PISTON, M.; DOL, I.; KNOCHEN, M. Multiparametric flow system for the automated determination of sodium, potassium, calcium, and magnesium in large-volume parenteral solutions and concentrated hemodialysis solutions. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2006, p. 1-6, 2006.

POHL, P. et al. Development and optimization of simplified method of fast sequential HR-CS-FAAS analysis of apple juices on the content of Ca, Fe, K, Mg, Mn and Na with the aid of response surface methodology. **Talanta**, v. 189, p. 182-189, 2018.

RIELLA, M. C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.

ROMÃO, J. E. JR. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 1-3, 2004.

RUDNICKI, T. Doença renal crônica: vivência do paciente em tratamento de hemodiálise. **Revista Contextos Clínicos**, v. 7, n. 1, p. 105-116, 2014.

SALBEGO, 2018. CPHD AC 35 e 45 C/ GLICOSE – Solução para hemodiálise. Porto Alegre, 2018. Bula.

SANTOS, B. P. et al. Doença renal crônica: relação dos pacientes com a hemodiálise. **ABCS Health Sciences**, v. 42, n. 1, p. 8-14, 2017.

SANTOS, J. et al. Multi-elemental analysis of ready-to-eat “baby leaf” vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 151, p. 311-316, 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2008.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Revista Química Nova**, v. 29, n.2, p. 338-350, 2006.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 3. ed. Edinburgh: Elsevier, 2012.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Wiley-VCH: Weinheim, 1999.

WELZ B. et al. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry - What can we expect? **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n. 2, p.220-229, 2003.

WELZ, B. et al. **High-resolution continuum source AAS: The better way to do atomic absorption spectrometry**. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.

WELZ, B. et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects – a critical review. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 799-821, 2014.







## ANEXO I

Procedimento analítico para a determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de concentrados polieletrólíticos por LS AAS

(Metodologia adaptada da Farmacopeia Europeia, 10 ed., 2019).

### 1. Determinação de sódio

- Especificação: 97,5 a 102,5% do conteúdo indicado no rótulo;
- Método: Espectrometria de emissão atômica;
- Solução amostra: diluir a amostra com água purificada de modo a obter uma diluição adequada para o equipamento utilizado;
- Curva analítica: preparar uma curva de calibração na faixa de concentração de 8 a 12 mgL<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque de 1000 mgL<sup>-1</sup>, com diluições adequadas;
- Comprimento de onda: 589,0 ou 589,6 nm.

### 2. Determinação de potássio

- Especificação: 95,0 a 105,0% do conteúdo indicado no rótulo;
- Método: Espectrometria de absorção atômica;
- Solução amostra: diluir a amostra com água purificada de modo a obter uma diluição adequada para o equipamento utilizado. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de sódio 22 gL<sup>-1</sup>;
- Curva analítica: preparar uma curva de calibração na faixa de concentração de 0,5 a 2,5 mgL<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque de 100 mgL<sup>-1</sup>, com diluições adequadas. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de sódio 22 gL<sup>-1</sup>;
- Comprimento de onda: 766,5 nm;
- Fonte de radiação: lâmpada de cátodo oco de potássio;
- Sistema de atomização: chama de ar-acetileno.

### 3. Determinação de cálcio

- Especificação: 95,0 a 105,0% do conteúdo indicado no rótulo;
- Método: Espectrometria de absorção atômica;

- Solução amostra: diluir a amostra com água purificada de modo a obter uma diluição adequada para o equipamento utilizado. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de lantânio  $5 \text{ gL}^{-1}$ ;
- Curva analítica: preparar uma curva de calibração na faixa de concentração de  $0,5$  a  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ , a partir de uma solução estoque de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , com diluições adequadas. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de lantânio  $5 \text{ gL}^{-1}$ ;
- Comprimento de onda:  $422,7 \text{ nm}$ ;
- Fonte de radiação: lâmpada de cátodo oco de cálcio;
- Sistema de atomização: chama de ar-acetileno.

#### 4. Determinação de magnésio

- Especificação:  $95,0$  a  $105,0\%$  do conteúdo indicado no rótulo;
- Método: Espectrometria de absorção atômica;
- Solução amostra: diluir a amostra com água purificada de modo a obter uma diluição adequada para o equipamento utilizado. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de lantânio  $5 \text{ gL}^{-1}$ ;
- Curva analítica: preparar uma curva de calibração na faixa de concentração de  $0,2$  a  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ , a partir de uma solução estoque de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ , com diluições adequadas. Para cada 100 mL de solução preparada, adicionar 10 mL de uma solução de cloreto de lantânio  $5 \text{ gL}^{-1}$ ;
- Comprimento de onda:  $285,2 \text{ nm}$ ;
- Fonte de radiação: lâmpada de cátodo oco de magnésio;
- Sistema de atomização: chama de ar-acetileno.