

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Ana Lucia Martins de Luna Palmigiani

Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de
um Modelo de Controle

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
com parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.**

Rio de Janeiro

2005

Trabalho Realizado no Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos, no Departamento de Qualidade,
sob a orientação da Dra. Silvana do Couto Jacob.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Ana Lucia Martins de Luna Palmigiani

Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de
um Modelo de Controle

Orientadora: Doutora Silvana do Couto Jacob

Aprovada em 29/06/2005

Examinadores:

Dra.	Akie Kawakami Ávila -	Presidente
Dra.	Verônica Maria de Araújo Calado -	Titular
Dr.	Laerte da Cunha Azeredo -	Titular
Dr.	Josino Costa Moreira -	Suplente
Dra.	Queenie Siu Hang Chui -	Suplente

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2005.

Dedicatória

Ao meu filho amado, Lucas.

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, dedicação e perseverança que conduziram a mim e aos meus irmãos. Mostrando-nos a importância de lutarmos por aquilo que acreditamos.

Ao meu marido, pela compreensão e entusiasmo nas dificuldades e nos momentos que achava que iria desistir. Sempre com paciência e palavras de carinho e amor.

Ao meu filho querido, por entender que a dedicação a esse trabalho o roubou momentos de prazer e que acima de tudo acreditou que poderia tornar-me uma melhor mãe. Com todo o seu amor !

Ao meu irmão Sylvio, pelos acertos nos piores momentos com a "distância que separa o computador do encosto de seu operador".

Aos funcionários e amigos do LAFIQ, que deram muita força e energia para poder continuar. Esse trabalho é para vocês! Que ele sirva de ferramenta e propicie tranqüilidade e segurança nas tomadas de decisões.

A Izabel Cristina Crespo pela paciência que dispensou a análises, correções e opiniões pertinentes. Foram bem positivas.

A Cláudia Amorim pela força na organização com a impressão.

Ao João Crispim, pela dedicação nas análises de águas.

A Márcia Arissawa por ter dividido comigo aquele presente de Deus, o ás da informática.

Ao Filipe Cavalcante pela ajuda preciosa nos programas de Excel.

A Cláudia Maria Dias pela importante ajuda "Statística".

A professora Verônica Maria Araújo Calado pelo carinho, atenção e esclarecimentos oportunos com diferentes pontos de vista.

A Aline Xavier pela contribuição nas estimativas de incertezas com importantes opiniões.

Ao Sr. Paulo Couto, INMETRO, pela ajuda no esclarecimento da norma ISO GUM.

A Sra. Yukie Yrata pela valiosa e incontestável contribuição no tratamento dos dados e estimativas de incerteza, que demonstraram inovações. Foi muito importante! Obrigada.

A Darcy Akemi Hokama, por acreditar que não iríamos deixar a "corda ruir".

A Zaíra Antunes e Sheila Farage pela paciência e zelo por todos nós e nossos trabalhos. Fizemos tudo que pensávamos não conseguir...Obrigada!

Ao Diretor, Dr. Akira Homma, pela oportunidade, credibilidade, inovação, entusiasmo e acima de tudo por mostrar-nos tudo isso. Muito obrigada!

A todos aqueles que torceram e que de alguma forma tornaram isso tudo possível.

Ao meu Deus

Índice

Índice.....	viii
Índice de Ilustrações	xi
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviações	xiv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1 - Introdução.....	1
1.1- Histórico	1
1.2 - Regulamentação	4
1.3- Ferramentas de Qualidade	9
1.4 - Validação	14
1.5 - A Incerteza	24
1.6- A Condutividade.....	32
1.7 - A cromatografia de íons	39
2- Objetivo Geral.....	41
2.1- Objetivos Específicos:	41
3 - Materiais e Métodos	42
3.1- Descrição do Método tipo I	44
3.1.2- Materiais e condições de análise	44
3.1.3- Reagentes e Soluções	45
3.1.3- Preparo da Curva de Calibração.....	46
3.1.4- Preparo das Amostras.....	46
3.2- Descrição do Método tipo III	47
3.2.1- Materiais do Método tipo III	47
3.2.2- Condições de Análise.....	48
4 - Resultados e Discussão:	48
4.1 - Resultados para o Método tipo I	50
4.1.1- Primeira curva de calibração	50
4.1.1.1- Resultados obtidos pelo analista 1	53

4.1.1.2- Cartas de Controle dos Resultados obtidos pelo Analista 1.....	54
4.1.1.4 - Resultados obtidos pelo Analista 2	56
4.1.1.5 - Cartas de Controle dos Resultados do Analista 2	57
4.1.2 - Segunda Curva de Calibração.....	58
4.1.2.1 - Resultados obtidos pelo Analista 3	60
4.1.2.2 - Cartas de Controle dos Resultados do Analista 3	61
4.1.3 - Estudo e tratamento dos dados obtidos pelos três Analistas.....	62
4.1.3.1 - Teste F(Snedecor)	62
4.1.3.2 - Verificação de Tendência	63
4.1.3.3 - Teste t, comparação da média experimental.....	66
4.1.3.4 - Recuperação dos analistas 1 e 3	68
4.1.4 - Validação do Método tipo I	69
4.1.4.1- Seletividade	69
4.1.4.2 - Faixa de trabalho	70
4.1.4.3 - Linearidade	70
4.1.4.4 - Precisão.....	70
4.1.4.5 – Exatidão	74
4.1.4.6 – Robustez.....	77
4.1.5 - Diagrama de Causa e Efeito.....	77
4.1.6 - Relatando as fontes de incerteza estimadas do Método tipo I	78
4.1.6.1 - Estudo das variáveis e suas contribuições.....	78
4.1.7 - Diagrama de Ishikawa “refinado” do método tipo I	86
4.1.8 - Contribuições para a Incerteza Padrão Combinada do Método tipo I....	87
4.2- Método tipo III.....	88
4.2.1- Análise de estabilidade da amostra e carta de controle.....	88
4.2.2- Comportamento da Amostra e carta de controle	90
4.2.3- Comportamento dos resultados gerados por três analistas do Método tipo III.	93
4.2.4- Parâmetros de Validação	98
4.2.4.1 - Especificidade	98
4.2.4.2 - Precisão.....	98
4.2.4.3 - Robustez.....	101
4.2.5 - Diagrama de Causa e Efeito do Método tipo III	101

4.2.6 - Estimativas de Incerteza	102
4.2.6.1 - Cálculo da Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III	103
4.2.6.2 - Estimativa de Incerteza Expandida do método tipo III	104
4.7- Diagrama de Causa e Efeito “refinado” do método tipo III	104
4.8 - Contribuições para a Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III...	105
5 - Conclusão.....	106
6- Anexos	108
ANEXO A	108
ANEXO B	109
ANEXO C.....	110
ANEXO D	111
7 - Bibliografia.....	112

Índice de Ilustrações

Ilustração 1 - Estrutura Organizacional do Laboratório de Controle Físico-Químico.....	4
Ilustração 2: Demonstração gráfica das possíveis causas de erros nos resultados analíticos.....	11
Ilustração 3: Método normalizado, segundo USP 25.	16
Ilustração 4: Avaliação gráfica da incerteza padrão de medição.....	25
Ilustração 5 - Primeira curva de calibração [(χ = concentração) x (y = área do pico)] utilizada pelos Analistas 1 e 2.....	50
Ilustração 6 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 1.....	54
Ilustração 7 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 1.....	54
Ilustração 8 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 2.....	57
Ilustração 9 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 2.....	57
Ilustração 10 - Segunda Curva de calibração [(χ = concentração) x (y = área do pico)] utilizada pelo Analista 3.....	58
Ilustração 11 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 3.....	61
Ilustração 12 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 3.....	61
Ilustração 13 - Gráfico repetitividade x Reprodutibilidade	72
Ilustração 14 - Gráfico Box Whiskers dos três analistas	73
Ilustração 15 - Comportamento dos dados dos três analistas relacionado as medições	74
Ilustração 16 - Gráfico de dispersão dos resíduos em relação ao valor ideal.	76
Ilustração 17: Gráfico de Ishikawa do método I.....	78
Ilustração 18 - Preparo das soluções de trabalho	84
Ilustração 19- Diagrama de Ishikawa refinado do método tipo I.....	86
Ilustração 20 - Relação Fontes de Incerteza versus Percentual de contribuição	87
Ilustração 21: Carta de controle com as medidas de estabilidade	89
Ilustração 22 : Carta de controle do comportamento dos dados da água WFI ao longo de um mês, com duas amostragens diárias.....	92
Ilustração 23 - Medidas de condutividade do analista 1	95
Ilustração 24 - Medidas de condutividade do Analista 2	95
Ilustração 25 - Medidas de condutividade do Analista 3	96
Ilustração 26 - Gráfico de Reprodutibilidade	100

Ilustração 27 - Gráfico Box Whiskers dos três analistas	100
Ilustração 28: Diagrama de Ishikawa do método III.....	101
Ilustração 29 - Diagrama de Causa e Efeito refinado do Método tipo II	104
Ilustração 30 - Relação de variáveis que contribuíram para a Estimativa de Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III.....	105

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação de métodos e parâmetros analíticos recomendados à validação.	15
Tabela 2 - Percentuais de recuperação de amostras.....	20
Tabela 3 - Atualização da Curva de Horwitz (AOAC , 2000).....	21
Tabela 4 - Relação de medidas de condutividade do estágio 1.	36
Tabela 5 - Estágio 3 de condutividade.	37
Tabela 6 - Requerimentos de Qualidade Química conforme Portaria 1469 de 29/12/2000 – Ministério da Saúde, para água potável, USP 26 água purificada e destilada e pop 106040-617.....	38
Tabela 7 - Preparo da curva padrão.....	46
Tabela 8 - Área dos picos obtidos para diferentes soluções padrão usadas para confeção da curva de calibração 1.	51
Tabela 9 - Parâmetros de regressão linear da primeira curva de calibração, obtidos através do programa Excel.	51
Tabela 10 - Dados obtidos pelo Analista 1.....	53
Tabela 11 - Dados obtidos pelo Analista 2.....	56
Tabela 12 - Área dos picos obtidas para diferentes soluções padrão usadas para confeção da curva de calibração 2.	58
Tabela 13 - Regressão Linear da segunda curva de calibração.	59
Tabela 14 - Resultados obtidos pelo Analista 3.	60
Tabela 15 - Relação de Variâncias dos três analistas.....	62
Tabela 16 - Taxas de Recuperação dos dados obtidos pelos Analistas 1 e 3.	68
Tabela 17 - Tabela comparativa de valores corrigidos.....	71

Tabela 18 -Relação de coeficientes variação e analistas.....	71
Tabela 19 - Relação de resíduos entre os dados gerados por cada analista estudado.	75
Tabela 20 - Contribuição da variável Massa na estimativa de Incerteza do método tipo I.	78
Tabela 21 - Contribuição da variável Volume na estimativa de Incerteza do método tipo I.	79
Tabela 22 - Relação de desvios padrão antes da correção.	81
Tabela 23 - Resultados de condutividade para o estudo da estabilidade da amostra....	88
Tabela 24 - Condutividade da WFI DE amostras coletadas por trinta dias consecutivos.	91
Tabela 25 - Dados estatísticos dos valores da condutividade (comportamento da amostra em 30 dias).....	92
Tabela 26 - Comportamento dos Analistas com a análise de condutividade em WFI....	94
Tabela 27 - Relação desvio padrão x analista - Método III.	99
Tabela 28 - Incerteza padrão do Método tipo III.....	102

Lista de Abreviações

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemist</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials Standards</i>
BPF	Boas práticas de fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
B+S	Baush Strobel
CEP	Controle estatístico de processo
CCQ	Círculos de Controle de Qualidade
DTP	Vacina contra a Difteria, o tétano e a pertussis
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GSK	GlaxoSmithKline
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
HPIC	<i>High performance ion chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LALIO	Laboratório de Liofilização.
LAFAM	Laboratório de Febre Amarela
LAFIQ	Laboratório Físico-Químico
Log Book	Caderno de registro de operação/ utilização
LSL	<i>Lower Control Limit</i>
NBR	Norma Brasileira Registrada
NMKLC	<i>Nordic Committee on Food Analyses</i>

OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PNI	Programa Nacional de Imunização
POP	Procedimento operacional padronizado
PRP	Polissacarídeo capsular purificado
PRR'P	Poliribosilribitol fosfato
PW	<i>Purified Water</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SI	Sistema Internacional
TOC	<i>Total Organic Carbon</i>
USL	<i>Up Control Limit</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VIM	Vocabulário internacional de metrologia
WFI	<i>Water for injection</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Resumo

O objetivo deste trabalho foi aprimorar a qualidade analítica do laboratório de Controle Físico-Químico, LAFIQ, de Bio - Manguinhos através da implantação de ferramentas que permitam avaliar o desempenho dos resultados do laboratório e criar um modelo de controle. Foram estudados dois métodos de análise: determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo B – Hib que corresponde a categoria de método tipo I, conforme Farmacopéia Americana e da condutividade em água para injetáveis correspondente a categoria de método tipo III. Os parâmetros de validação e adequação dos dois métodos foram estudados e cartas controle foram construídas utilizando os dados das análises de amostras referência realizadas por diversos analistas em dias diferentes. Com parâmetros calculados a partir destas cartas foi possível avaliar quão correto é um resultado comparado ao valor desejado, representado pelo valor da grandeza que está sendo medido. O parâmetro desvio-padrão, e o correspondente intervalo de confiança foram utilizados para medir a dispersão dos resultados através do cálculo das incertezas das medições. Para o método tipo I as estimativas das incertezas padrão combinada e expandida foram $u = 0,50 \mu\text{g} / \text{mL}$ e $U = 1,00 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectivamente. Foram considerados os parâmetros Reprodutibilidade, a concentração da solução de trabalho, do volume, da pureza do reagente, e da massa, como os que mais contribuíram para a incerteza desta categoria de método. Para o método tipo III foram encontradas as incertezas $u = 0,03 \mu\text{S} / \text{cm}$ e $U = 0,06 \mu\text{S} / \text{cm}$, como incertezas padrão combinada e padrão expandida. Os fatores que mais contribuíram na incerteza deste método foram os relacionados a qualificação / calibração do equipamento, a estabilidade da amostra e a precisão do procedimento dos analistas. O uso destes recursos estatísticos desenvolvidos e estudados na presente dissertação levarão ao aprimoramento do controle da qualidade dos imunobiológicos garantindo a qualidade do trabalho dos analistas e a maior confiabilidade dos resultados fornecidos pelo LAFIQ.

Abstract

The objective of this work was to improve the quality of the Bio-Manguinhos' Laboratory of Physico-Chemical Quality Control using tools that allow to evaluate the analytical performance. The work was carried out studying two analytical methodologies: determination of the content of polysaccharide in *Haemophilus influenzae* type b vaccine, that is type I according to American Pharmacopeia's and conductivity measurement in injectable waters, type III. In this study it was suggested a model that allows to guarantee the quality of results emitted by the Control Laboratory. The validation of the chosen methods and the construction of chart controls were made by evaluating the validation parameters, data for reference sample and estimating the uncertainty of the measurements. This last one is considered the quantified attribute that allows estimating if the result is correct compared to the certified value. The uncertainty corresponds to the range of the established confidence that means the dispersion of the results. All these statistics tools will improve the implementation of a Quality System. For the method type I the uncertainty standard and expanded were $u = 0,50 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $U = 1,00 \mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The calculations of the measurement uncertainty were performed considering the follow sources: Reproducibility, concentration of the standard solutions, volume, purity of reagent, and mass. For the method type III, the values were $u = 0,02 \mu\text{S}/\text{cm}$ and $U = 0,06 \mu\text{S}/\text{cm}$. The parameters that contributed to the uncertainty of this method were: the behavior of the sample, the qualification and performance of equipment used and the stability of water samples. For both studied analytical methods the main contribution for the analytical results uncertainties was the precision of the analytical procedures.

The use of these statistic tools will improve the confidence on the analytical results from the LAFIQ.

1 - Introdução

1.1- Histórico

As vacinas foram criadas no século passado, a partir do estudo de Pasteur, que criou as primeiras vacinas atenuadas virais e as bacterianas. A primeira vacina foi descoberta em 1796 por Edward Jenner, que desenvolveu a vacina contra a varíola, conforme Moulin, 1996 e Fernandes, 2000 . Com os avanços da biologia e da genética, aliados à constatação de que as vacinas são o instrumento de saúde pública que gera o maior benefício ao menor custo, levaram o governo a traçar, em 1991, a meta de auto-suficiência em imunobiológicos de maior impacto para o quadro epidemiológico nacional. O mérito é do trabalho realizado pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos (Bio-Manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, que é o responsável pela produção de vacinas e reativos (kits de diagnóstico de doenças infecto-parasitárias). A história de Bio-Manguinhos se confunde com a da própria FIOCRUZ, já que ela nasceu como Instituto Soroterápico, destinado a produzir soros e vacinas. A partir de 1976, Bio-Manguinhos começou a ganhar aspecto industrial que tem hoje, quando começou a produzir mais de 100 milhões de doses anuais de vacinas e reativos, dados fornecidos do IV Congresso Interno da FIOCRUZ, Termos de referência, 2002.

A Unidade Bio-Manguinhos está no contexto da FIOCRUZ, como produtora de imunobiológicos. Ela atende a demanda do país, através do Programa Nacional de Imunizações (PNI) e também à demanda externa através da exportação da vacina contra a febre amarela. O Centro que integra o Complexo Tecnológico de Vacinas é o maior produtor de imunizantes da América Latina e um dos maiores do mundo, com capacidade de preparação de cerca de 200 milhões de doses anuais. Em 2004/2005, a FIOCRUZ, em parceria com o Instituto Butantã, começou a produzir a vacina Penta Brasil, uma associação das vacinas difteria, tétano e caxumba - DTP, *Haemophilus influenzae* tipo b - Hib e da hepatite tipo B - Jornal de Bio-Manguinhos (BIONotícias), 2004.

Maior produtor brasileiro de vacinas, respondendo por 60% da produção nacional, Bio-Manguinhos fabricou no ano de 2003 cerca de 80 milhões de doses.

Foram 30 milhões de doses da vacina contra febre amarela; 34 milhões da vacina contra paralisia infantil (poliomielite); e 16 milhões da vacina tetravalente, associação da vacina DTP - contra difteria, tétano e coqueluche - e da vacina contra a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, Hib, que pode causar pneumonia e um tipo de meningite. No ano de 2004 a produção ficou na casa dos 120 milhões de doses, dos quais 26 milhões foram produzidas com destino à exportação. Para atender ao PNI fabricaram-se 20 milhões de doses de vacina tríplice viral, que corresponde à combinação dos imunizantes sarampo, rubéola e caxumba, 16 milhões de doses de vacina contra a febre amarela, 20 mil da Hib, 17 milhões da tetravalente e 40 milhões de doses da vacina contra a poliomielite, conforme dados levantados oficialmente da área comercial.

Em 1999, Bio-Manguinhos passou a produzir o imunizante contra *Haemophilus influenzae* tipo b - Hib, bactéria que provoca meningite, otite e pneumonia sendo uma das principais causas de doenças e mortes de crianças em todo o mundo. Sua produção no país é resultado de um acordo de transferência de tecnologia, no qual Bio-Manguinhos importa da Bélgica o antígeno concentrado, realizando a formulação, envasamento, liofilização e processamento final da vacina. No ano de 2004, Bio-Manguinhos começou a desenvolver as fases de produção, através de fermentações bacterianas e obtenção do polissacarídeo *Haemophilus* para conjugação com a proteína monomérica tetânica. Essa vacina sendo totalmente nacional possibilitará a imunização de cinco doenças, com somente uma dose aplicada em crianças. Isto será possível através da seguinte combinação de vacinas: Hib, DTP e hepatite B. Sua forma de apresentação é de cinco doses por frasco. O Brasil torna-se auto-suficiente na imunização do *Haemophilus influenzae* tipo b.

A preparação da vacina conjugada contra Hib, é baseada na tecnologia de Schneerson, na qual o polissacarídeo é preparado a partir da cepa virulenta 20752 e após ativação com brometo de cianogênio e extração com um separador de hidrazida adípica, é combinado à proteína monomérica tetânica, através da condensação com carbodiimida. Após purificação o conjugado é liofilizado em presença de lactose, que é o estabilizador - Schneerson et al, 1987.

Cada dose de vacina reconstituída (0,5mL) contém 10 µg de polissacarídeo capsular purificado (PRP) de *Haemophilus influenzae* tipo b, ligado covalentemente a cerca de 30µg de toxóide tetânico (na forma de proteína monomérica tetânica) , com

excipiente lactose. A reconstituição é feita em diluente salina fenolada ou em vacina líquida DTP. Com a última maneira de reconstituição ela imuniza até quatro doenças e ambas as formas são utilizadas de forma intramuscular, como informação de sua bula. Atualmente esta última é a forma mais utilizada pelo programa nacional de imunização (PNI).

Inicialmente a vacina desenvolvida contra a doença, era constituída somente pelo polissacarídeo capsular tipo b. Após estudos clínicos, foi verificado que a vacina conferia uma baixa imunogenicidade de polissacarídeo poliribosil ribitol (PRRP) em crianças menores de 18 meses, portanto era ineficiente para o objetivo a que se dispunha. Essa deficiência gerou estudos e o desenvolvimento da forma carreadora da proteína monomérica tetânica, que é metodologia de Schneerson, 1980. Com essa formulação, a vacina contra Hib ligada à proteína monomérica tetânica, confere imunidade a crianças na faixa etária de 2 a 6 meses, sendo necessárias três doses, e um reforço aos dois anos de idade, já que na fase infantil a doença torna-se mais severa. Sendo necessários 12,5 µg de polissacarídeo Hib / dose.

Após implantação das boas práticas de fabricação, BPF, em 1999, o controle interno da produção de imunobiológicos passou por uma série de reformulações, que visaram atender as expectativas da Unidade Bio-Manguinhos, conforme as recomendações do Ministério da Saúde e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, também das normalizações de caráter internacional.

A área de Garantia da Qualidade, atuante nas BPF da Unidade Bio-Manguinhos existe desde 20/03/1990. Isso contribuiu para o aprimoramento e implantação das BPF, nas áreas de Produção e Controle de Qualidade.

O Controle de Qualidade existe quase que simultaneamente ao nascimento da Unidade, e vem desenvolvendo-se a cada ano buscando novas metodologias analíticas de controle dos produtos e sua missão é garantir a qualidade dos imunobiológicos de Bio-Manguinhos.

O Laboratório Físico-químico - LAFIQ, está inserido nesse contexto e faz parte do Departamento de Qualidade. Ele emite laudos diários das análises de todos os materiais que entram no Almoxarifado da Unidade, desde as matérias-primas e insumos, até os materiais de embalagem em geral. Além disso, análises rotineiras que são realizadas em diversos tipos de águas produzidas, soluções de processo, produtos intermediários, produtos em desenvolvimento, soluções reagentes para kit

e diagnóstico e produtos imunobiológicos acabados. Os laudos emitidos são os registros dos ensaios físico-químicos, padronizados de acordo com o tipo de material e produto. O organograma do Departamento de Qualidade e Laboratório de Controle Físico-Químico é mostrado na ilustração 1.

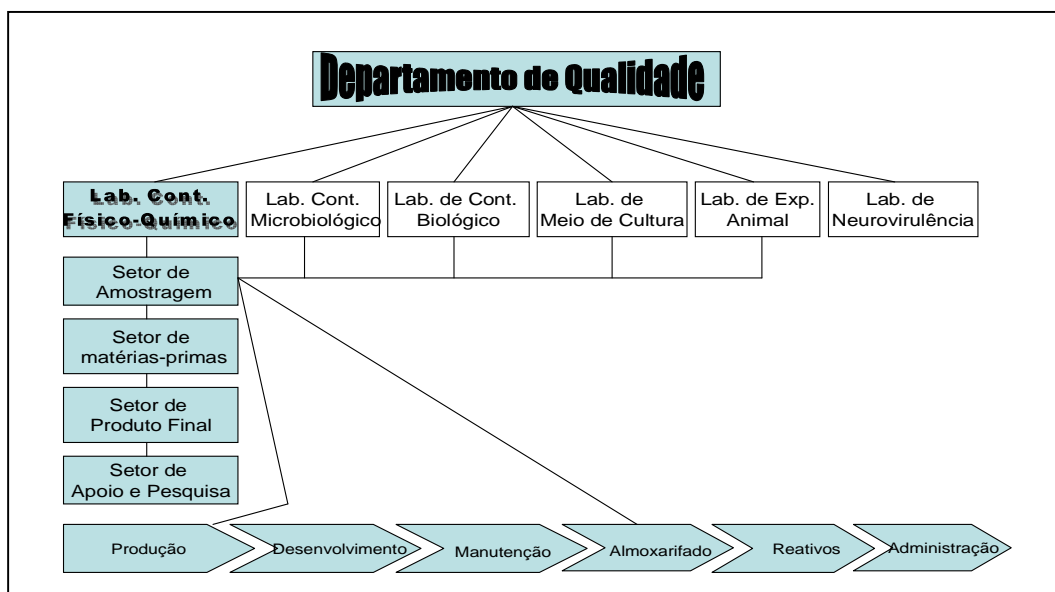


Ilustração 1 - Estrutura Organizacional do Laboratório de Controle Físico-Químico

Na ilustração 1 pode-se observar as atribuições do Departamento de Qualidade, do Laboratório de Controle Físico-Químico de Qualidade e a interação com outros Departamentos, serviços e setores de Bio-Manguinhos que o LAFIQ atende como seus clientes.

1.2 - Regulamentação

A ANVISA, sob orientação e respaldos técnicos da Organização Pan-americana de Saúde, OPAS, e Organização Mundial de Saúde, OMS, tem como

interesse maior o estabelecimento de critérios objetivando garantir a qualidade e segurança dos produtos imunobiológicos. Essas ações incluem as inspeções realizadas e a efetivação de uma consciência de Qualidade Total, a começar pela compra de insumos, produção, controle de processos, controle de qualidade e produto acabado. Para isso metodologias eficazes de análise em parceria com o acompanhamento de métodos e produtos, contribuem para atingir a meta da Qualidade total assegurada - Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 210, 2003 e 304 de dezembro de 2004.

Entende-se por Qualidade como um modo de pensar na organização, ou empresa. A implantação do controle estatístico de processo (CEP) deve ser baseada num ambiente em que a qualidade seja parte integrante dos valores e da rotina da organização, isto é, um ambiente em que comportamento organizacional seja realmente condicionado pelo pensamento em qualidade. Um diagnóstico preliminar, realizado para verificar o comportamento organizacional frente ao aspecto qualidade pode evitar desperdícios futuros.

De acordo com a ANVISA, Qualidade e Produtividade, são fatores essenciais para a competitividade, que devem ser preocupação constante dos setores produtivos. A qualidade observou diferentes abordagens ao longo do tempo, sendo até hoje fator chave de sucesso .

Ao longo do tempo, desde a fase de produção artesanal até os dias de hoje, pelo menos, quatro diferentes abordagens vem sendo observadas, como relata Alfredo Lobo, 2003 - INMETRO.

- A fase da produção artesanal que caracterizou-se pela total aproximação entre o produtor e o consumidor. A interação plena entre ambos propiciava que este passasse diretamente para o produtor suas expectativas.
- A fase da revolução industrial que provocou grandes mudanças em termos de abordagem da qualidade. O aumento da escala de produção introduziu o chamado controle da qualidade. Inicialmente, com foco na inspeção do produto final, o controle da qualidade passou por uma série de aperfeiçoamentos. A inspeção em

diferentes etapas do processo produtivo, o controle estatístico da qualidade, as cartas de controle, dentre outros, se destacaram. De qualquer forma, o controle da qualidade tinha ênfase na detecção de defeitos. O distanciamento entre quem produzia e quem consumia e a segmentação do controle da qualidade, como consequência da produção seriada, diluíram a responsabilidade pela qualidade e problemas com qualidade dos produtos surgiram com maior intensidade.

- A exploração espacial, os programas nucleares e mais recentemente a exploração de petróleo em águas profundas, cujas instalações demandam maior confiabilidade, provocaram uma nova e importante mudança na abordagem da questão da qualidade nas empresas. Estudos demonstraram que a maior parte dos problemas de qualidade tinha origem em falhas gerenciais e não técnicas. Essa constatação deu origem aos chamados sistemas de gestão de qualidade, que associam ações de controle que, como anteriormente mencionado, têm ênfase na detecção de defeitos, com ações de administração da qualidade, que tem ênfase na prevenção de defeitos.
- Pré-qualificar os fornecedores, analisar criticamente os projetos, elaborar e qualificar os procedimentos de execução e de inspeção, treinar e qualificar pessoal, calibrar os instrumentos de medição, identificar expectativas e avaliar o grau de satisfação dos clientes, dentre outras, são ações típicas de prevenção de defeitos, ou de administração da qualidade. A base normativa hoje mais utilizada para a implantação de sistemas de gestão da qualidade é a norma ISO 9001, 2000. Diante da necessidade de implantar sistemas de gestão da qualidade, os países, em especial os desenvolvidos, começaram a estabelecer normas nacionais de gestão da qualidade. Tal fato causou transtornos para as empresas exportadoras, que tinham que implantar sistemas de gestão da qualidade com base em

diferentes padrões normativos, para atender diversos países. O mérito da ISO 9000 foi exatamente unir as diferentes bases normativas em uma única, hoje universalmente aceita.

No Brasil, a partir do início da década de 90, vem sendo observado um grande movimento em prol da melhoria da qualidade de produtos e serviços. A criação pelo Governo Federal do Programa Brasileiro da Qualidade e Produtividade, as aberturas econômicas, que expôs as empresas brasileiras a um ambiente de grande competição, a evolução do cidadão brasileiro enquanto consumidor, que passou a exercer mais plenamente seus direitos e deveres, e a estabilização da moeda foram fatores indutores e decisivos para esse movimento. Nesse período, qualidade deixou de ser preocupação exclusiva dos técnicos para ser de todos, mais em particular do gerente. O conceito atual é de que qualidade é adequação ao uso, cujos requisitos devem estar previamente estabelecidos.

O mercado globalizado vem demandando novas abordagens em termos da questão da qualidade. Uma adequada gestão pela qualidade, que tem decisiva contribuição e que alavanca a competitividade, passou a ser decisiva para a sobrevivência das empresas, no ambiente de grande competição hoje observado.

Surgem as chamadas barreiras não tarifárias, ou barreiras técnicas, estabelecidas através da promulgação de normas, regulamentos ou procedimentos de avaliação da conformidade. O fato é que o espaço para dificultar o acesso a mercados através do estabelecimento de tarifas acabou para a grande maioria dos países, passando estes a fazê-lo através das barreiras técnicas.

Por avaliação da conformidade entende-se a implementação de uma sistemática, com regras pré-estabelecidas e devidamente acompanhadas e avaliadas, que propicie adequado grau de confiança de que um produto, processo ou serviço atende aos requisitos de uma norma ou regulamento técnico. O mecanismo de avaliação da conformidade mais comumente utilizado e conhecido é a certificação.

A certificação de produtos caracteriza-se pela existência de parceria independente entre o produtor e o consumidor, quando o objetivo maior é a qualidade desses produtos.

O grande desafio da avaliação da conformidade é sua utilização como regulador de mercados. A adoção de programas de avaliação da conformidade, obedecendo práticas internacionais, propiciará o reconhecimento mútuo entre programas de diferentes países, permitindo um natural fluxo de produtos, sem o ônus da repetição dos ensaios e avaliações nos países compradores.

Hoje, no Brasil, existem 45 programas de avaliação da conformidade de produtos de caráter compulsório e 82 de caráter voluntário. As estruturas de credenciamento de organismos de avaliação da conformidade e de laboratórios de calibração e de ensaios, coordenados pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO, são as únicas da América Latina reconhecidas internacionalmente, o que representa uma vantagem competitiva para as empresas brasileiras - fonte INMETRO, por Alfredo Lobo, 2003.

O setor de produção de vacinas no Brasil, é marcado por desafios peculiares. Ele requer uma base científica e tecnológica intensa. Tratam-se de produções que implicam em alto custo e têm ciclos longos de processos. A organização da produção é contínua e está sempre submetida a exigências regulatórias. A demanda na área de produção nacional é caracterizada pelo setor público, onde o principal usuário é o mercado interno, conforme Reinaldo Guimarães, 2002 .

O acompanhamento de produtos bem como os estudos pós marketing caracterizam dados históricos de produtos, relacionados a qualidade desses produtos, ao comportamento populacional e suas doenças. Os estudos clínicos demonstram como de fato um produto novo, ou uma nova formulação é relacionada à imunidade de doenças com o objetivo de atingir a erradicação da mesma no país.

A adoção de práticas adequadas de gestão da qualidade, a normalização, a metrologia e avaliação da conformidade, tudo isso representa um diferencial na economia globalizada e, portanto fundamental importância para a exportação brasileira.

Como ferramenta da qualidade, prevista nas normas de Boas Práticas de Fabricação, BPF, da ANVISA, estão as técnicas e os critérios de validação de processos, métodos e produtos. Como exigência da legislação vigente, RDC 304 - ANVISA, a validação tem com objetivo assegurar a conformidade dos produtos farmacêuticos em relação as especificações estabelecidas, que devem atender

padrões adequados de exatidão e reprodutibilidade. Para essa finalidade o FDA publicou em 01/03/1998, em conjunto com o ICH - “Internacional Conference on Harmonization” da “Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” um guia contendo diretrizes sobre a validação de procedimentos analíticos. De acordo com a seção 501 deste guia, os ensaios e especificações existentes nas monografias da United States Pharmacopeia (USP) e do “National Formulary” constituem padrões legais. Portanto, as metodologias de análise devem ser escolhidas de modo a atender padrões farmacopeicos vigentes

As Boas Práticas de Laboratório, BPL, fazem parte desse sistema de qualidade assegurada e é o quesito que diz respeito à organização e às condições sob as quais os estudos em laboratório e de campo são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados, conforme definição do INMETRO, Norma NIT DICLA 028 revisão 00.

Laboratórios de ensaios são normalizados conforme a *International Standardization Organization*, ISO 17025. Segundo esta norma a validação de uma metodologia analítica pode ser definida como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos são atendidos” (NBR ISO/ IEC 17025: 2001) . A referência, segundo parâmetros de performance analítica é a farmacopéia americana, USP 27- capítulo <1225> 2004; ASTM internacional, 2004; RDC 304, 2004; FDA, 2000; INMETRO, 2003; RDC 210, 2003; ISO 17025, 2001; IUPAC, 2002.

Os procedimentos operacionais padronizados (POP), de equipamentos e os registros de dados correspondentes abrangem, entre outros, a operação, manutenção rotineira, manutenção não rotineira, calibração e utilização do mesmo. O equipamento usado nos estudos não deve interferir com o sistema-teste.

1.3- Ferramentas de Qualidade

Conhecido como diagrama de Ishikawa, pois foi introduzido por Kaoru Ishikawa e como diagrama Espinha de Peixe ou diagrama de causa e efeito, recebeu essa denominação devido à sua aparência. Ishikawa nasceu em 1915, com formação em

química aplicada pela Universidade de Tóquio, foi o primeiro a utilizar o termo “Controle de Qualidade” e desenvolveu as ferramentas de qualidade. O diagrama de causa e efeito, é uma representação gráfica que ajuda a identificar, explorar e mostrar as possíveis causas de uma situação ou problema específico. Cada diagrama tem uma grande seta apontada para o nome de um problema. Os ramos que saem dessa seta representam as categorias de causas, tais como: mão-de-obra, materiais, máquinas, meio ambiente, medidas, métodos e etc. As setas menores representam itens dentro de cada categoria e possibilita a discussão, detalhada, sobre o funcionamento de um processo ou sobre um problema. As Ferramentas de Ishikawa são, de acordo com Schissatti, 1998:

- Diagramas de causa e efeito (espinha de peixe ou diagrama de Ishikawa)
- Histogramas
- Folhas de verificação
- Gráficos de dispersão
- Fluxogramas
- Cartas de controle.

Ishikawa observou que nem todos os problemas poderiam ser resolvidos por essas ferramentas, ele percebeu que ao menos 95% poderiam ser, e que qualquer trabalhador fabril poderia efetivamente utilizá-las. Embora algumas dessas ferramentas já fossem conhecidas há algum tempo, Ishikawa as organizou especificamente para aperfeiçoar o Controle de Qualidade computacional.

Conforme a ilustração 2 o gráfico de Ishikawa, diagrama de causa e efeito, é possível visualizar as possíveis fontes de erros e conseqüentemente variabilidade em resultados analíticos.

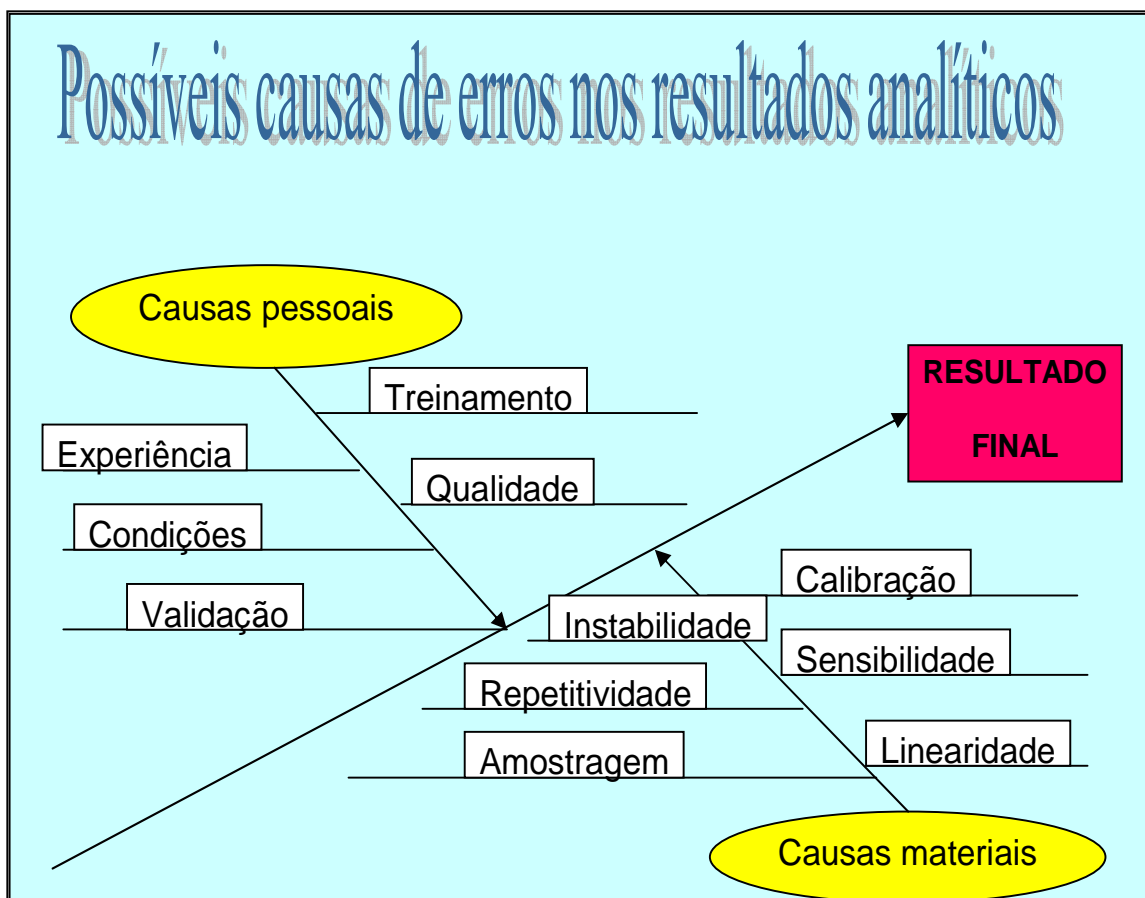


Ilustração 2: Demonstração gráfica das possíveis causas de erros nos resultados analíticos.

Para fins de estudo, é importante simplificar essas fontes de erros verificando quais são verdadeiramente importantes e que acarretam variabilidade em resultados analíticos. As fontes de erros levam à maior incerteza, que comprometem o resultado final. No trabalho abordaremos as possíveis causas de erros e suas fontes de incerteza nos dois métodos.

A implantação de qualidade nas empresas deve ser considerada como um processo de mudança organizacional, onde o controle estatístico de processo, CEP, é muito mais do que a introdução de novas ferramentas de melhoria de processos. A rotina de atividades das funções, as atitudes e crenças da organização são objetos de mudança. Desta forma, a implantação deve ser planejada como um processo de mudança organizacional e cultural.

O sistema de controle a ser desenvolvido para garantir que essas ações sejam implementadas e efetivadas a contento, geralmente, acarretam mudanças na postura e atribuições dos que terão a responsabilidade pela melhoria dos processos. Uma segunda observação refere-se à função das cartas de controle. Essas são ferramentas que indicam que é necessário intervir no processo para mantê-lo no estado desejado. É necessário acima de tudo conhecimento, tanto para se interpretar a carta de controle e perceber o aviso, quanto para identificar o que deve ser ajustado no processo. Em outras palavras, o fator gerencial é predominante na ingerência de atitudes e correções necessárias que são sinalizadas por essas ferramentas. Quando o conhecimento de problemas é a ponte da partida para a correção e resolução dos mesmos, de acordo com Chambers, 1992.

O controle de processo é uma ferramenta imprescindível para a credibilidade de uma produção e conhecimento dos desvios que ocasionalmente possam ocorrer. Com ele é permitido checar sua performance, a capacidade e facilita intervenções e conseqüentemente correções necessárias. Em se tratando especificamente do sistema de ações corretivas vale ressaltar que enquanto a manutenção da variabilidade do processo em um determinado patamar depende basicamente de ações operacionais, isto é, das ações executadas por aqueles que utilizam diretamente as cartas de controle, a redução da variabilidade depende do esforço conjunto daqueles que têm autoridade técnica sobre o processo, de acordo com Controle de Contaminação - julho, 2004.

Algumas ferramentas que dão subsídio ao andamento adequado de uma fábrica são:

- Sistemas de Controle e Gerenciamento de Produção (execução, planejamento, relatórios);
- Controle Estatístico de Processo (CEP);
- Rastreabilidade de processo;
- Sistema de Controle de Qualidade e Gerenciamento de Paradas e perdas do processo;
- Sistemas de Autocontrole e Gerenciamento de Processos (expedição e recebimento de materiais para a produção);
- Sistemas de Manutenção Preditiva e Preventiva;
- Integração com Sistemas de Gestão Empresarial.

Esse controle faz parte da avaliação técnica da qualidade. Segundo Kume, 1993, este sistema foi proposto inicialmente por Walter Shewhart. Os problemas decorrentes das causas especiais ou aleatórias são inevitáveis em qualquer processo. Porém, é possível que exista uma causa assinalável dos problemas decorrentes de causas comuns e que existam fatores relevantes a serem investigados. Shewhart interpretou a variabilidade como sendo passível de duas possibilidades. Aquela que ocorre dentro dos limites definidos pelo acaso, e aquela que está fora destes limites. Estando fora ele acreditava que as causas pudessem ser identificadas, ou seja, elas seriam assinaláveis de acordo com Deming, 1997. A variação controlada é caracterizada por um estável e consistente padrão de variação sobre o tempo. Shewhart atribuiu tal variação a causas aleatórias onde a variação não controlada é caracterizada por um padrão de variação que muda ao longo do tempo. Ele atribuiu as mudanças no padrão de variação às causas assinaláveis.

As cartas de controle 3σ são muito utilizadas para separar causas comuns de causas especiais. A partir de uma média de dados de determinado processo, são estabelecidos dois limites, um superior e um inferior, distantes 3σ desta mesma média. Considerando-se a normalidade do processo, desde que o mesmo esteja estabilizado, existe uma probabilidade de 99,73% de que qualquer valor extraído do processo esteja entre eles. As variações aleatórias são produzidas pelas interações entre mão-de-obra, máquinas, materiais e métodos. O resultado líquido da variação é relativamente consistente ao longo do tempo. Por outro lado, juntando às causas aleatórias, há ocasionalmente fatores especiais que têm um grande impacto nas características do produto, e estas causas segundo Shewhart poderiam ser identificadas, Deming, 1990 e Deming, 1997, Introduction to Statistical Quality Control. 4th edition. USA, 2001. Daí a importância de resultados corretos e conhecimento de variáveis que possam contribuir para variabilidades de qualidade.

A partir de um pioneirismo japonês, muitos têm adotado, como ênfase, o melhoramento contínuo de processos, e só assim, obtendo conformidade total às especificações.

Para efeito de estudo, no trabalho foram abordados os diagramas de causa e efeito (diagrama de Ishikawa), as cartas de controle para resultados analíticos, dispersão dos dados, gráfico de Pareto e as estimativas de incerteza, provenientes

de estudos de validação e adequação analítica de controle de qualidade. Essas ferramentas de controle foram aplicadas e realizados nas seguintes metodologias: cromatografia, por HPLC de troca iônica, categoria tipo I – denominado Método I e na medição de condutividade, que é o método de categoria III - Método III, conforme parâmetros farmacopeicos, USP 27, 2004 e NBR ISSO/ IEC 17025, 2001. Eles foram selecionados entre tantos outros por motivo de seus resultados sinalizarem possíveis correções de processo e serem métodos quimicamente críticos para o Laboratório. Para esses métodos serão utilizadas amostras de polissacarídeo Hib e água para injetáveis - Water for Injection, WFI, respectivamente, com o objetivo de utilizar essas ferramentas para melhorar a qualidade dos processos produtivos através de resultados analíticos, de Bio-Manguinhos e do Laboratório de Controle Físico Químico de Qualidade.

1.4 - Validação

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico escolhido. A validação pode ser definida como a “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos são atendidos”, segundo a (NBR ISO/ IEC 17025: 2001) . Um método analítico pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o analista pode validar um método analítico em comparação com um método independente ou através do emprego de material de referência certificado. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Se o método escolhido já foi objeto de um estudo colaborativo, ainda assim o analista é obrigado a validá-lo intralaboratorialmente para demonstrar que pode ser usado em seu laboratório, ou pelo menos fazer sua qualificação. Os requisitos de validação estão claramente demonstrados e associados a clientes e métodos.

A seguir a recomendação de parâmetros e classificação dos métodos a serem validados (USP 27, 2004):

- Categoria I: Quantificação de macro componentes em substâncias ativas ou ingredientes ativos em produtos farmacêuticos acabados.
- Categoria II: Determinação de impurezas em substâncias ativas ou componentes de degradação em produtos farmacêuticos acabados.
- Categoria III: Determinação de características físico-químicas em substâncias ativas ou em produtos acabados (ex. dissolução, tamanho de partículas, liberação da droga).
- Categoria IV : Testes de identificação

De acordo com a classificação acima os métodos devem seguir a seguinte normalização de validação, como descritos na tabela 1:

Tabela 1 - Classificação de métodos e parâmetros analíticos recomendados à validação.

Parâmetros investigados e classificação dos métodos					
Parâmetro analítico	Categoria I	Categoria II		Categoria	
		Quantitativo	Qualitativo	III	IV
Exatidão	sim	sim	*	*	não
Precisão	sim	sim	não	sim	não
Seletividade	sim	sim	sim	*	sim
Lim. Detec.	não	não	sim	*	não
Lim. Quantif.	não	sim	não	*	não
Linearidade	sim	sim	não	*	não
Faixa	sim	sim	*	*	não
Robustez	sim	sim	sim	sim	não

* Pode ser exigido dependendo da natureza do ensaio específico

Nos casos de métodos normalizados não é necessário efetuar o processo completo de validação desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos e quando o produto em questão é o indicado em monografia oficial, como a USP por exemplo, in Bassani, 2004 . Conforme recomendação do FDA's Guidance for Industry,

2000, é necessário apenas verificar: a especificidade, a estabilidade da solução da amostra e a precisão intermediária. Alguns conceitos que respaldam essas recomendações:

- Abordagem para Métodos Normalizados

21 CFR 211 194 (a) (2) - Verificação

Que é a evidência documentada que um método previamente validado desempenha como pretendido, no ambiente em que está sendo aplicado.

- INMETRO DOQ-CGCRE-008 :2002

Demonstrar a competência do laboratório se atinge o pretendido e que opera bem sob as condições normais de uso. Na ilustração 3 é possível compreender o escopo da aplicação de uma validação, USP, fonte Bassani, 2004. Se o método atende ou não a sua finalidade.

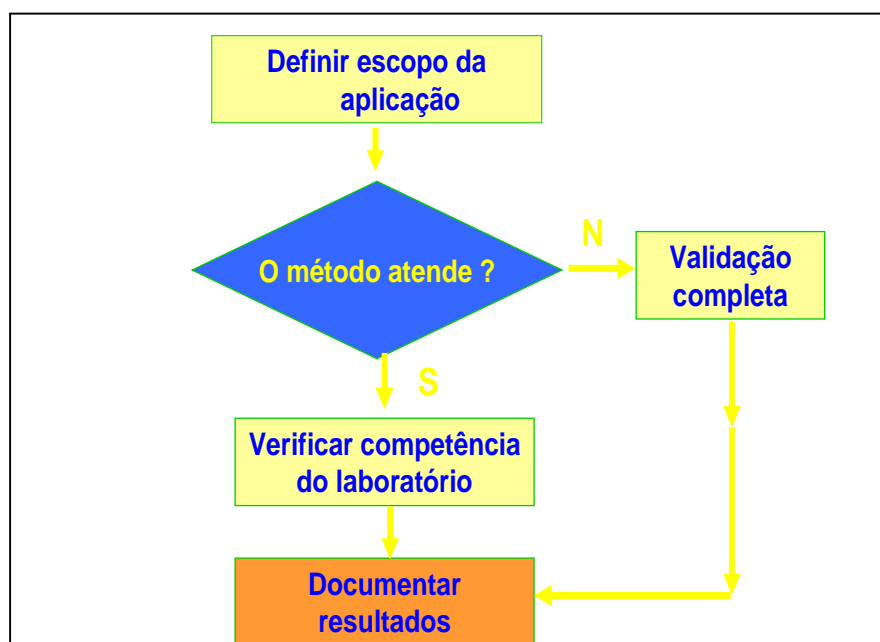


Ilustração 3: Método normalizado, segundo USP 25.

Como o método de determinação de condutividade (**Método III**), utilizado para o cálculo de incerteza, é um método normalizado, somente os seguintes parâmetros precisam ser verificados: a competência do Laboratório e o registro dos resultados. Porém para efeito de estudo será demonstrada a validação e harmonização entre as metodologias em estudo para esse trabalho. Foram verificadas a precisão intermediária e a robustez, através de dados de estabilidade, já que ele responde a categoria III.

Entendemos como **precisão** de um procedimento como o grau de concordância entre os resultados de uma medição, conforme VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia, 2003). É medida através da dispersão dos resultados individuais do meio e geralmente é expressa como sendo o desvio padrão ou o coeficiente de variação (desvio padrão relativo), quando o procedimento completo for aplicado repetidamente para separar amostras idênticas do mesmo lote homogêneo do material. Ela pode ser expressa pela repetitividade, pela reprodutibilidade e precisão intermediária. A **repetitividade** é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição - VIM, 2003. Já a **Reprodutibilidade** é entendida como o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições modificadas de medição. Alguns autores a especificam como a dispersão encontrada de um mesmo ensaio, realizado em diferentes laboratórios - ASTM, 2004. Para efeito de estudo foi demonstrado a codificação “**R**” para representar a reprodutibilidade e “**r**” a repetitividade, conforme recomendação de Horwitz, 1998.

A precisão intermediária é a forma de expressar as variações dentro de um mesmo laboratório, com dias de análises diferentes, ou analistas diferentes, ou até métodos diferentes (se for o caso), todos com um mesmo equipamento. Todas as variáveis sob a mesma condição de amostra ou padrão, com definição prévia de quais itens variarão de cada vez, INMETRO – DOQ – CGCRE – 008, 2003.

A precisão conforme a USP 27, *Validation Compendia Methods* <1225>

- Precisão intermediária e Reprodutibilidade – Precisão inter Laboratório com o mínimo de 6 determinações de amostra homogênea com concentração de 100% do analito em questão.
- Calculada pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD).

A **robustez** do método é a medida da sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método é robusto quando não apresenta variação a pequenas variações. Quanto maior for a robustez maior será a confiança de sua precisão, INMETRO – DOQ – CGCRE – 008, 2003.

A determinação do conteúdo de polissacarídeo (**Método tipo I**) em estudo, fora desenvolvido pela matriz do produto vacina contra Hib - na GlaxoSmithKline - Bélgica, e fora validado previamente. Neste método foram checados todos os parâmetros recomendados para validação da categoria tipo I, o que permitiu a adaptação e conseqüente validação em Bio-Manguinhos, com a aceitação de seus resultados. Na categoria I os critérios exatidão, precisão, seletividade, linearidade, faixa de trabalho e robustez, já foram previamente verificados. Para efeito de estudo alguns critérios foram revistos.

A **exatidão** é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro - VIM, 2003, poderá ser determinada mediante a aplicação do procedimento a amostras do material a ser examinado, que tenham sido preparadas com precisão quantitativa. Deverão também ser preparadas amostras em que o analisado seja incorporado em quantidades cerca de 10% superiores e em quantidade abaixo da variação de valores esperada. A exatidão poderá também ser determinada através da comparação dos resultados obtidos mediante a utilização de um procedimento alternativo que tenha sido anteriormente validado.

A **seletividade** ao contrário da especificidade é a capacidade do método em produzir resposta para vários analitos, porém as distingue de um analito para outro. Tanto a seletividade quanto a especificidade são relacionadas a detecção. Ambas as formas tentam abordar o mesmo problema o que medimos e o que pensamos que medimos. Já a **especificidade** pode ser entendida como a medida do grau de interferência, ou ausência da mesma, nas análises de matrizes complexas, sendo uma condição de exatidão. Por exemplo impurezas presentes ou condições de instabilidade de resultados, VIM, 2003.

A **linearidade** do procedimento analítico é a sua capacidade de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analisado na amostra, em uma faixa de concentração. Ela é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada no cálculo da concentração do analito, expressa pela equação da reta ,

$$y = a + bx \quad \therefore$$

y é a resposta medida, x a concentração (valor conhecido), a o coeficiente linear ou intercepto da linha de regressão e b o coeficiente angular ou inclinação da linha de regressão (slope). A tangente da reta, b , é um dos requisitos que torna possível medir a performance do método.

Conforme recomendação vigente, o coeficiente de correlação de uma curva de calibração, r , deve seguir os seguintes critérios:

O Critério de aceitação Ideal é: $r > 0,999$

e aceitável $r > 0,90$,

de acordo com INMETRO DOQ -CGCRE-008:2003.

Através da comparação de diferentes coeficientes angulares, que na verdade pode ser entendido como a tangente da função calibração, é possível avaliar junto com o desvio padrão residual, a sensibilidade, o desvio padrão e o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) do procedimento, as características de performance do método analítico, conforme ISO 8466-2, 1993.

A **faixa de trabalho** é estabelecida como a faixa utilizada ideal para a quantificação de interesse, de uma curva de calibração. Pode ser definida como de um décimo até o dobro do valor do limite de restrição ou de 50 a 150% do valor real da concentração do analito, de acordo com Thompson, 1999 e Inman, 1987, de 60 a 120%, conforme recomenda o FDA, Horwitz, 1998 e de 20 a 200%, como relata a ISO 8466, 1990 .

A precisão e robustez já foram definidas na descrição de validação do método III.

Quando não é possível preparar matriz limpa da amostra (branco), são recomendados ensaios de recuperação, para eliminar o efeito matriz. Para esses testes é feita a adição do componente de interesse à matriz seguida da execução do método que está sendo avaliado. Entende-se por recuperação como os testes que são realizados cuja finalidade é testar o analito e verificar se há interferências no método. O teor medido do componente adicionado é dividido pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100, obtendo-se assim a percentagem de recuperação. Este enfoque sofre com o fato que o analito (composto de interesse sendo

analisado) não sendo parte integrante da amostra, sua extração pode ser mais fácil que de uma amostra que o contenha naturalmente. Porém, os resultados deste tipo de teste quando associados a outros enfoques podem fornecer um panorama do comportamento do método com relação ao composto de interesse no tipo de matriz utilizada. Amostras formuladas sinteticamente e ainda, o método de adição, podem também ser empregadas no teste de recuperação, conforme recomendação da IUPAC, 2002, através da FAO/WHO.

A tabela 2 apresenta os valores aceitáveis de percentuais de recuperação de amostras nos testes de recuperação, de acordo com a concentração inicial estimada.

Tabela 2 - Percentuais de recuperação de amostras.

Concentração	Concentração Fracional	Recuperação média %
100 %	1,0	98 – 102
10 %	0,1	98 – 102
1 %	0,01	97 – 103
0,1 %	0,001	95 – 105
0,01 %	0,000 1	90 – 107
1 ppm	0,000 001	80 – 110
10 ppb	0,000 000 01	60 – 115

Poderemos sempre perguntar: Quando os resultados podem ser considerados bons? Esta é uma pergunta que qualquer analista se faz. A resposta está na equação desenvolvida por Horwitz para precisão.

Na década de 80, William Horwitz publicou um estudo dos métodos colaborativamente estudados e aceitos pela “Association of Official Analytical Chemists”(AOAC). Ele demonstrou que o coeficiente de variação ou RSD inter laboratorial de qualquer método não depende do instrumento utilizado, da matriz, ou técnica empregada e sim do teor em que o componente analisado se encontra no composto e que pode ser descrito pela equação denominada como função de Horwitz, AMC Technical Brief No 17, 2004:

$$CV (\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

A concentração C é expressa como potência de 10. Por exemplo: 1 mg/Kg (ppm) = 10^{-6} g/kg, o que nos dá um CV % = 16%. Para o analista é útil conhecer ainda algumas outras propriedades do método analítico que pretende empregar. O conceito de limite de detecção tem sido objeto de diferentes definições conforme a área de trabalho. É bom saber que o próprio analista pode criar sua própria definição de limite de detecção desde que expresse claramente qual é o seu conceito desta medida. De uma maneira geral pode-se definir como limite de detecção a menor concentração do analito da qual podemos estar confiantes na sua medição. Uma boa definição é proposta por Caulcutt e Boddy os quais nos diz ser o limite de detecção a menor concentração do analito da qual temos 95% de confiança que será detectada pelo método. Uma outra definição é ainda fornecida pelo Codex Alimentarius, 2002, que declara ser o limite de detecção convencionalmente aceito como 3 vezes o desvio padrão do branco da amostra. Limite de quantificação tem sido usualmente definido como 5 vezes o limite de detecção, como declarado na tabela 3, com os limites de quantificação.

Tabela 3 - Atualização da Curva de Horwitz (AOAC , 2000).

Concentração	Concentração Fracional	RSD r %	RSD R %	Exemplo
100 %	1,0	1,0	2,0	Compostos puros
10 %	0,1	1,5	2,8	Macro nutrientes
1 %	0,01	2,0	4,0	Prod. Farmacêuticos.
0,1 %	0,001	3,0	5,7	Micro nutrientes
0,01 %	0,000 1	5,0	8,0	Vitamina C de alimentos.
1 ppm	0,000 001	10	16	Resíduo de Pesticidas.
10 ppb	0,000 000 01	20	32	Aflatoxinas

Onde RSD_r = desvio padrão relativo intra laboratorial (repetitividade) e RSD_R corresponde a precisão inter laboratorial (Reprodutibilidade ou precisão intermediária).

Ao empregar material de referência certificado, deve-se escolher aquele cujas matrizes (sejam os materiais que contêm tudo menos o composto de interesse) mais se aproximem do tipo de amostra para o qual o método que está

sendo testado será usado. A ISO Guia 30, define material de referência como um material ou substância na qual uma ou mais propriedades estão suficientemente estabelecidas para serem usadas para a calibração de um instrumento, avaliação de um método analítico ou para designar valores a materiais. Neste sentido, cada laboratório pode criar seus próprios materiais de referência para o controle de qualidade rotineiro. Para a validação de métodos, no entanto, emprega-se material de referência certificado, onde teores de uma ou mais propriedades estão certificados por procedimentos tecnicamente válidos, acompanhados por um certificado proveniente de um organismo certificador acreditado. Alguns exemplos de organizações que fornecem materiais de referência certificados: Community Bureau of Reference (União Européia), Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Reino Unido), National Institute for Standards and Technology (antigo National Bureau of Standards, EUA), National Research Council (Canadá), National Institute for Environmental Studies (Japão), entre outros.

Avaliação interlaboratorial de um método é realizada através de um estudo colaborativo. O protocolo para execução destes estudos foi harmonizado pela ISO, IUPAC e AOAC e é reconhecido pelo Codex Alimentarius - dentro da União Européia. Neste programa, uma ou várias amostras homogêneas são distribuídas a laboratórios, onde a análise é executada por analistas experientes. Os resultados vão indicar a exatidão do método, sua precisão interlaboratorial (**R, reprodutibilidade**) e intralaboratorial (**r, repetitividade**). Métodos estudados colaborativamente são publicados por entidades governamentais ou privadas que se dedicam a este tipo de estudo.

Segundo os protocolos normalizadores citados, as condições para a realização de um estudo interlaboratorial são: participação de oito ou mais laboratórios, utilização de amostras homogêneas e representativas do produto e um mínimo de cinco materiais diferentes distribuídos entre os laboratórios participantes, com um mínimo de um par de duplicatas “cegas” e analistas competentes para executar a análise. A média de todos os resultados é considerada a melhor estimativa da quantidade do composto a ser determinado.

O LAFIQ participou de Estudos Colaborativos com a FEEMA no ano de 2003 e 2005, em análises físico-químicas de água.

É oportuno lembrar que estudos interlaboratoriais podem servir para várias finalidades, tais como: prover estimativas da repetitividade e da reprodutibilidade de um método analítico, prover uma estimativa objetiva do desempenho do Laboratório, encorajar a autocrítica e a percepção dos erros cometidos durante análises e sobretudo ajudar na identificação das necessidades de treinamento de pessoal.

Em alguns setores da Química Analítica é agora uma exigência formal (legislativa), que os laboratórios introduzam medidas de garantia da qualidade para assegurar que são capazes e estão aptos a fornecer informação com qualidade confiável. Tais medidas incluem: o uso de procedimentos com controle interno de qualidade bem definido, participação em testes de competência – com crédito baseado na NBR ISO/IEC 17025, 2001 e estabelecimento da rastreabilidade dos resultados das medições através de relatórios e suas validações.

Até agora foi abordado a importância de validar uma metodologia analítica, porém qual é a validade desse relatório gerado? Existem algumas questões que precisam ser verificadas habitualmente no Laboratório. Foi sempre pensado que a cada intervenção de manutenção, por exemplo, seria necessária uma revalidação de um determinado método. Sabemos agora que não é bem assim. Se o escopo da validação prévia foi alterada é importante verificar esses parâmetros modificados e se ainda atendem ao método e aplicação propostos. De acordo com Furman, W, 1998, existem fatores que ocasionam modificações significantes em resultados de um método analítico, tais como: análise de um novo produto ou nova formulação, troca de condições principais de operação, por exemplo, novo analista, uso de colunas de configurações e tamanhos diferentes, temperatura de análise para métodos cromatográficos e sobretudo a troca de módulos de equipamento e softwares de cálculos que possam influir predominantemente no resultado final. Se houverem intervenções num equipamento, validado, porém se estas mantiverem as mesmas condições previamente definidas - aplicabilidade e operacionalização do sistema fidedigna, o método continua mantendo suas características de validação, Inman E, 1987; NBR ISO/ IEC 17025, 2001; FDA, 2002.

1.5 - A Incerteza

Atualmente, diferentes setores da indústria, da saúde, da área de meio ambiente, entre outros, utilizam os resultados de análises gerados em laboratórios químicos para a tomada de decisões. Com base nestes resultados, aceitam-se ou rejeitam-se matérias primas, diferenciam-se desempenho de fornecedores, processos produtivos são modificados, atua-se sobre a saúde das pessoas e dos animais.

Deste modo, os resultados das análises devem ser “bons”, ou melhor, devem apresentar “qualidade aceitável” em função dos objetivos requeridos. Mas como podemos definir melhor estas medições de boa qualidade? Caso os resultados analíticos tivessem sido expressos apenas como médias, eles não poderiam ter sido comparados com o valor de referência. Apenas quando as médias estão acompanhadas de suas incertezas, é possível tomar as decisões adequadas. Resultados médios sem as respectivas incertezas carecem de significado porque não dão a informação completa sobre a medição.

Entende-se por incerteza, “o parâmetro, por exemplo o desvio-padrão (ou um múltiplo dele), ou a metade de um intervalo correspondente a um nível aceitável da confiança estabelecido, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando” – conforme o “Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia – VIM”.

A atual preocupação da ciência da medição química é representada pela questão da estimativa da incerteza associada aos resultados obtidos experimentalmente. Esta preocupação originou-se nos laboratórios analíticos prestadores de serviços, visto que a estimativa das incertezas é exigida por critérios para o reconhecimento formal da competência técnica de laboratórios. Esta questão é assunto ainda bastante controverso no meio científico. Até mesmo o significado do termo “incerteza” ainda não é perfeitamente entendido por muitos químicos, que costumam confundir-lo com a repetitividade - Horwitz, W, 1998 FDA.

Quando é estabelecido um grau de confiança, pode-se determinar a incerteza combinada expandida, através do critério do intervalo de confiança,

utilizando um fator de abrangência, k . Na maioria dos casos, usa-se o valor de $k = 2$ correspondentes ao estabelecimento do nível de confiança de aproximadamente 95%.

A ilustração 4 é um exemplo de ilustração gráfica da avaliação de incerteza padrão tipo A de uma grandeza a partir de observações repetidas -INMETRO - Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, 2003.

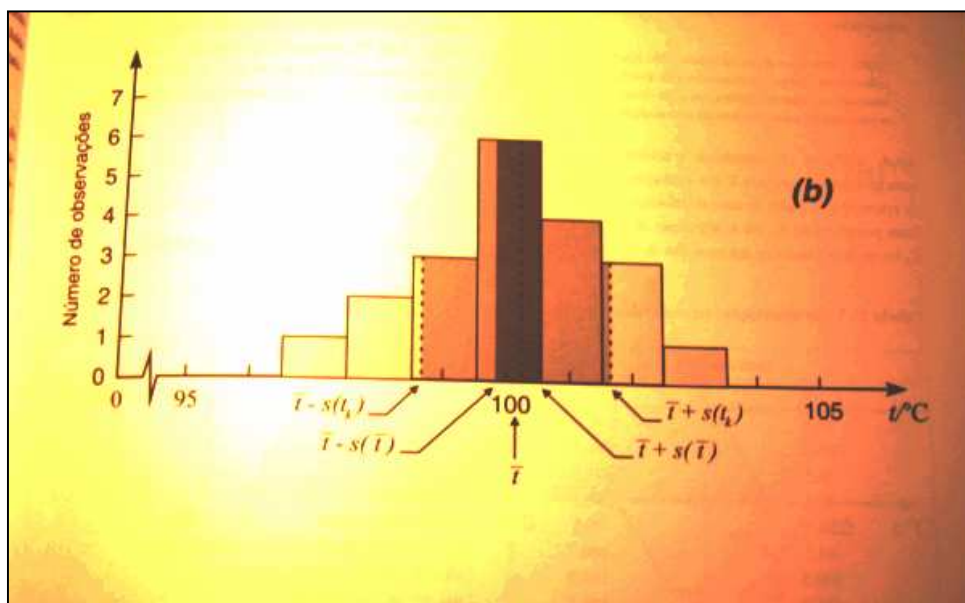


Ilustração 4: Avaliação gráfica da incerteza padrão de medição.

Entre as principais fontes geradoras de variabilidade em análise química estão a amostragem, a preparação da amostra em laboratório, a extração ou digestão, a pré-concentração de volume e a calibração de instrumentos.

A rigor, todo fator que contribui para a incerteza final do resultado analítico deve ser considerado.

Através de estimativas de incerteza é possível obter resultados com maior aceitação estatística e menor erro, sendo que fazer uma medida consiste em "cercar" um valor verdadeiro. Assim se pode entender porque um valor medido só tem sentido quando acompanhado de sua incerteza, que representa o intervalo de confiança atribuído ao resultado. A comparação direta não é sempre possível; em conseqüência deve-se considerar uma relação (lei física) entre a grandeza a ser medida e outras grandezas conhecidas ou mensuráveis diretamente.

Com diferentes abordagens porém de forma válida e igualmente aceitas, as estimativas de incerteza podem ser vistas de duas maneiras distintas, a visão dos químicos e a dos metrologistas. Existe uma tendência dos químicos analíticos, em aproveitar dados obtidos no estudo de validação dos métodos. Por outro lado, os profissionais da área de metrologia utilizam a estimativa através da transferência de abordagem usando métodos físicos, para processos metrológicos em química, ou seja, utilizando resultado por resultado de cada componente. Contudo, de ambas as formas, deve ser igual em todos os processos de medição, seja quimicamente ou metrologicamente considerada.

Como relata Horwitz, 1998, a incerteza está sempre correlacionada a tipos de erros, sejam eles sistemáticos - bias, ou aleatórios - randomizados. Há algum tempo na química analítica os erros sistemáticos vem sendo minimizados com o uso contínuo de instrumental calibrado e certificado. Como exemplo disso temos a linha de base na cromatografia e o "drift" - correção de leitura de display em um condutivímetro. Com essas correções prévias estudos comprovam que os erros que se somam aos resultados analíticos são basicamente aleatórios e permitem eximir a expressão de erros sistemáticos. Contudo os erros aleatórios podem ser provenientes de analistas, preparo e injeção de amostras, curvas de calibração e software de cálculos não validados.

Na literatura pertinente, diferentes abordagens de estimativas de incerteza são encontradas:

- O guia preparado pelo NMKL, "Nordic Committee on Food Analyses", baseia-se na determinação da estimativa de incerteza pelo intervalo de confiança através da medida de precisão intermediária e a média obtida nas repetições. Rejeita a hipótese de usar erros sistemáticos para o cálculo da incerteza e recomenda que a estimativa de incerteza seja feita por dados de um único laboratório, de acordo com Horwitz, 1998.
- O guia ISO/TS 21748 in AOAC, 1998, baseia-se na utilização de dados de estudos colaborativos, através da reprodutibilidade. Porém é necessário verificar a presença de erros sistemáticos com regras previamente estabelecidas.

- Conforme o guia IUPAC/ISO/AOAC, 1999, é sugerido o uso do desvio-padrão calculado a partir da reprodutibilidade, expresso como incerteza combinada padrão.
- Já a NBR ISO/IEC 17025, 2001, considera outras abordagens para a estimativa da incerteza de medição em ensaios, diferentes da anterior que estima componente por componente. Nesta Norma, tanto os dados de precisão intermediária, da repetitividade quanto os da reprodutibilidade, através de estudos colaborativos, podem ser utilizados.
- O guia EURACHEM/ CITAC, 2001, recomenda o uso de dados de repetitividade, precisão intermediária, reprodutibilidade como fontes de dados de estudos e inter laboratoriais, através do desvio-padrão, para as estimativas de cálculo da incerteza padrão, padrão combinada e padrão combinada expandida.
- FAO/ WHO, 2002, recomenda o uso do intervalo de confiança para a expressar a incerteza de medição. Com dados de desvio-padrão provenientes de dados de precisão obtidos após estudo de validação, correlacionada a erros aleatórios.
- O INMETRO, 2003, agrupa os componentes da incerteza em duas categorias tipo “A” e tipo “B”. Essas duas são baseadas no método de avaliação e se aplicam à incerteza e não são substitutas para os termos aleatórios e sistemáticos. A incerteza de correção de um efeito sistemático conhecido pode em alguns casos ser obtida por uma avaliação do tipo A, enquanto que em outros casos, por uma avaliação do tipo B, podendo-se assim obter do mesmo modo a incerteza que caracteriza um efeito aleatório. A primeira, tipo A, é obtida a partir de uma função densidade de probabilidade e só existe se houver um controle estatístico, através de cartas de controle. A segunda, tipo B, é obtida de uma suposta função densidade de probabilidade, baseada no grau de credibilidade de que um evento vá ocorrer, sendo portanto chamada de probabilidade subjetiva.

- A AMC, 2004, de acordo com Horwitz prevê o cálculo de incerteza para métodos analíticos e questiona o custo da metodologia em estudo.

Laboratórios normalmente constroem a curva de calibração com 4 a 5 pontos ao longo da faixa de trabalho desejada, com algumas repetições em cada ponto. A média aritmética é o valor aceito e o desvio-padrão da média é calculado para cada ponto, sendo que a incerteza pontual é dada pelo intervalo de confiança da média, estabelecido o grau de confiança desejado. Calculadas desta maneira, as incertezas não são representativas para a curva de calibração como um todo; trata-se de incertezas pontuais, e nada se pode afirmar quanto aos pontos intermediários da curva. O uso da análise pela variância do resíduo está sendo amplamente difundido para calcular a incerteza ao longo da curva de calibração. A dispersão das medições deve ser independente da concentração das soluções de referência, que é a propriedade conhecida como homoscedasticidade em y , onde o cálculo de concentração é proveniente da reta de linearidade. Deve ser válido o pressuposto de que a variância é constante nos erros aleatórios, ou randomizados, já que os erros sistemáticos tendem a ser mínimos nos métodos químicos que utilizam instrumental calibrado.

Se por acaso a variável independente x estiver sujeita a erros, estes devem ser desprezíveis quando comparados aos erros em y . Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa efetuam-se os testes para verificação de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima, de acordo com dados da “Analytical Methods Committee” (AMC), 2000 e INMETRO, 2003. A análise de variância uni variável, tabela de ANOVA, é uma ferramenta importante para este estudo. Antes de utilizarmos a função calibração estabelecida pela teoria dos mínimos quadrados, é preciso testar a linearidade, procedendo-se à comparação de variâncias. O teste é feito através do cálculo da razão das médias quadráticas.

Na prática a estimativa de incerteza é baseada na teoria dos erros, onde ela é função das variáveis. Embora elas não signifiquem a mesma coisa, mas correspondem a variação aceita em torno de um resultado correto e podem ser expressas pelo menos por três formas.

Incerteza - é expressa através do desvio padrão.

Ela pode ser dada por: $\mu \pm \sigma$, onde μ é a média das medidas e σ o desvio-padrão da média da população, se este for igual ao desvio-padrão da média, S , então o desvio-padrão da média pode ser assumido como $\sigma = S$. Ela pode ser utilizada quando se conhece a natureza da amostra, sua estabilidade e as medições do analito em questão estar sob controle estatístico, então é entendida como **incerteza padrão tipo A**. O desvio- padrão deve ser determinado após conhecer a repetitividade do método e reprodutibilidade entre técnicos ou Laboratórios, a um grau de liberdade finito, conforme manual de Incerteza do INMETRO, 2003 e guia IUPAC/ISO/AOAC, 2002. Dividindo o valor do desvio-padrão encontrado pela raiz quadrada do número de determinações.

Incerteza padrão tipo B - é a combinação de várias fontes de incerteza de um método analítico como a provável probabilidade de um resultado correspondente ao grau de liberdade “ ∞ ”. Elas podem ser provenientes de: dados de medições prévias, conhecimento prévio de comportamento de instrumentos, certificados de calibração e qualificação de equipamentos, dados de fornecedores, incertezas de manuais entre outras, que não seja conhecido o grau de confiança ou o tratamento estatístico dos dados. Cada técnico deve saber identificar as fontes de incerteza de cada método e que não devem ser negligenciadas. Os componentes de incerteza possuem distribuição de probabilidade peculiar de cada grandeza. Todas as fontes dessas incertezas devem estar com distribuição normal ou serem normalizadas.

Para transformar os valores de desvio-padrão da média em incertezas padrão com probabilidade normal, deve-se dividir o valor encontrado, seja do tipo A ou B pelo fator de probabilidade correspondente ao grau estimado. Por exemplo, para 95% de confiança , o valor deve ser dividido por $k= 1,96$ (fator de abrangência).

Dados de desvio-padrão sem o grau de confiança declarado podem ter:

- distribuição de probabilidade triangular, ou seja, quando pode-se estimar as fronteiras (limites superior e inferior) e a maioria dos resultados decai sobre os extremos do gráfico. Portanto, para sua normalidade de distribuição, o valor pode ser considerado dividindo o valor da incerteza padrão por $\sqrt{6}$. Por exemplo a declaração de um valor sem nível de confiança declarado.
- Se a distribuição de probabilidade for do tipo retangular, onde suas fronteiras permitirem estimativa de valores de limite superior, inferior da dispersão dos valores sem informações suficientes para estimar o valor da probabilidade, sua normalização será dividir o valor da incerteza padrão por $\sqrt{3}$.
- E a distribuição bimodal, quando somente é possível estimar as fronteiras do valor de entrada de grandeza e sua probabilidade de encontrar o valor verdadeiro que está na extremidade dos intervalos. Normalizando essa distribuição divide-se a incerteza padrão por $\sqrt{2}$.

Fonte EURACHEM, 2002.

A incerteza padrão combinada total de um método é expressa pela soma quadrática das incertezas padrão de cada componente, como por exemplo as incertezas de entrada e saída com a mesma unidade. Expressa por :

$$u_c = \sqrt{u(a)^2 + u(b)^2 + \dots + u(n)^2}$$

Sendo a,b,...,n as fontes de incerteza e u(a),u(b),...,u(n) os valores das incertezas padrão de cada componente.

Quando as grandezas de entrada não têm a mesma unidade das de saída, deve-se utilizar a regra da normalização da distribuição retangular.

Incerteza padrão expandida - É a combinação de todos os níveis de incerteza, porém a um nível aceitável de confiança de 95 a 99%.

Para se calcular é necessário multiplicar a incerteza combinada por um fator de abrangência que permitirá a definição de um intervalo com nível de confiança maior. Contudo será preciso estimar o número de graus de liberdade, que depende do tamanho da amostra. Ao conhecermos o número do grau de liberdade, maior será a probabilidade de que o valor verdadeiro esteja dentro de uma faixa de incerteza estimada.

O número de graus de liberdade para **incertezas tipo A** é dado pela equação:

$$v_i = n - 1$$

Sendo v_i o número de graus de liberdade do conjunto i de medidas e n o número de medidas do conjunto.

Para **incertezas tipo B**, como a probabilidade de graus de liberdade no interior da distribuição deve ser máxima, ao contrário da parte externa desse intervalo, deve ser mínima.

Então, para as **incertezas tipo B**, pode-se padronizar como sempre infinito:

$$v_i \rightarrow \infty \therefore v_i = \infty$$

Observação: Se houver diferença entre os graus de liberdade do tipo A e o B, dos dados; Se por exemplo a do tipo A for finito e a do tipo B infinito. Deve-se calcular como:

$$v_{ef} = \frac{[\mu_c(y)]^4}{\sum_{i=1}^n \frac{[\mu_i(y)]^4}{v_i}} \therefore$$

v_{ef} = Graus de Liberdade

$\mu_c(y)$ = Incerteza combinada do método

μ_i = Incerteza padrão da componente i

ν_i = Graus de liberdade da componente i

Fonte Manual do INMETRO, 2003.

Atualmente, o usual é a expressão da estimativa de incerteza expandida ser dada pela multiplicação do valor da incerteza padrão combinada por $k = 2$. Assumindo um valor de k médio.

$$U = \pm u \times k$$

EURACHEM, 2002.

1.6- A Condutividade

A condutividade de uma solução eletrolítica é a expressão numérica quantitativa da sua capacidade de transportar a corrente elétrica. Ela é definida como sendo o inverso da resistência elétrica de 1cm^3 do líquido a uma temperatura de 25°C . Entendendo como condutividade a propriedade de conduzir eletricidade, através de seus íons em solução. Ela é definida com o inverso da resistividade e tem como unidade de medida, $\mu\text{S}/\text{cm}$.

O mecanismo responsável é o transporte de cargas elétricas na solução através dos íons. Todos os íons presentes na solução participam dessa condução e, por essa razão, pode-se dizer que a condutividade fornece uma informação global, por natureza não específica. A maioria dos ácidos, bases e sais inorgânicos são bons condutores da corrente elétrica ao passo que substâncias orgânicas, que não se dissociam em solução (benzina, gasolina, açúcares por exemplo), não são boas condutoras.

A condutividade depende de vários fatores:

- Da concentração global em espécies ionizadas. Quanto maior a quantidade de íons numa solução, maior será sua condutividade. Em geral, para soluções aquosas de eletrólitos inorgânicos, observa-se um aumento quase linear da

condutividade com o aumento da concentração (até concentrações de 10 ou 20% em peso).

- Do tipo de íons.

Quanto menor o íon, maior será sua mobilidade e, portanto, maior sua condutividade. Para diâmetro igual, íons bivalentes e trivalentes conduzem mais que os íons monovalentes.

- Da natureza do solvente;

Solventes polares (água, amônia, álcool metílico, etc.) exaltam a ionização das substâncias dissolvidas e, portanto, favorecem a condutividade.

- Das interações entre o solvente e os íons dissolvidos.

Um solvente muito polar, como a água, pode ser visualizado como um conjunto de dipolos elétricos em permanente movimento caótico. A tendência dos dipolos associarem-se com íons é tanto maior, quanto menor forem os íons. É o caso do íon Cs^+ (Césio), relativamente pequeno, que fixa facilmente as moléculas de água, tornando-se hidratado e, conseqüentemente, pouco condutor.

- Da temperatura.

Ao contrário da condutividade metálica, a condutividade eletrolítica aumenta com a temperatura. De modo geral esse efeito é devido ao fato de que a mobilidade individual dos íons aumenta com a temperatura e que a viscosidade do solvente diminui. Para soluções aquosas, o coeficiente de temperatura da condutância iônica varia entre 0,5 e 5% por grau centígrado, dependendo do tipo e da concentração do íon condutor. Erros muito significativos podem ser cometidos na medição da condutividade se esse efeito não for compensado (manual ou automaticamente), dependendo do equipamento, condutímetro.

Suas aplicações podem ser vistas como inúmeras:

- Controle da pureza em água destilada e deionizada, condensados, substâncias orgânicas;
- Determinação dos eletrólitos residuais em água potável, água desmineralizada, água para alimentação de caldeiras, efluentes;
- Concentração de sais em banhos de salmoura, salinas, fertilizantes, fibras e têxteis, banhos de anodização, galvanização e eletrodeposição, soluções fisiológicas (diálise), alimentos e sucos de frutas;

- Força de ácidos e bases em processamento dos ácidos e bases inorgânicos diluídos e concentrados e soluções alcalinas corrosivas;
- Contaminações de sais em trocadores de calor, circuitos de arrefecimento;
- Processamento químico e detecção do final de lavagem de precipitados, determinação da solubilidade de sais pouco solúveis, titulações condutométricas.

A célula é um dos elementos mais importantes de um sistema de medição da condutividade. Basicamente, ela consiste em duas placas metálicas cujas áreas e distância são precisamente fixadas, montadas rigidamente numa cavidade construída em material isolante, vidro ou plástico. Essa cavidade serve para delinear um pequeno volume constante do líquido a medir e, conseqüentemente, torna a medição da condutividade independente do volume total da amostra e da proximidade de superfícies tais como paredes de tanques ou tubulações. As placas metálicas, chamadas eletrodos, são construídas em metais nobres, geralmente platina, e são revestidas por um depósito eletrolítico de negro de platina. Esse depósito poroso limita os efeitos da polarização, conforme manual do condutímetro Metrohm.

A determinação da condutividade elétrica de uma solução consiste então basicamente na medição da sua resistência elétrica. Para obter precisão e sensibilidade nessa medição, é necessário que o valor da resistência eletrolítica se mantenha entre determinados limites. No caso de medição e controle da condutividade em processos industriais, para os quais são toleráveis erros de mais ou menos 1%, é desejável que a resistência medida situe-se entre os limites aproximativos de 100 até 100.000 Ohms. O critério usado na seleção de uma célula é que ela tenha uma constante tal que a resistência da solução em teste esteja dentro desses limites. Na prática, a aplicação desse critério leva a escolher uma célula com baixo valor da constante para medir soluções de baixa condutividade e alto valor da constante para soluções de condutividade elevada.

As moléculas de água dissociadas em íons em função do pH e da temperatura resultam na medida da condutividade. Ela pode ser afetada pela contaminação gasosa, por exemplo o dióxido de carbono dissolvido em água, que altera a medição. Os íons estranhos à amostra - WFI, representados por íons cloretos e íons sódios, comumente encontrados em índices residuais em águas cuja

concentração teórica máxima permitida é de 0,47ppm (mg/L) e 0,3 ppm (mg/L) de íon amônio em solução, em balanço com os intrínsecos, são responsáveis pela eletroneutralidade e pureza química da água para uso farmacêutico. A combinação dos íons existentes e os desconhecidos em função do pH, estão descritos no terceiro estágio de medição da Farmacopéia Americana, USP 27. Os dois preliminares estágios de medição, inclusos nessa monografia, são requerimentos para esse teste. Se os dois primeiros são satisfatórios não haverá necessidade de passar ao terceiro. Porém o último torna-se necessário caso tenha havido resultados falhos, dentro do limite de condutividade especificado, conforme USP 27.

Através das medições diárias de condutividade no Laboratório, a água purificada, WFI, que é um dos parâmetros a ser estudado, método III, é fator primordial de qualidade. Ela é o princípio de tudo, sendo base e veículo de diversos processos produtivos e de Controle de Qualidade. Para uso farmacêutico, ela exige tratamento de alta pureza para assegurar que não haja interferência de contaminantes que afetem a qualidade das drogas e imunobiológicos produzidos para injeção, o que é crucial para sua eficácia e para a saúde.

Embora as diferentes farmacopéias descrevam vários tipos de águas para uso farmacêutico, em linhas gerais pode-se dividi-las em dois grandes grupos: a Água Purificada (PW: *Purified Water*) e a Água para Injeção (WFI: *Water for Injection*). Conforme a Farmacopéia Americana a tabela a seguir demonstra o comportamento aceitável, para o primeiro estágio de condutividade. Caso os valores medidos não estejam claramente definidos a seguir, os resultados não atendam à primeira verificação, outros dois estágios de medição são recomendados, conforme procedimento de análise de WFI, pop 106040.617. Podem ser também aceitos resultados que estejam no estágio 2 e 3, sendo que a aceitação no primeiro exclui a utilização dos próximos subseqüentes. Estes parâmetros foram descritos primeiramente na farmacopéia americana, USP 23, como revisão anexa, efetivados na USP 24 e em suas subseqüentes versões de revisões, USP 25, 26 e 27, que é a última vigente, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Relação de medidas de condutividade do estágio 1.

USP 24, Estágio 1:		
Condutividades requeridas em diferentes temperaturas¹		
Temperatura (°C)	Temperatura (°F)	Condutividade requerida ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)
0	32	0.6
5	41	0.8
10	50	0.9
15	59	1.0
20	68	1.1
25	77	1.3
30	86	1.4
35	95	1.5
40	104	1.7
45	113	1.8
50	122	1.9
55	131	2.1
60	140	2.2
65	149	2.4
70	158	2.5
75	167	2.7
80	176	2.7
85	185	2.7
90	194	2.7
95	203	2.9
100	212	3.1

1. Somente para medições sem compensação de temperatura
2. $\mu\text{S}/\text{cm}$ = microSiemens por centímetro = micromhos por centímetro
($\mu\text{mho}/\text{cm}$) = recíproco de megohm-cm
FONTE: *Pure Water Handbook*, Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota, EE.UU.,
Appendix D, pp. 112-115.

Para o estágio 2, é recomendada a agitação por 5 minutos da amostra, com a finalidade de haver contaminação controlada, por gás carbônico, CO_2 e medir novamente a condutividade. Caso não atenda ao critério de medida, que corresponde ao valor menor que $2,1 \mu\text{S}/\text{cm}$, é necessário passar a amostra para o estágio 3 de medição de condutividade. Este remete à comparação com valores de pH, conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Estágio 3 de condutividade.

USP 24, Estágio 3: Requerimentos de pH e Condutividade ¹	
pH	µS/cm²
5.0	4.7
5.1	4.1
5.2	3.6
5.3	3.3
5.4	3.0
5.5	2.8
5.6	2.6
5.7	2.5
5.8	2.4
5.9	2.4
6.0	2.4
6.1	2.4
6.2	2.4
6.3	2.3
6.4	2.3
6.5	2.2
6.6	2.1
6.7	2.7
6.8	3.1
6.9	3.8
7.0	4.6

1. Somente para medições sem compensação de temperatura.
 2. µS/cm = microSiemens por centímetro = micromhos por centímetro (µmho/cm) = recíproco de megohm-cm
 FONTE: Pure Water Handbook, Osmonics Inc., Minnetonka, Minnesota, EE.UU., Appendix D, pp. 112-115.

Os dois tipos de água são definidos da mesma forma do ponto de vista químico, porém diferem quanto aos requisitos de pureza microbiológica. A introdução das normas contidas na USP 23, e reafirmadas na USP 24, significou uma mudança importante nas exigências de controle para águas farmacêuticas. Na USP 23 a recomendação para produção de WFI poderia ser através de osmose reversa e destilação. Porém na USP 24 já é recomendada a produção de WFI somente proveniente de destilação. Qualquer outro tipo de processo de purificação caracterizaria a produção de água purificada e não para uso injetável. Até o surgimento das normas contidas na USP 23, com os parâmetros confirmados na USP 27, em 2004, os controles a que se devia submeter uma água para uso farmacêutico eram os ensaios qualitativos de laboratório, nos quais o seu conteúdo químico era analisado com base em análise relativamente simples, com resultado de “aprovado” ou “não aprovado”. Conforme a tabela 6, os parâmetros de qualidade de

uma água potável que é submetida ao processo de retirada de íons com deionização, seguida de destilações múltiplas.

Tabela 6 - Requerimentos de Qualidade Química conforme Portaria 1469 de 29/12/2000 – Ministério da Saúde, para água potável, USP 26 água purificada e destilada e pop 106040-617.

Carac. tipos	Odor	pH (25°C)	Cor	Condut. (µS/cm)	Cloreto	Dureza Total	Nitritos e Nitratos	Sólidos dissolvidos	Ferro	Sulfato	*TOC
Potável	Nenhum	6,5-8,5	<15uH	–	<250ppm	<500ppm	<1000ppm	<1000ppm	<0,3ppm	<400ppm	–
Deionizada	nenhum	5,0-7,0	incolor	<1,3	<1,0ppm	–	<0,2ppm	–	–	–	<500 ppb
Destilada (WFI)	–	“	“	<1,3	–	–	–	–	–	–	<500 ppb

*TOC – Carbono Orgânico Total

Os equipamentos utilizados para esse estudo, fotômetro, analisador de carbono orgânico, potenciômetro e condutímetro são rigorosamente calibrados, com padrões, de acordo com as BPL. Essa calibração deve possibilitar rastreabilidade das medidas de grandezas físicas fundamentais com os padrões. Os certificados de calibração devem referir-se a padrões de medida nacionais ou internacionais da mesma forma. Se uma unidade operacional mantém tais padrões, estes devem ser calibrados por órgãos competentes a intervalos periódicos.

1.7 - A cromatografia de íons

A denominação inicial de cromatografia era que um sistema poderia separar um tipo de produto em frações, por diferença de cor, daí a origem do nome.

Ela consiste de um método físico-químico de separação de fases, sendo uma estacionária e a outra chamada de móvel, esta última é eluída e transpassa através da anterior quando submetida a determinada pressão. Daí sua denominação, cromatografia líquida de alta performance, advinda da denominação de cromatografia líquida de alta pressão - *high performance liquid chromatography* - HPLC.

A técnica de cromatografia de íons, troca iônica, é baseada na interação reversível entre a carga da amostra e a do meio, que são as resinas das colunas cromatográficas, pela diferença de pH - chamada "*ions exchange chromatography*". O método é utilizado para separação e quantificação de íons com base em resinas de troca iônica. As resinas utilizadas nas colunas de separação têm interação com a amostra e afinidade, por competição de cargas com o eluente.

De acordo com o *The United States Food and Drug Administration* (U.S.FDA), agência regulatória do Estados Unidos, é requerido que produtos farmacêuticos devam ser testados para garantir sua composição e verificar sua identidade, qualidade e pureza. Muitos desses ingredientes ativos não têm cor, não são cromóforos, portanto não podem ser detectados por absorvância. É o caso dos carboidratos, glicóis, açúcares, álcoois, grupamentos aminados e compostos sulfurados. Eles devem ser oxidados e detectados por amperometria. O método de detecção é específico para esses tipos de analitos que após oxidação resultam em monômeros ou compostos transparentes. A detecção amperométrica é uma poderosa técnica com limites muito baixos de detecção.

A aplicação da cromatografia com detecção por amperometria pulsada, é baseada no diferencial amperométrico e é denominada cromatografia de troca iônica e utiliza diferentes tipos de colunas para vários tipos de produtos. As colunas do tipo carbopac PA 10, utilizadas para análises de carboidratos, são compostas pelo polímero poliestireno divinilbenzeno sulfonado e características hidrofílicas moderadas. Seu mecanismo de retenção possibilita a exclusão iônica, a exclusão estérica e a adsorção. Seu empacotamento, processo de enchimento de recheio,

consiste de 460 nm de diâmetro de látex do substrato de poliestireno divinilbenzeno tipo “*crosslinked*” - tipo enovelado, com ligação cruzada. Sua natureza é específica para designar alta seletividade para monossacarídeos e sua capacidade de troca iônica é de 100 µeq/ coluna.

O objetivo da utilização dessa metodologia é o estudo da quantificação do teor da vacina, através da medida das subunidades do polissacarídeo poliribosilribitol, oriundo de carboidratos como fonte de carbono, proveniente do metabolismo de fermentações bacterianas, misturas de nutrientes e massas celulares. Esse açúcar de alto peso molecular é o produto característico de interesse da vacina *Haemophilus influenzae* tipo b, Hib.

Após despolimerização com hidróxido de sódio as subunidades geradas, a partir da separação das frações pelo método cromatográfico descrito, são quantificadas por detector de amperometria pulsada. Os resultados encontrados são analisados pelo cálculo das áreas dos picos de seus cromatogramas. As condições de análise e seus materiais estão descritas na metodologia em estudo.

A dosagem do polissacarídeo, poliribosilribitol fosfato é fator importante para medir a concentração do soluto da vacina. Este confere a integridade e é através dessa quantificação que é possível verificar se o produto está apto para uso. Através desse valor, associado a seu peso molecular, é possível diagnosticar se a vacina tem poder imunogênico. A técnica utilizada para a dosagem desse teor é a cromatografia de íons.

2- Objetivo Geral

O objetivo do trabalho proposto é implementar ferramentas que permitam avaliar os resultados gerados rotineiramente no LAFIQ, de modo a aprimorar o controle da qualidade analítica do mesmo.

2.1- Objetivos Específicos:

1. Estudar os Parâmetros de adequação / validação, conforme exigência da norma NBR ISO/IEC 17025 e USP 27 de dois tipos de métodos de análise para duas categorias distintas:
 - o Determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina conjugada contra a Hib, (**Método categoria tipo I**);
 - o Determinação da condutividade em água para injetáveis (water for injection- WFI) (**Método categoria tipo III**).
2. Construir cartas de controle, para os dois métodos escolhidos e através da variabilidade dos dados encontrar os intervalos aceitáveis para os resultados obtidos.
3. Calcular as incertezas das medições analíticas para os métodos categoria tipo I e III.
4. Avaliar os fatores que realmente contribuem para a incerteza das medições, trazendo melhorias para a Unidade.

3 - Materiais e Métodos

O estudo foi realizado com dois métodos analíticos utilizados na rotina do LAFIQ cuja escolha já foi justificada anteriormente:

- determinação do conteúdo de polissacarídeo em amostra referência de poliribosilribitol fosfato de *Haemophilus influenzae* tipo b, através de separação cromatográfica por troca iônica, com detecção amperométrica pulsada **(Método de categoria tipo I)** e,
- determinação da condutividade em amostras de água para injetáveis, WFI **(Método de categoria tipo III)**.

Embora os dois métodos escolhidos para estudo sejam métodos oficiais presentes em monografias nacionais e internacionais, para cada um deles os parâmetros de validação foram estudados e os resultados apresentados e discutidos no capítulo 4. Para que uma análise seja confiável é necessário que a mesma seja executada através de um método validado, ou seja, o método tenha sido submetido a estudos laboratoriais que demonstrem que ele atende as exigências requeridas a que se destina.

Para o método tipo I estudaram-se os parâmetros:

1. Seletividade;
2. Faixa de trabalho;
3. Linearidade;
4. Precisão;
5. Exatidão;
6. Estimativas de incerteza padrão das diversas fontes, padrão combinada e padrão expandida.

Os parâmetros seletividade, faixa de trabalho e exatidão já foram previamente estudados, na primeira validação do método, realizada no LAFIQ.

Para o método tipo III, os seguintes parâmetros foram estudados:

1. Precisão;
2. Estimativas de Incerteza de medição;

Foram estabelecidos os seguintes passos para a organização do trabalho e para o cálculo da incerteza de medição de cada método em estudo:

- A descrição sucinta do método cujos procedimentos operacionais padronizados estão apresentados no anexo A;
- Estudo e avaliação dos parâmetros de validação e adequação;
- Os cálculos e especificações que devem ser aceitos;
- Identificação das fontes de incerteza, demonstradas no diagrama de causa e efeito;
- A expressão dos cálculos de estimativas das incertezas padrão, padrão combinada e incerteza expandida;
- Avaliação da contribuição de cada fonte de incerteza parcial e a importância das mesmas para a incerteza total através da construção do gráfico de Pareto;
- Diagrama de causa e efeito refinado;
- Recomendação de melhorias que visem a implementação de um modelo de controle.

3.1- Descrição do Método tipo I

O princípio do **Método tipo I**, consiste na determinação do conteúdo de polissacarídeo por HPLC que é baseada na separação de unidades simples (fosfato de ribosil ribitol) do polissacarídeo hidrolisado, PRRP, em coluna de troca iônica sob condições alcalinas extremas. A detecção das unidades separadas pela cromatografia é feita através de detector amperométrico pulsado cuja medição quantitativa é realizada pela corrente resultante da oxidação dos carboidratos da amostra em questão. A interpretação do teste é baseada no tempo de eluição do pico característico da unidade simples de poli ribosil ribitol fosfato, que elui em aproximadamente 20 minutos . O pico é integrado através de programa computacional, chamado *peaknet*, do próprio equipamento e o conteúdo de polissacarídeo é então quantificado. A concentração da amostra referência, utilizada para estudo foi calculada com o resultado da integração de seu pico, pelo valor do tempo de retenção, plotado na reta de regressão linear da curva padrão utilizada previamente.

3.1.2- Materiais e condições de análise

- Sistema cromatográfico - HPLC marca Dionex, modelo DX 500 (composto de bomba, amostrador automático e seletor)
- Coluna *Borate Trap*
- Coluna *Amino Trap*
- Coluna Analítica Carbopac PA 10
- Balões volumétricos calibrados de 25 mL, 50 mL e 100 mL
- Pipetas calibradas de 2, 2,5 , 3, 4 e 5 mL
- Pipeta automática de volume variável de 1000 a 5000 µL
- Balança para determinação de umidade “*moisture analyser*” com prato de alumínio para pesagem.

3.1.3- Reagentes e Soluções

- Solução para a fase móvel: Solução aquosa contendo 30 milimoles de NaOH e 100 milimoles de acetato de sódio por litro de água ultrapura.
- Material de referência de PRRP fornecido pela GlaxoSmithKline, com pureza de $100\pm 5\%$
- Solução estoque contendo $250\mu\text{g/mL}$ de PRRP (solução mãe) - Foram pesados inicialmente 118mg do material, PRRP referência e dessecados em balança de lâmpada halógena, a 70°C , até peso constante. A massa da amostra seca, após peso constante, foi de 107mg e foi dissolvida em água purificada e avolumada a 50mL, em balão volumétrico, originando uma concentração de 2,14 mg/mL. Dessa solução foi tomada uma alíquota de 5,84 mL, medida em pipeta automática calibrada, e avolumada para 50 mL, em balão volumétrico.
- Soluções amostra contendo $15\mu\text{g/mL}$ de PRRP: preparada a partir da diluição de 6,0 mL solução estoque contendo $250\mu\text{g/mL}$ em balão volumétrico de 100 mL.
- Solução de trabalho (padrão) contendo $25\mu\text{g/mL}$ de PRRP: preparada a partir da diluição de 2,5 mL da solução estoque contendo $250\mu\text{g/mL}$ em balão volumétrico de 25 mL.
- Soluções de calibração contendo 10, 15, 20 e $25\mu\text{g/mL}$ de PRRP: preparadas a partir da solução de trabalho contendo $25\mu\text{g/mL}$ de PRRP, conforme dados da tabela 7, cuja matriz é semelhante da amostra em estudo, preparadas em duplicata.

3.1.3- Preparo da Curva de Calibração

O preparo das soluções padrão foi realizado a partir de uma solução de trabalho contendo 25µg/mL. A curva-padrão foi preparada da seguinte forma, como detalhado na tabela 7 e cada solução padrão foi injetada em duplicata.

Tabela 7 - Preparo da curva padrão.

Padrões	Concentração (µg/mL)	Volume solução trabalho (mL)	Volume de água Milli-Q (mL)
P1	10	2	3
P2	15	3	2
P3	20	4	1
P4	25	5	---

3.1.4- Preparo das Amostras

Os três analistas tomaram como amostra uma alíquota de 6,0 mL da solução estoque, medida em pipeta automática calibrada, (250 µg/mL), que foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e avolumado até o traço de aferição com água tipo Milli-Q, resultando numa concentração de 15 µg/mL. Foram tomadas alíquotas de 5,0 mL dessa solução e transferidas para 10 diferentes frascos (em duplicata) do amostrador automático, totalizando um quantitativo de 20 replicatas por analista. Foram adicionados 500 µL de NaOH 1 M em cada frasco e a mistura foi homogeneizada, para proceder a hidrólise do polissacarídeo. As soluções amostra mais hidróxido de sódio, foram deixadas à temperatura ambiente por 16 horas para a hidrólise completa,

conforme estudo prévio realizado pela GSK, garantindo que não haja produtos de degradação que possam interferir, antes de proceder a análise.

Cada analista efetuou suas análises em dias diferentes, respeitando-se as condições operacionais do sistema e do Laboratório, este número de injeções diárias foi o limite permitido. Horwitz W, 1997, recomenda o uso de no mínimo 6 replicas para a concentração em estudo .

3.2- Descrição do Método tipo III

O **Método tipo III**, determinação da condutividade em água para injetáveis, WFI, consiste na medição numérica da capacidade elétrica de transportar e conduzir a corrente em solução. O inverso da resistência elétrica de 1cm^3 do líquido na temperatura de 25°C . Ela é medida diariamente no Laboratório em amostras de diversos tipos de águas purificadas e potáveis.

3.2.1- Materiais do Método tipo III

O material utilizado e as condições de análise têm as seguintes características:

- Condutímetro 712 METROHM com célula de medição $0,77\text{ cm}^{-1}$;
- Eletrodo AG 9101 Herisau;
- Termômetro acoplado;
- Padrão de condutividade com certificado fornecido pela METROHM, concentração de $1408\ \mu\text{S}/\text{cm}$.

3.2.2- Condições de Análise

Para conhecimento do comportamento da água WFI estudada , foram coletadas amostras diárias num período de trinta dias consecutivos por um único analista e demonstradas as variabilidades dos resultados através de sua carta de controle, pois existe somente padrão de calibração do equipamento e não padrão de amostra com mesma matriz.

As condutividades foram obtidas com diferentes tempos a fim de descobrir até que ponto sua estabilidade seria mantida. Foram medidos pontos com 0, 30, 60 e 90 minutos após a coleta e sua temperatura foi diminuindo gradativamente com o passar do tempo. A temperatura inicial da amostra foi de cerca de 90°C e após 90 minutos estava à temperatura ambiente.

Para esse estudo foram sempre analisadas amostras coletadas de um mesmo sistema de produção de WFI.

Por fim foram verificadas as condições de análise de precisão intra Laboratório, através da repetitividade, dos dados obtidos pelo mesmo analista - precisão intra dia - e com três analistas diferentes em dias diferentes, todos com mesmo equipamento - caracterizando a Reprodutibilidade. As variabilidades foram verificadas através dos desvios padrão e coeficientes de variação, desvios padrão relativos. Conforme recomendado pela NBR ISO/ IEC 17095 e Farmacopéia americana, de acordo com os parâmetros de validação analítica para esse método o importante seria somente testar sua adequação, já que é um método padronizado.

O estudo foi realizado seguindo a mesma organização feita para o método tipo I.

4 - Resultados e Discussão:

Os resultados das estimativas de incerteza de medição dos dois métodos em estudo estão apresentados de acordo com a ordem descrita no capítulo 3. Os dados obtidos foram utilizados para a confecção de cartas de controle, como recomendado

pela ASTM, 2004, utilizando o programa *STATISTICA* versão 6.0. Não foi feita a exclusão de pontos fora de controle com o objetivo de visualizar o comportamento dos analistas e das amostras rotineiramente. As causas prováveis para alguns pontos estarem fora de controle podem estar associadas a erros sistemáticos, visto que 95% dos dados estão dentro dos limites de controle, caracterizando a presença de erros aleatórios conforme Ryan, 2000. Foram tomadas medidas de correção através do teste t e recuperação.

Para cada analista, os primeiros histogramas são referentes aos dados tratados de maneira individual, com o objetivo de visualizar graficamente o comportamento de cada conjunto de resultados obtidos por cada analista. Na distribuição normal, o cálculo dos limites superior e inferior, foi considerado pelo programa *Statistica* utilizado como $\pm 3\sigma$, que corresponde a 6σ , com desvio padrão da distribuição, dado por:

$$\sigma = \frac{\bar{R}}{d_2} \therefore$$

σ = Desvio padrão da distribuição

\bar{R} = Amplitude média

d_2 = parâmetro de distribuição ou amplitude relativa, tabelado em função de “n” medições

(Desenvolvido por Shewhart, de acordo com Montgomery, 2001.)

Para efeito de cálculo e parâmetros de validação foram utilizados dados provenientes das cartas de controle construídas com a média das médias dos resultados de modo a obter a precisão intra-ensaio e intra laboratorial. Esses gráficos estão apresentados após as cartas de controle das médias de valores individuais obtidos por cada um dos três analistas.

4.1 - Resultados para o Método tipo I

4.1.1- Primeira curva de calibração

Foi construída uma curva de calibração padrão (concentração x área) e através do cálculo das áreas dos picos de cada um desses pontos foram calculados os valores de concentração real para cada ponto. A concentração das soluções amostras foi obtida pela interpolação dos dados na curva de calibração, pela reta de regressão linear, usando o programa *Excel* como ferramenta de cálculo. Estes resultados foram verificados em máquina de calcular científica. Para a integração das áreas dos picos referentes as soluções amostra e padrão utilizou-se o programa *software Peaknet* do próprio equipamento.

Os analistas 1 e 2, utilizaram a primeira curva de calibração, enquanto que o analista 3 utilizou os dados da segunda curva. O uso de curvas diferentes foi necessário devido ao término da primeira solução eluente e conseqüente preparação de uma outra identicamente preparada.

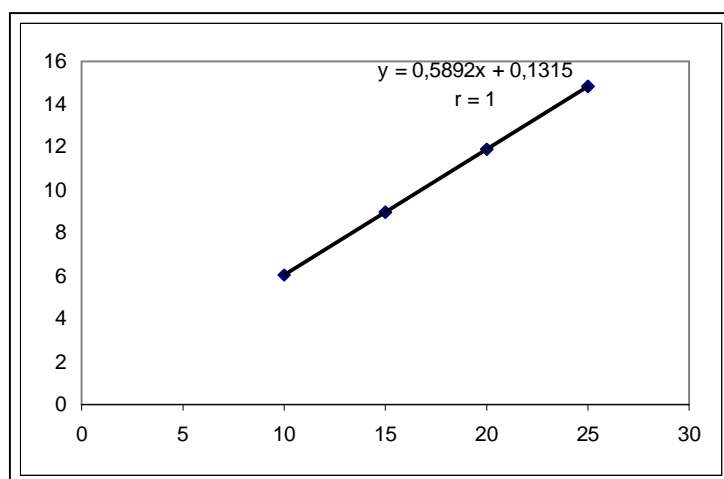


Ilustração 5 - Primeira curva de calibração [(χ = concentração) x (y = área do pico)] utilizada pelos Analistas 1 e 2

Tabela 8 - Área dos picos obtidos para diferentes soluções padrão usadas para confecção da curva de calibração 1.

Concentração Nominal (µg/mL)	Área (nCmin)	Concentração Real (µg/mL)
x	y	x
10	6,0236	9,9995
15	8,9844	15,0243
15	8,9646	14,9907
20	11,907	19,9850
20	11,908	19,9865
25	14,869	25,0110
25	14,864	25,0030

O estudo estatístico dos dados obtidos pela primeira curva de calibração, estão apresentados na tabela 9:

Tabela 9 - Parâmetros de regressão linear da primeira curva de calibração, obtidos através do programa Excel.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	1
R-Quadrado	1
R-quadrado ajustado	1
Erro padrão	1,12347E-14
Observações	7

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	64,48002913	64,48002913	5,10863E+29	1,01752E-73
Resíduo	5	6,31089E-28	1,26218E-28		
Total	6	64,48002913			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,13155	1,58882E-14	8,27975E+12	4,87774E-64	0,13155	0,13155
Variável X 1	0,589235	8,24396E-16	7,14747E+14	1,01752E-73	0,589235	0,589235

Observa-se que o valor de r , coeficiente de correlação encontrado foi adequado, pois quanto mais próximo de 1 resulta num ajuste perfeito entre os pontos, demonstrando o grau de correlação entre x e y . Através da tabela 9 de ANOVA foi possível comprovar a análise de variância uni variável, ou seja, a variação em torno da média, que é a soma quadrática total, originada a partir do somatório das somas quadráticas da regressão e dos resíduos, relacionados a erros, sendo possível conhecer os erros relacionados para “ a e b ”, coeficientes linear e angular, respectivamente. Quanto maior for o termo da soma quadrática da regressão, melhor será o ajuste, pois implica que a relação com os resíduos é pequena. O valor - p , correspondente à probabilidade cumulativa, com valor menor que o nível de significância de 0,05, relacionado a 95% de confiança, que caracterizou valores de interseção e coeficiente angular estatisticamente significantes.

Segundo manual do INMETRO, 2003, a maneira de “aninhar” os valores de diferentes grandezas dependentes, consistindo de arranjos que ajudam a identificar e quantificar efeitos aleatórios, é chamada de análise de variância e isso é possível pelo estudo da ANOVA.

4.1.1.1- Resultados obtidos pelo analista 1

Tabela 10 - Dados obtidos pelo Analista 1.

Amostras	Área (nCmin)	Valores individuais de Concentração (µg/mL)	Valores Médios de Concentração (µg/mL)
1	8,8629	14,8191	14,8495
1	8,8987	14,8798	
2	8,8635	14,8201	14,8578
2	8,9080	14,8956	
3	8,8663	14,8248	14,8170
3	8,8572	14,8094	
4	8,7164	14,5704	14,6466
4	8,8063	14,7230	
5	8,7324	14,5976	14,6728
5	8,8211	14,7481	
6	8,6769	14,5034	14,4024
6	8,5580	14,3016	
7	8,4842	14,1763	14,3634
7	8,7047	14,5506	
8	8,6269	14,4185	14,3067
8	8,4951	14,1948	
9	8,5363	14,2648	14,1950
9	8,4541	14,1253	
10	8,6831	14,5139	14,5416
10	8,7158	14,5694	
Média		14,5653	14,5653
Desvio-Padrão		0,2507	0,2403

O desvio padrão da média utilizado no cálculo é igual a $S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ ∴

x_i = medida

\bar{x} = média das medidas

n= número de medidas

4.1.1.2- Cartas de Controle dos Resultados obtidos pelo Analista 1

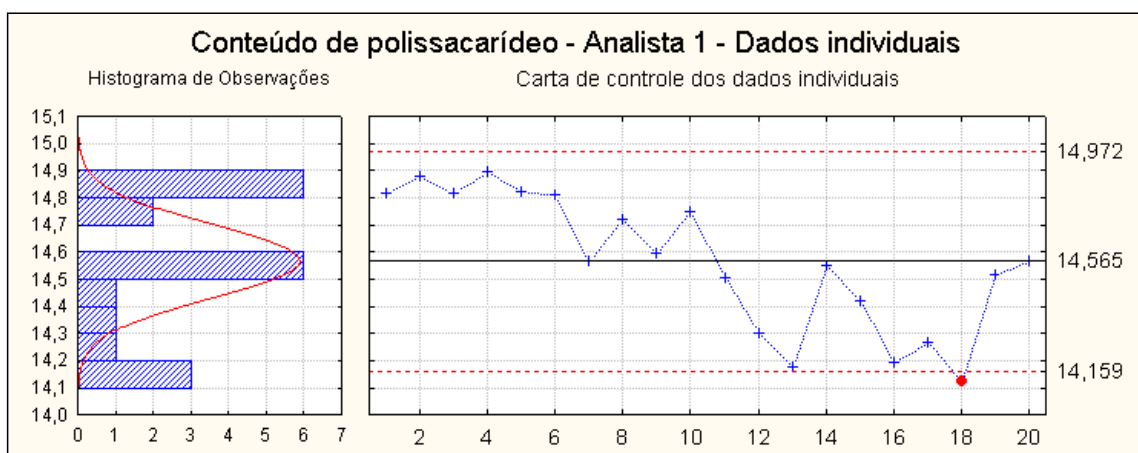


Ilustração 6 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 1

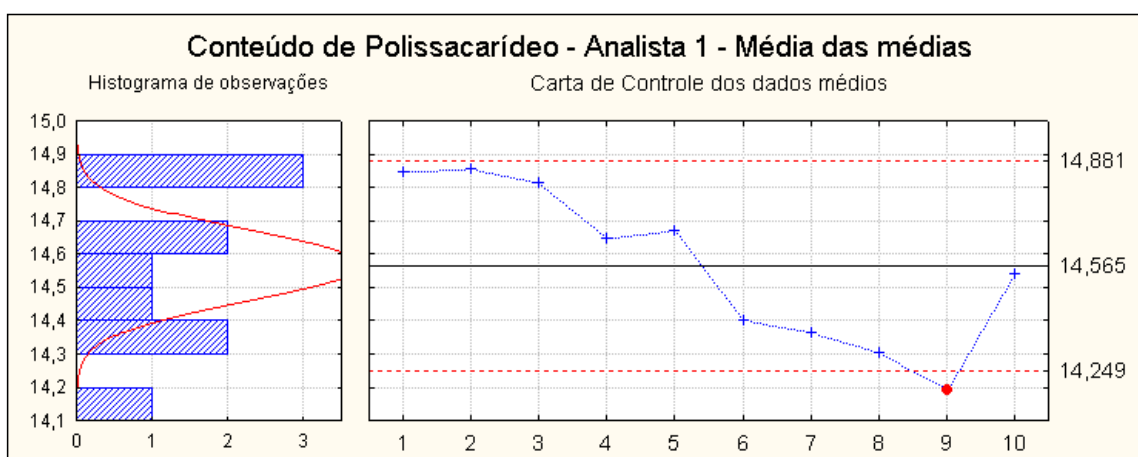


Ilustração 7 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 1

De acordo com as cartas de controle, ilustrações 6 e 7, foi possível visualizar o decréscimo da concentração ao longo das análises, aproximadamente após a metade dos dados, e uma tendência dos pontos em estar nos limites externos da curva de Gauss, conforme o histograma de observações. Com a ajuda do *software Statistica* construiu-se dois tipos de gráficos que mostram o comportamento dos dados obtidos por cada analista. No histograma de observações é possível conhecer a dispersão dos dados diante da curva de Gauss, com distribuição normal. Nas cartas de controle, das médias dos dados individuais e das médias dos dados médios observa-se a variabilidade dos resultados dentro dos limites de controle, 6σ (desvio padrão da distribuição), em torno de suas médias que delimitam regiões com probabilidade de 99,7% - Montgomery, 2001.

As observações aqui apresentadas serviram também para julgamento das próximas cartas de controle, construídas com dados obtidos pelos analistas 2 e 3.

É importante ressaltar que antes da injeção das amostras e padrões, o sistema cromatográfico foi estabilizado, quanto a linha de base, conforme recomendado pelo fabricante, visando a eliminação de possíveis erros sistemáticos provenientes de ruídos do equipamento. Porém, esse procedimento não garantiu a presença somente de erros aleatórios nas análises originados pelos analistas. Pelo comportamento dos dados observados nas cartas de controle e pelo motivo das injeções terem sido realizadas automaticamente, nota-se que há sinais de possíveis erros aleatórios somados aos sistemáticos. Com a finalidade de eliminar estes últimos procedeu-se a correção dos dados, conforme demonstrada no item 4.1.3.4.

4.1.1.4 - Resultados obtidos pelo Analista 2

Tabela 11 - Dados obtidos pelo Analista 2.

Amostras	Área (nCmin)	Valores individuais de Concentração (µg/mL)	Valores Médios de Concentração (µg/mL)
1	8,7481	14,6242	14,7074
1	8,8461	14,7906	
2	8,9243	14,9233	14,9185
2	8,9188	14,9140	
3	8,9029	14,8870	14,8435
3	8,8518	14,8002	
4	-	-	14,9011
4	8,9112	14,9011	
5	8,8958	14,8749	14,8641
5	8,8830	14,8532	
6	8,9248	14,9241	15,2880
6	9,3536	15,6519	
7	9,1147	15,2464	15,3291
7	9,2122	15,4119	
8	9,1185	15,2529	15,2773
8	9,1474	15,3019	
9	9,0232	15,0911	15,1619
9	9,1067	15,2329	
10	8,8809	14,8496	14,8496
10	8,7481	-	
Média		15,0293	15,0161
Desvio-Padrão		0,2636	0,2423

4.1.1.5 - Cartas de Controle dos Resultados do Analista 2

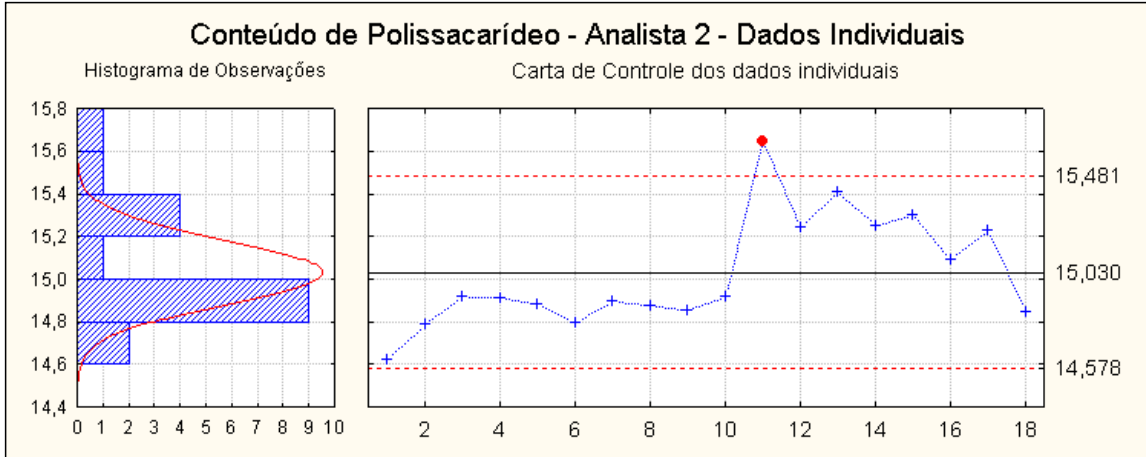


Ilustração 8 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 2

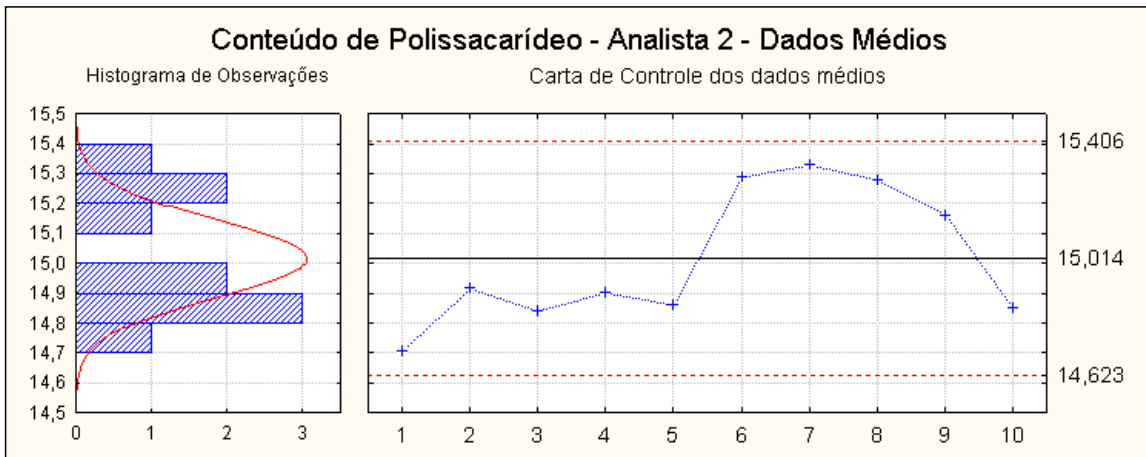


Ilustração 9 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 2

Esse analista obteve dados com comportamento de tendência, porém inverso aos do analista 1, uma vez que os resultados foram elevados, demonstrando um súbito crescimento, observado a partir do décimo ponto da carta de controle.

4.1.2 - Segunda Curva de Calibração

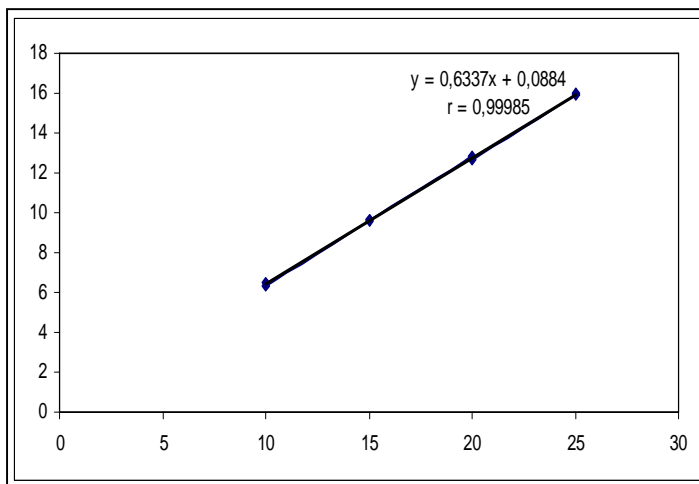


Ilustração 10 - Segunda Curva de calibração [(x = concentração) x (y = área do pico)] utilizada pelo Analista 3

Tabela 12 - Área dos picos obtidas para diferentes soluções padrão usadas para confecção da curva de calibração 2.

Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Área (nCmin)	Concentração Real ($\mu\text{g/mL}$)
x	y	x
10	6,4876	10,0973
10	6,3497	9,8797
15	9,5685	14,9587
15	9,6748	15,1265
20	12,7998	20,0574
20	12,6626	19,8410
25	15,8979	24,9460
25	15,9913	25,0934

O estudo estatístico dos dados obtidos pela segunda curva de calibração estão apresentados na tabela 13:

Tabela 13 - Regressão Linear da segunda curva de calibração.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	1
R-Quadrado	1
R-quadrado ajustado	1
Erro padrão	2,53818E-15
Observações	8

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	100,4420104	100,442	1,55909E+31	1,78112E-92
Resíduo	6	3,86542E-29	6,44E-30		
Total	7	100,4420104			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção	0,088435	2,94866E-15	3E+13	9,27489E-80	0,088435	0,088435
Variável X 1	0,633748	1,60502E-16	3,95E+15	1,78112E-92	0,633748	0,633748

Observa-se que os valores de r, da soma quadrática, erro padrão e p-valor estão coerentes com aqueles da tabela 9, relativa aos dados da primeira curva de calibração.

4.1.2.1 - Resultados obtidos pelo Analista 3

Tabela 14 - Resultados obtidos pelo Analista 3.

Amostras	Área (nCmin)	Valores individuais de Concentração (µg/mL)	Valores Médios de Concentração (µg/mL)
1	9,4733	14,8097	14,8779
1	9,5598	14,9462	
2	9,5643	14,9533	14,9637
2	9,5775	14,9741	
3	9,5579	14,9432	15,2489
3	9,9452	15,5544	
4	9,9331	15,5353	15,7322
4	10,1827	15,9291	
5	9,9539	15,5681	15,5695
5	9,9558	15,5711	
6	9,8725	15,4396	15,4420
6	9,8755	15,4444	
7	9,8684	15,4332	15,4207
7	9,8526	15,4082	
8	9,8603	15,4204	15,3208
8	9,7342	15,2214	
9	9,6992	15,1662	15,1223
9	9,6437	15,0786	
10	9,8045	15,3323	15,2493
10	9,6993	15,1663	
Média		15,2948	15,2947
Desvio-Padrão		0,2862	0,2630

4.1.2.2 - Cartas de Controle dos Resultados do Analista 3

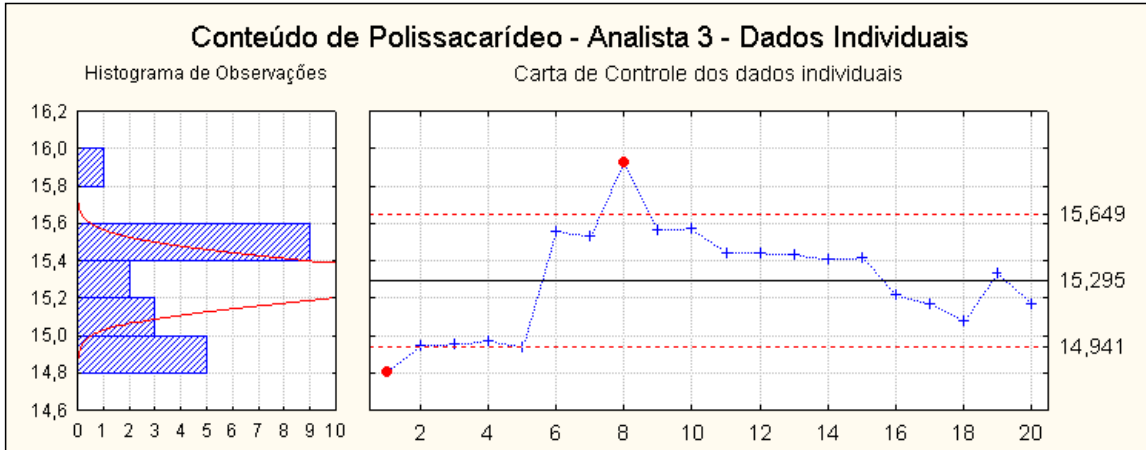


Ilustração 11 - Carta de Controle dos dados individuais do Analista 3

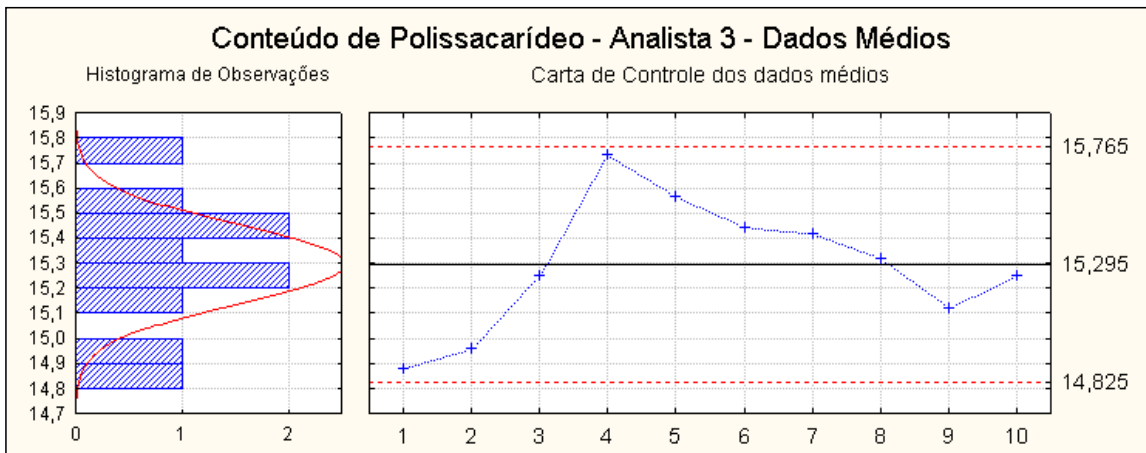


Ilustração 12 - Carta de Controle dos dados médios do Analista 3

De acordo com as cartas de controle construídas com os dados gerados pelo terceiro analista é notório que estes apresentaram-se comportamento diferente dos demais. Porém aproxima-se do tipo de comportamento daqueles dados obtidos pelo analista 2.

4.1.3 - Estudo e tratamento dos dados obtidos pelos três Analistas

4.1.3.1 - Teste F(Snedecor)

Este teste foi realizado com o objetivo de comparar a semelhança do comportamento entre os três analistas através de suas variâncias obtidas no tratamento dos dados individuais de cada um deles. Na tabela 15 estão expressas as variâncias dos três analistas relacionadas aos valores individuais de concentração e o desvio padrão da média.

Tabela 15 - Relação de Variâncias dos três analistas.

Analistas	Desvio- padrão (S)	Variância (S ²)
1	0,2507	0,0628
2	0,2636	0,0695
3	0,2862	0,0819

- Comparação de variâncias entre o Analista 2 e o Analista 1:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_2^2}{S_1^2} = \frac{0,0695}{0,0628} = 1,10668 \equiv 1,11$$

F crítico ou tabelado (para n-1 graus de liberdade = 19 e 95% de confiança)

$$F(19,19) \text{ e } \alpha = 0,05 = 2,16$$

Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, não há diferença significativa entre as variâncias obtidas através dos dados destes dois analistas, então podemos considerar que elas são estatisticamente homogêneas.

- Comparação entre o Analista 3 e o Analista 2:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_3^2}{S_2^2} = \frac{0,0819}{0,0695} = 1,18$$

$$F_{\text{crítico ou tabelado (para } n-1 \text{ graus de liberdade)}} = F(19,19) \text{ e } \alpha = 0,05 = 2,16$$

Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, não há diferença significativa entre as variâncias dos dados obtidos por estes analistas, então as variâncias e as médias são estatisticamente homogêneas.

- Comparação entre o Analista 3 e o Analista 1:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_3^2}{S_1^2} = \frac{0,0819}{0,0628} = 1,30$$

$$F_{\text{crítico ou tabelado (para } n-1 \text{ graus de liberdade)}} = F(19,19) \text{ e } \alpha = 0,05 = 2,16$$

Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, não há diferença significativa entre as variâncias dos dados dos analistas, então elas são estatisticamente homogêneas.

4.1.3.2 - Verificação de Tendência (teste t para verificar a média de duas séries de dados independentes, obtidos por dois analistas diferentes usando o mesmo método e mesmo equipamento.)

Conforme VIM, 2003, “a tendência de um instrumento de medição é normalmente estimada pela média dos erros de indicação de um número apropriado de medições repetidas”. Para esse teste é recomendado que tenha sido realizado o teste F, para saber qual tipo de teste t utilizar. Como não houve diferenças

significantes entre a comparação das variâncias dos analistas, foi utilizado o teste t para a verificação da média de duas séries de dados e sua tendência.

Pela forma de comportamento da distribuição dos dados, através de suas cartas de controle, foi possível suspeitar que houvesse tendência do comportamento dos dados obtidos pelos diferentes analistas. As distribuições tiveram caráter de distribuição normal não padronizadas tipo bi caudais. Foram estudados os dados individuais para a correção dos mesmos.

De acordo com sua definição, a tendência é independente do número de medidas, sendo constante ou variável de forma previsível. Podendo ser denominada de erro sistemático ou erro de tendência, conforme VIM, 2003. Visando a sua eliminação estas foram expressas como recuperação analítica, que é o quociente entre o valor observado e o valor esperado. Foi demonstrado se a mesma é desprezível ou compensada, como recomenda o guia EURACHEM, 2002.

Para verificar a tendência dos resultados gerados pelos três analistas primeiramente calculou-se o desvio padrão ponderado utilizando a equação abaixo:

$$S_c = \sqrt{\frac{S_1^2 \times (n_1 - 1) + S_2^2 \times (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \therefore$$

S_c = Desvio padrão ponderado

S_1^2 = Variância encontrada pelo analista 1

S_2^2 = Variância encontrada pelo analista 2

n_1 = Número de determinações obtidas pelo analista 1

n_2 = Número de determinações obtidas pelo analista 2

Em seguida aplicou-se o teste t para a comparação de duas séries de dados independentes (utilizando o mesmo método, mesmo equipamento). Foram considerados os valores médios de cada analista, com suas respectivas médias das médias :

$$t = \frac{|\overline{X}_1 - \overline{X}_2|}{S_{C_{1,2}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \therefore$$

\overline{X}_1 = Média obtida pelo analista 1

\overline{X}_2 = Média obtida pelo analista 2

$S_{C_{1,2}}$ = Desvio padrão ponderado dos analistas para os dois analistas

n_1 e n_2 = Número de determinações obtidas pelos dois analistas

considerando $t_{crítico} = 1,734$ para 18 graus de Liberdade \rightarrow correspondente a $n=10$ para cada analista $\equiv (10+10)-2$.

- Comparação entre o analista 1 e 2:

$$S_{C_{1e2}} = \sqrt{\frac{[(0,25068)^2 \times (20-1)] + [(0,2636)^2 \times (20-1)]}{20 + 20 - 2}} = \sqrt{\frac{1,193969 + 1,320214}{38}} = 0,2572$$

$$t_{calculado} = \frac{|14,5653 - 15,0293|}{0,2572 \sqrt{\left(\frac{1}{20} + \frac{1}{20}\right)}} = \frac{0,464}{0,0813} = \mathbf{5,70}$$

- Comparação entre o analista 1 e 3:

$$S_{C_{1e3}} = \sqrt{\frac{[(0,25068)^2 \times (20-1)] + [(0,286201)^2 \times (20-1)]}{20+20-2}} = \sqrt{\frac{1,1939 + 1,5563}{38}} = 0,2690$$

$$t_c = \frac{|14,5653 - 15,2948|}{0,2690 \sqrt{\left(\frac{1}{20} + \frac{1}{20}\right)}} = \frac{0,7295}{0,0851} = \mathbf{8,57}$$

- Comparação entre o analista 2 e 3:

$$S_{C_{2e3}} = \sqrt{\frac{[(0,2636)^2 \times (20-1)] + [(0,286201)^2 \times (20-1)]}{20+20-2}} = \sqrt{\frac{1,3202 + 1,5563}{38}} = 0,27$$

$$t_c = \frac{|15,0293 - 15,2948|}{0,27 \sqrt{\left(\frac{1}{20} + \frac{1}{20}\right)}} = \frac{0,2655}{0,0854} = \mathbf{3,11}$$

Os dados obtidos pelos analistas, que serviram de parâmetro comparativo das análises dos três analistas e o valor tabelado de $t_{\text{tab ou crítico}} = 1,734$, obtiveram-se $|t_{\text{calculados}}|$ com valores maiores que o t_{tab} . Então mesmo com valores de desvio-padrão e coeficientes de variação próximos e a precisão do método, existe diferença significativa entre os analistas. A menor diferença encontrada foi entre os analistas 2 e 3.

4.1.3.3 - Teste t, comparação da média experimental e um valor conhecido (valor referência)

O teste t foi utilizado como ferramenta estatística para comparar as médias dos resultados obtidos pelos analistas com o valor médio nominal desejado para as

soluções amostra, do método, pressupondo a distribuição normal dos valores da população (valores nominais), servindo de orientação para verificação dos dados experimentais.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{X} - \mu|}{S/\sqrt{n}}, \text{ onde}$$

\bar{X} = média das amostras

μ = média da população (valor nominal)

S = desvio padrão das amostras

n = número de determinações

Para n -1 graus de liberdade.

$$\text{Analista 1 - } t_{\text{calculado}} = \frac{|14,5653 - 15|}{0,25068/\sqrt{20}} = 7,75$$

$$\text{Analista 2 - } t_{\text{calculado}} = \frac{|15,0293 - 15|}{0,2636/\sqrt{20}} = 0,50$$

$$\text{Analista 3 - } t_{\text{calculado}} = \frac{|15,2948 - 15|}{0,286201/\sqrt{20}} = 4,61$$

$t_{\text{crítico para 19 graus de liberdade}} = 2,14$

Conclusão: somente os dados provenientes da análise do Analista 2 não tiveram comportamento de tendência significativa podendo ser desprezível, pois seu $|t_{\text{calculados}}| < t_{\text{crítico}}$ e seus resultados são estatisticamente compatíveis com o valor verdadeiro. Os dados dos Analistas 1 e 3 deverão ser corrigidos a fim de eliminar o erro sistemático. Seus resultados encontrados foram significativamente diferentes do

valor verdadeiro, 15 µg/mL, para nível de confiança de 95%, verificado pelo teste t tipo 1 (estudo comparativo da média da amostra com o valor verdadeiro, nominal).

4.1.3.4 - Recuperação dos analistas 1 e 3

$$\text{Resultado do Analista 1} = \frac{\text{MédiaAnalista1}}{\text{Recuperaçãomédia}}$$

Resultado do Analista 1 = Resultado corrigido para o erro sistemático

Média do Analista 1 = Média obtida sem correção

Recuperação Média = Média dos valores de recuperação obtidos pelo Analista 1
(Recuperação = valor obtido / valor verdadeiro)

Tabela 16 - Taxas de Recuperação dos dados obtidos pelos Analistas 1 e 3.

Amostra	Analista 1	Analista 3
1	0,98794	0,9873
1	0,99199	0,9964
2	0,98801	0,9969
2	0,99304	0,9983
3	0,98832	0,9962
3	0,98729	1,0370
4	0,97136	1,0357
4	0,98153	1,0619
5	0,97317	1,0379
5	0,98321	1,0381
6	0,96689	1,0293
6	0,95344	1,0296
7	0,94509	1,0289
7	0,97004	1,0272
8	0,96124	1,0280
8	0,94632	1,0148
9	0,95098	1,0111
9	0,94168	1,0052
10	0,96759	1,0222
10	0,97129	1,0111
Desvio-Padrão	0,01671	0,0191
Média	0,97102	1,0197

- Resultado médio do Analista 1 corrigido = $\frac{14,5653}{14,5653/15} = \frac{14,5653}{0,97102} = 15$

A correção dos dados obtidos pelo analista se dá dividindo-se a unidade pelo fator de correção: $F_{\text{correção}} = 1 / 0,97102 = 1,0298$. Portanto, é possível obter os valores corrigidos do analista 1, multiplica-se os valores encontrados pelo seu fator de correção.

- Resultado médio do Analista 3 corrigido = $\frac{15,2948}{15,2948/15} = 14,9993 \equiv 15$

$$F_{\text{correção}} = 1 / 1,0197 = 0,98068$$

4.1.4 - Validação do Método tipo I

Os parâmetros relacionados ao método, categoria tipo I de classificação de métodos, já são conhecidos pois, o mesmo já fora validado anteriormente e foram também verificadas as condições de análise de sua origem, GlaxoSmithKline, no LAFIQ (“In house Validation”). Para efeito de estudo os parâmetros seletividade, faixa de trabalho, linearidade, precisão e exatidão foram reavaliados.

4.1.4.1- Seletividade

O método é seletivo e estável, baseado em estudo de validação prévio, conforme anexo C₁. Foram realizados anteriormente estudos de interferência do branco sem a matriz, para verificar a seletividade do método e a estabilidade foi verificada em diferentes temperaturas com as amostras, conforme relatório prévio de validação exposto no anexo C. Os coeficientes angulares, b, das curvas de calibração demonstram que o método tem a mesma sensibilidade para as duas curvas. Com o coeficiente de correlação $r > 0,9999$, conforme *Consideration of Harmonized IUPAC Guidelines for the In-house Validation of Methods of Analyses*, WHO, 2002; ISO 8466-1, 1990.

4.1.4.2 - Faixa de trabalho

A faixa de trabalho utilizada foi de 67 a 167% da concentração do polissacarídeo de 10 a 25µg/mL, para o valor ideal de 15µg/mL, seguindo a mesma relação de 50 a 150%, conforme recomendado pela USP 24, Thompson, 1999 e Inman, 1987; de 60 a 120%, conforme recomenda o FDA, Horwitz, 1998 e de 20 a 200%, como relata a ISO 8466, 1990 .

4.1.4.3 - Linearidade

O método é linear, conforme comprovado pelos parâmetros de linearidade da reta de regressão discutidos e apresentados nas tabelas 9 e 13.

4.1.4.4 - Precisão

- **Reprodutibilidade**

Pelo resultado dos três analistas, pode-se concluir que o método tem precisão, pois apresentou desvios padrão com valores muito próximos e CV% (RSD) $\leq 2\%$ para o sistema, Instrumento e analista, que de acordo com Horwitz, 2004, que caracteriza a Reprodutibilidade, para o caso de detecção de macrocomponentes.

- **Repetitividade**

Para um método ter repetitividade o critério é CV% < 1,0%. O método não pode ser julgado repetitivo pelos dados médios avaliados, como já discutido anteriormente pelo estudo da tendência dos dados e correção dos erros.

Considerando-se as correções dos dados individuais dos analistas 1 e 3 com os dados individuais, foi possível obter os fatores de correção para os analistas 1 e 3, que originaram a correção dos valores médios dos dois analistas, como é possível conferir na tabela 17:

$$F_c (\text{analista 1}) = 1,0298$$

$$F_c (\text{analista 3}) = 0,9807$$

Tabela 17 - Tabela comparativa de valores corrigidos.

Analistas	Médias sem correção (µg/mL)	Médias corrigidas (µg/mL)	Desvios-padrão sem correção
1	14,5653	14,9993	0,25068
2	15,0293	-	0,26360
3	15,2948	14,9993	0,28620

Conforme o cálculo do coeficiente da variação, desvio padrão relativo, na aplicação dos dados corrigidos dos analistas 1 e 3, os dados dos analistas geraram valores em conformidade com a recomendação de Horwitz, para a precisão do sistema, analista versus equipamento, de acordo com a tabela 18.

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100 \therefore$$

S = Desvio-padrão

\bar{X} = Média

Tabela 18 -Relação de coeficientes variação e analistas.

	CV% sem correção	CV% após correção
Analista 1	1,72	1,65
Analista 2	1,61	-
Analista 3	1,87	1,72

A ilustração 13 refere-se ao diagrama qualitativo representativo da repetitividade com a Reprodutibilidade do método tipo I. Ele mostra os valores dos desvios das duas réplicas medidas por cada analista em relação ao valor médio das vinte determinações e a dispersão entre as réplicas. Como forma de reforçar o estudo, foi possível demonstrar a variabilidade dos dados obtidos por cada analista e entre eles.

O analista 2 obteve menor variabilidade dos dados entre as réplicas que os demais. E sua média está melhor relacionada a média da análise, representada pelo valor médio mais próximo do desvio zero em relação à média global. Portanto, como verificado anteriormente e provado graficamente, este apresentou melhores resultados, sem ter havido necessidade de correções.

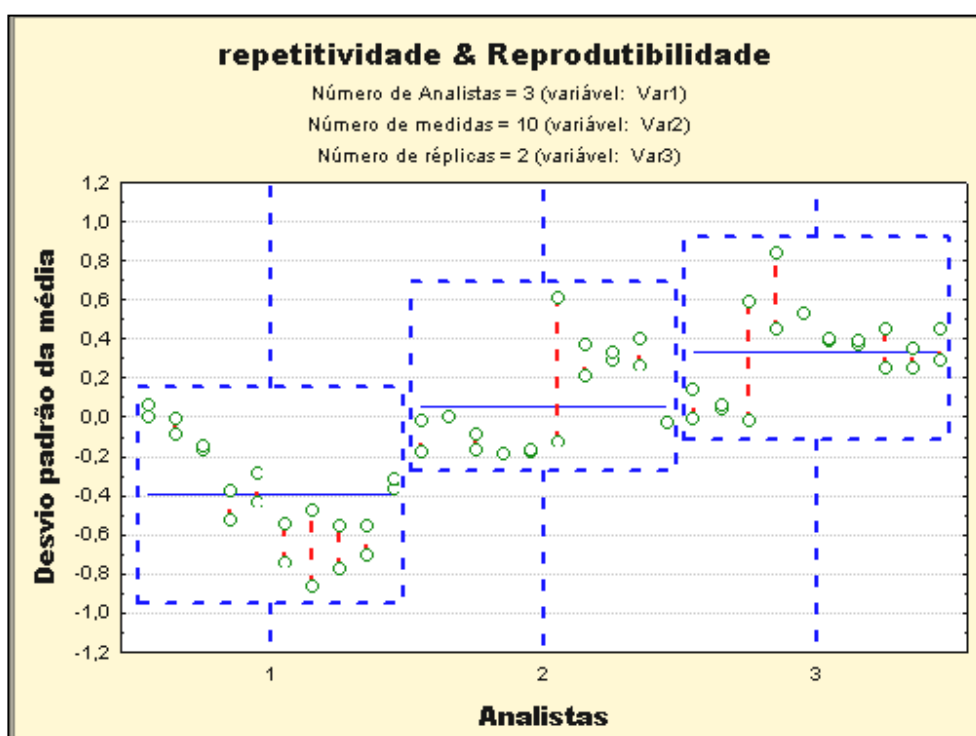


Ilustração 13 - Gráfico repetitividade x Reprodutibilidade

A ilustração 14, gráfico de caixas (*Box and Whiskers*), os quartis (25, 50 e 75%) demonstraram os valores mínimos e máximos, que correspondem à amplitude dos dados em relação a linha que os divide, que é a mediana de cada um dos três analistas. Com a ilustração 15 foi possível visualizar o comportamento dos dados de cada réplica dos três analistas relacionados as medidas. Notar que a tendência dos dados, calculada através do teste t, foi claramente demonstrada nesse gráfico a partir do ponto 7.

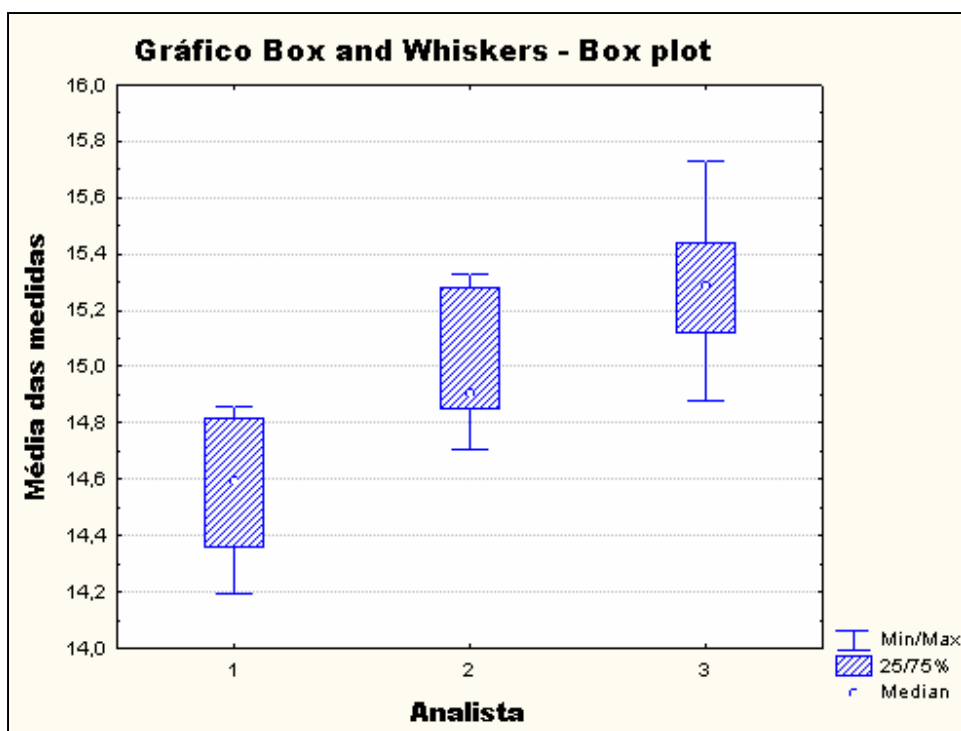


Ilustração 14 - Gráfico Box Whiskers dos três analistas

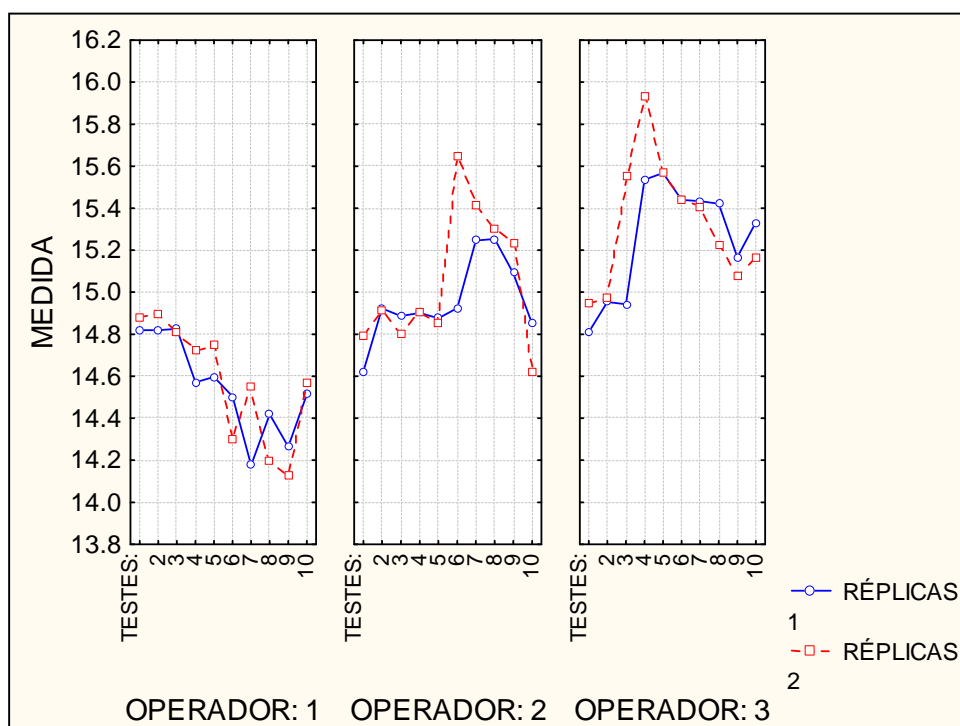


Ilustração 15 - Comportamento dos dados dos três analistas relacionado as medições

4.1.4.5 – Exatidão

O método demonstra exatidão, de acordo com os cálculos dos resíduos encontrados, entre o valor nominal ($15\mu\text{g/mL}$) e os calculados (experimentais), demonstrado na tabela 19. É possível também verificar a exatidão através dos gráficos de controle de Shewhart, cartas de controle, construídos com concentrações de padrões e amostras e a diferença entre os dados de cada analista em relação ao valor ideal. O relatório prévio de validação, anexo C₁, também demonstra resultados de exatidão do método.

Tabela 19 - Relação de resíduos entre os dados gerados por cada analista estudado.

Analista1	Analista2	Analista3
0,1809	0,3758	0,1903
0,1202	0,2094	0,0538
0,1799	0,0767	0,0467
0,1044	0,086	0,0259
0,1752	0,113	0,0568
0,1906	0,1998	0,5544
0,4296	-	0,5353
0,277	0,0989	0,9291
0,4024	0,1251	0,5681
0,2519	0,1468	0,5711
0,4966	0,0759	0,4396
0,6984	0,6519	0,4444
0,8237	0,2464	0,4332
0,4494	0,4119	0,4082
0,5815	0,2529	0,4204
0,8052	0,3019	0,2214
0,7352	0,0911	0,1662
0,8747	0,2329	0,0786
0,4861	0,1504	0,3323
0,4306	-	0,1663

O cálculo dos valores residuais entre cada concentração real, que corresponde ao valor de concentração encontrada e a nominal, que é correlacionada ao valor teórico, é feito subtraindo-se o valor encontrado do valor teórico esperado, dado por:

$$\text{Resíduo} = |X_{\text{Teórico}} - X_{\text{Encontrado}}|$$

Onde

$X_{\text{Teórico}}$ é o valor nominal da concentração de interesse igual a 15µg/mL;

$X_{\text{Encontrado}}$ é o valor real resultante da análise.

A fórmula é estimada em módulo conforme os dados na tabela 19 e na ilustração 16, estão expressos com seus sinais reais, com a finalidade de demonstrar graficamente o comportamento dos dados.

A ilustração 16, refere-se ao gráfico de dispersão dos resíduos dos pontos de cada analista, em relação ao valor nominal da concentração 15µg/mL, como recomendação da *Analytical Methods Committee - AMC*, 2000 e Funk, 1995.

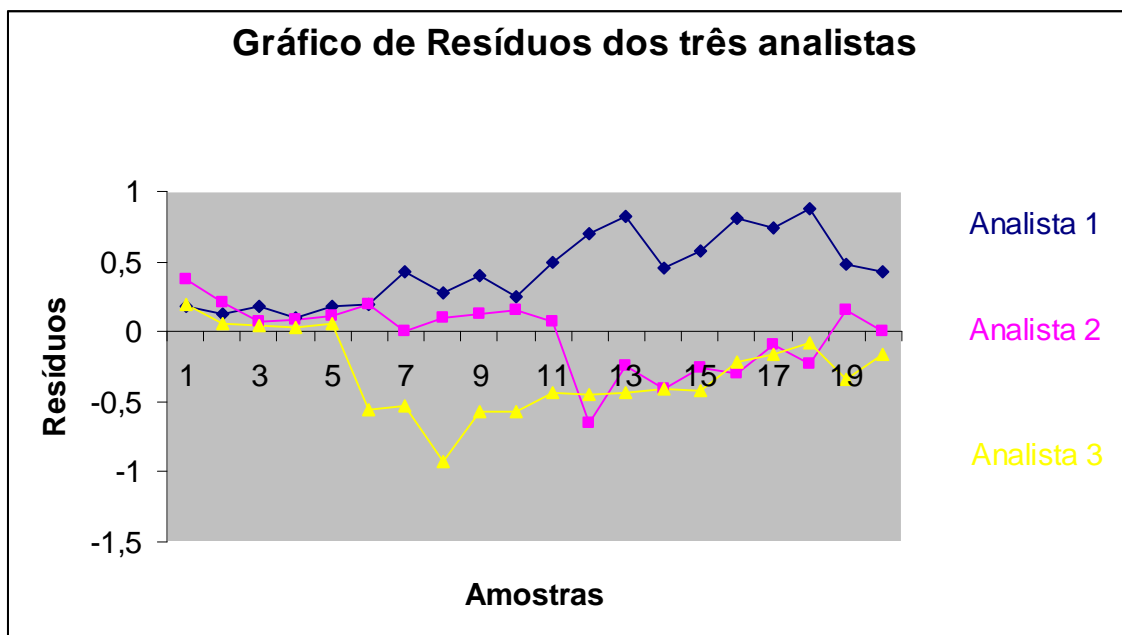


Ilustração 16 - Gráfico de dispersão dos resíduos em relação ao valor ideal.

De acordo com Funk, 1995, a dispersão dos resíduos é a distância vertical de um número de observações na curva de regressão em relação ao valor ideal. Cada ponto aqui representa as vinte determinações realizadas por cada analista, demonstrando a variabilidade dos dados na distribuição normal, sem correção.

O motivo da escolha do modelo matemático para o cálculo das concentrações das amostras é descrito no estudo dos dados das duas curvas de calibração, através do parâmetro ANOVA, tabelas 9 e 13. O método permite exatidão, contudo houve correção para minimizar as tendências dos analistas buscando a precisão através da Reprodutibilidade. A variabilidade encontrada está entre 0,8 e -0,09 µg de polissacarídeo/ mL. A dispersão dos dados do analista 2 foi mais homogênea que as demais, como demonstrado no teste t, item 4.1.3.3.

4.1.4.6 – Robustez

Através de estudo de validação e adequação prévias, conforme anexo C₁, o método é robusto para sua utilização. Foi verificada previamente o desempenho do método e sua variação quanto aos parâmetros importantes descritos, garantindo que o mesmo atende a sua finalidade.

4.1.5 - Diagrama de Causa e Efeito

Como abordado anteriormente, o diagrama de causa e efeito é uma importante ferramenta para ajudar na visualização das possíveis causas de erros e conseqüentes fontes de incerteza de um método. A seta central é representada pelo resultado analítico desejado, mensurando, que no método tipo I corresponde a concentração de polissacarídeo. As setas laterais representam as variáveis da equação e as setas secundárias, que estão representadas pelos fatores que afetam a equação. Todas as variáveis e os fatores identificados são representativos do método.

Para o **método tipo I**, A variável massa, por exemplo, teve contribuição na estimativa da incerteza de medição com a calibração da balança, pois quando ela foi calibrada pelo laboratório de Metrologia de Bio-Manguinhos, seus parâmetros de repetitividade foram considerados para o cálculo do desvio-padrão e assim considerada como grandeza de entrada para a estimativa de incerteza. Estes se somarão a outras variáveis, que são: volume explicitado pela calibração das pipetas automáticas e balões volumétricos e a variável qualificação do cromatógrafo, que originou em dados também de repetitividade. Todas as variáveis e seus fatores que contribuíram para a incerteza foram considerados da mesma forma, respeitando-se os dados provenientes de calibrações, através da repetitividade dos dados cujos certificados estão no anexo C, visando o resultado final do mensurando – conteúdo de polissacarídeo.

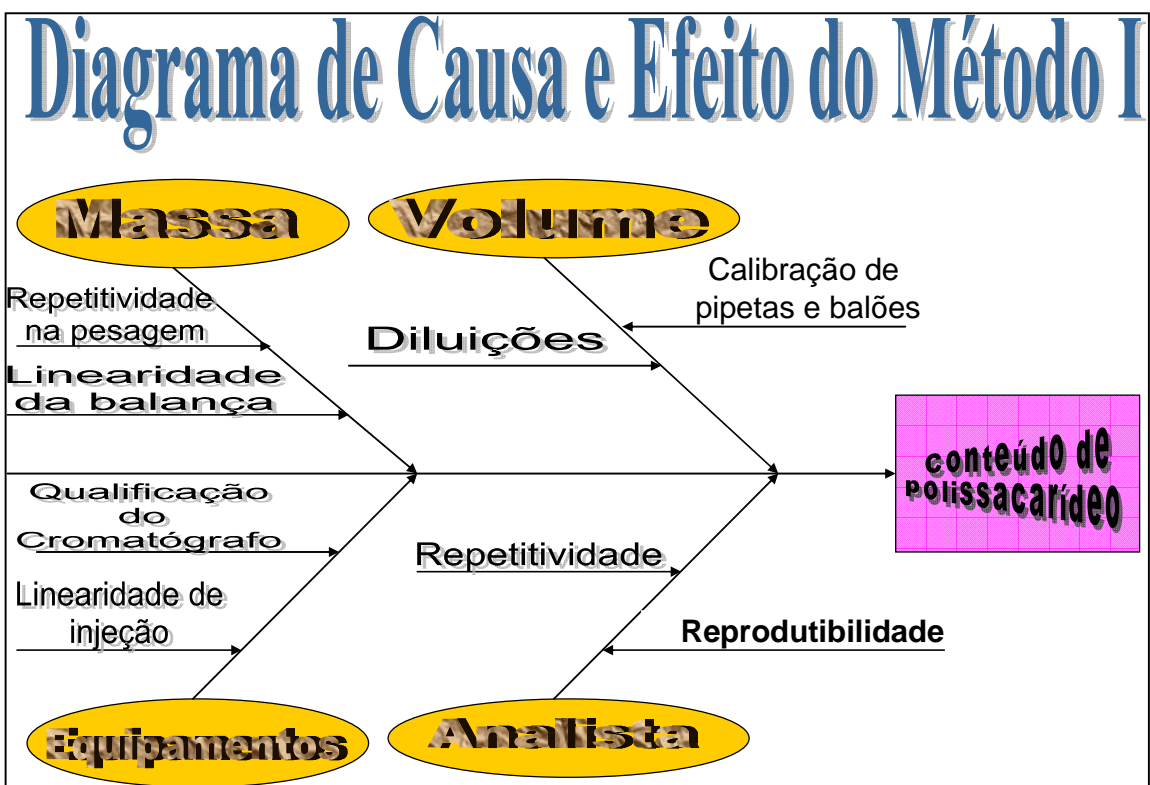


Ilustração 17: Gráfico de Ishikawa do método I

4.1.6 - Relatando as fontes de incerteza estimadas do Método tipo I

4.1.6.1 - Estudo das variáveis e suas contribuições

1. Contribuição da Massa

Tabela 20 - Contribuição da variável Massa na estimativa de Incerteza do método tipo I.

Fonte de Incerteza	Unidade	Tipo	Distribuição	Valor	Divisor	Incerteza (grandeza)
Balança	mg	A	Normal	0,001	K=2	0,0005g \equiv 0,5 mg
Erro Relativo		A	Retangular	0,001	$\sqrt{3}$	0,0006 \equiv 0,6
Incerteza Padrão Relativa						1,1

- A balança de lâmpada halógena, *moisture analyser*, foi calibrada pelo Laboratório de Metrologia de Bio-Manguinhos, sendo portanto um dado de entrada que contém carta de controle e conseqüentemente seu valor proveniente do certificado, anexo C; pode ser considerado de uma fonte de incerteza do tipo A, como recomenda manual EURACHEM.
- Foi calculado o erro relativo, no mesmo certificado sendo este valor considerado para o cálculo da incerteza padrão relativa da massa.
- O valor da incerteza da massa foi aquele obtido no ponto de pesagem do certificado de calibração, 0,1g, pois é o que mais se aproxima da massa pesada no método em estudo.

2. Contribuição do Volume

Tabela 21 - Contribuição da variável Volume na estimativa de Incerteza do método tipo I.

Fonte de Incerteza	Unidade	Tipo	Distribuição	Valor	Divisor	Incerteza (grandeza)
Balão de 50mL	mL	A	Normal	0,01	K=2,16	0,0046 mL
Erro Relativo		A	Retangular	-0,0521	$\sqrt{3}$	-0,030
Incerteza Padrão Relativa						0,0254 *
Fonte de Incerteza	Unidade	Tipo	Distribuição	Valor	Divisor	Incerteza (grandeza)
Balão de 100mL	mL	A	Normal	0,03	K=2,11	0,0142 mL
Erro Relativo		A	Retangular	0,0063	$\sqrt{3}$	0,0036
Incerteza Padrão Relativa						0,0178

Fonte de Incerteza	Unidade	Tipo	Distribuição	Valor	Divisor	Incerteza (grandeza)
Pipeta de 5000 μ L	mL	A	Normal	4	K=2,32	1,7241 μ L \equiv 0,0017 mL
Erro Relativo		A	Retangular	- 0,5	$\sqrt{3}$	0,29 \equiv 0,00029
Incerteza Padrão Relativa					0,00199	
Fonte de Incerteza	Unidade	Tipo	Distribuição	Valor	Divisor	Incerteza (grandeza)
Pipeta de 1000 μ L	mL	A	Normal	2	K=2,32	0,862 μ L \equiv 0,0009 mL
Erro Relativo		A	Retangular	1,3	$\sqrt{3}$	0,75 μ L \equiv 0,0007
Incerteza Padrão Relativa					0,0016	

- * A incerteza padrão relativa do balão de 50 mL, tem valor numérico negativo porém, conforme recomendação do INMETRO, não é possível estimar esse tipo de resultado com sinal negativo.
- Para que não fossem consideradas mais de uma vez, foi escolhido o pior caso, que corresponde à maior incerteza relativa, do balão de 100mL , **u =0,0178.**

3. Contribuição dos analistas e do método.

Precisão do Método (Dados de Reprodutibilidade corrigidos)

Tabela 22 - Relação de desvios padrão antes da correção.

Analista	Desvio Padrão (µg/mL)
1	0,25068
2	0,26360
3	0,28620

- Para os dados do analista 2 não foi necessária a correção, conforme teste t, demonstrado no item 4.1.3.3. Sua contribuição para a incerteza, como grandeza de entrada referente a incerteza padrão relativa, do método foi descrita anteriormente e o valor utilizado do desvio padrão sem correção foi de, **u = 0,26360 µg/mL**.
- Para os Analistas 1 e 3, foi feita a correção para minimizar a tendência.

Foram utilizados os dados calculados no item 4.1.3.4, que geraram a contribuição para a estimativa de incerteza padrão relativa.

Correção para o Analista 1:

u (Analista 1 corrigido)=

$$= \text{Resultado do Analista corrigido} \times \sqrt{\left(\frac{u_{analista1}}{X_{analista1}}\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{u_{recuperaçãoanalista1}}{\text{RecuperaçãoMedia}}\right)^2}$$

$$u (\text{Analista 1 corrigido}) = 15 \times \sqrt{\left(\frac{0,25068}{14,5653}\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{0,01671}{0,97102}\right)^2} = \mathbf{0,52 \mu\text{g/mL}}$$

Correção para o Analista 3:

Utilizando os dados calculados no item 4.1.3.4.

$$u \text{ (Analista 3 corrigido)} = 15 \times \sqrt{\left(\frac{0,2636}{15,2948}\right)^2} + \sqrt{\left(\frac{0,0191}{1,0197}\right)^2} = 0,54 \mu\text{g/mL}$$

Cálculo do Desvio-Padrão Ponderado para os três Analistas:

$$S_c = \sqrt{\frac{S_1^2 \times (n-1) + S_2^2 \times (n-1) + S_3^2 \times (n-1)}{n_1 + n_2 + n_3 - 3}}$$

$$S_c = \sqrt{\frac{0,2916 \times (10-1) + 0,0676 \times (10-1) + 0,1936 \times (10-1)}{10+10+10-3}} = 0,43 \mu\text{g/mL}$$

A incerteza padrão da Reprodutibilidade para o método tipo I foi de $u = 0,43 \mu\text{g/mL}$.

4. Contribuição da Concentração da Solução de Trabalho

$$\text{Concentração} = \frac{\text{massa do Padrão} \times \text{Pureza} \times \text{Fator médio}_{\text{diluição}}}{\text{Volume do Balão}}$$

Onde,

- Massa pesada = 107 mg

A incerteza padrão relativa da balança é de $u = 1,1 \text{ mg}$.

- Pureza = 100% ± 5%

Considerada a 100% da massa de PRRP, correlacionada a 38% D- Ribose, de acordo com o certificado do fabricante , que é o monômero correspondente após hidrólise alcalina, com fator de conversão de 2,5, correlacionado ao valor de PRRP.

Significando a correlação de 100% de PRRP ----- 2,5 x 38% (= 95%)

e 100% corresponde ----- 95% de monômeros após a hidrólise. Então a variação considerada foi de 95 a 105%, assumindo-se 5% de incerteza relacionada a pureza. Foi estimada a contribuição da incerteza, como tendo uma distribuição retangular, tendo sido necessária a divisão pelo valor da distribuição retangular, $\sqrt{3}$ para obter a incerteza padrão referente à pureza, como recomendado pelo guia EURACHEM $\frac{0,05}{\sqrt{3}} = u = 0,029$.

- Volume do Balão = 50 mL

Com contribuição de incerteza, considerando o pior caso, $u = 0,0178$.

- Fator de Diluição médio = 0,1085

Considerando-se a média dos dois fatores de diluição: $\frac{0,117 + 0,1}{2} = 0,1085$, dividindo-se por $\sqrt{6}$, estimada como distribuição triangular a incerteza relativa foi $u = 0,044$, de acordo com o preparo das soluções de trabalho, ilustração 18.

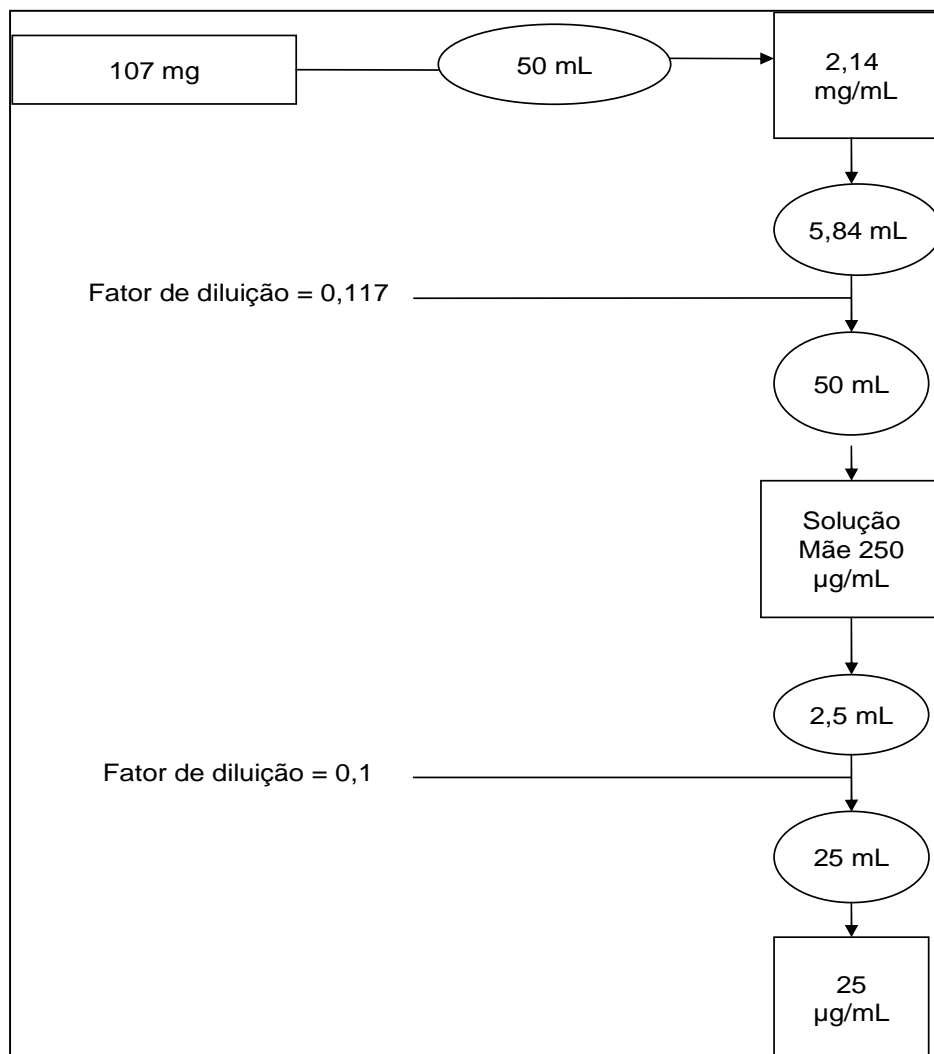


Ilustração 18 - Preparo das soluções de trabalho

Pela fórmula da concentração do método foi possível calcular a concentração da solução de trabalho:

$$\text{Concentração} = \frac{107 \times 0,1 \times 0,1085 \times 1000}{50 \times 100} = \mathbf{0,232 \mu\text{g/ mL}}$$

A contribuição da incerteza da concentração é dada pela fórmula resumida de Kragten, segundo Guia EURACHEM, 2002:

$$u_{\text{(concentração)}} = \text{Concentração} \times \sqrt{\left(\frac{u_{\text{massa}}}{\text{massa}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{pureza}}}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{volume}}}{\text{volume}}\right)^2}$$

Então,

$$u_{\text{(concentração)}} = 0,232 \times \sqrt{\left(\frac{1,1}{107}\right)^2 + \left(\frac{0,029}{0,1}\right)^2 + \left(\frac{0,0178 + 0,044}{50}\right)^2} =$$

$$u_{\text{(concentração)}} = 0,232 \times \sqrt{(0,01028 + 0,29 + 0,001236)^2}$$

$$u_{\text{(concentração)}} = 0,0699 \equiv 0,07 \mu\text{g/mL}$$

5 . Cálculo da Incerteza padrão combinada do método tipo I

$$u_{\text{(método tipo I)}} = \sqrt{\left[u_{\text{concentração}}\right]^2 + \left[u_{\text{Re produtividade}}\right]^2}$$

$$u_{\text{(método tipo I)}} = 0,07 + 0,43 = 0,49926 \equiv 0,50 \mu\text{g/mL}$$

6. Cálculo da Incerteza padrão expandida do método tipo I

$$U = u \times k$$

Onde k= fator de abrangência a 95% de confiança = 2

$$U = 0,50 \times 2 = 1,00 \mu\text{g/mL} \rightarrow 15 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}.$$

4.1.7 - Diagrama de Ishikawa “refinado” do método tipo I

Um novo diagrama de Ishikawa, ilustração 19, foi construído considerando-se os fatores que realmente contribuíram para as estimativas de incerteza do método. No diagrama anterior, ilustração 17, considerou-se uma variável proveniente da qualificação do equipamento e a linearidade de injeção. Porém com a consideração das fontes de incerteza que contribuíram para a concentração das soluções de trabalho e da Reprodutibilidade do método, esse fator anterior ficou implícito. Com o desvio-padrão da Reprodutibilidade, calculado a partir dos dados obtidos nas diversas repetições, foi possível envolver todas as variabilidades do processo de medidas, para os cálculos das curvas de calibração e das amostras. O uso da fórmula de Kragten do manual EURACHEM, 2002, possibilitou o cálculo simplificado da incerteza do método cromatográfico.

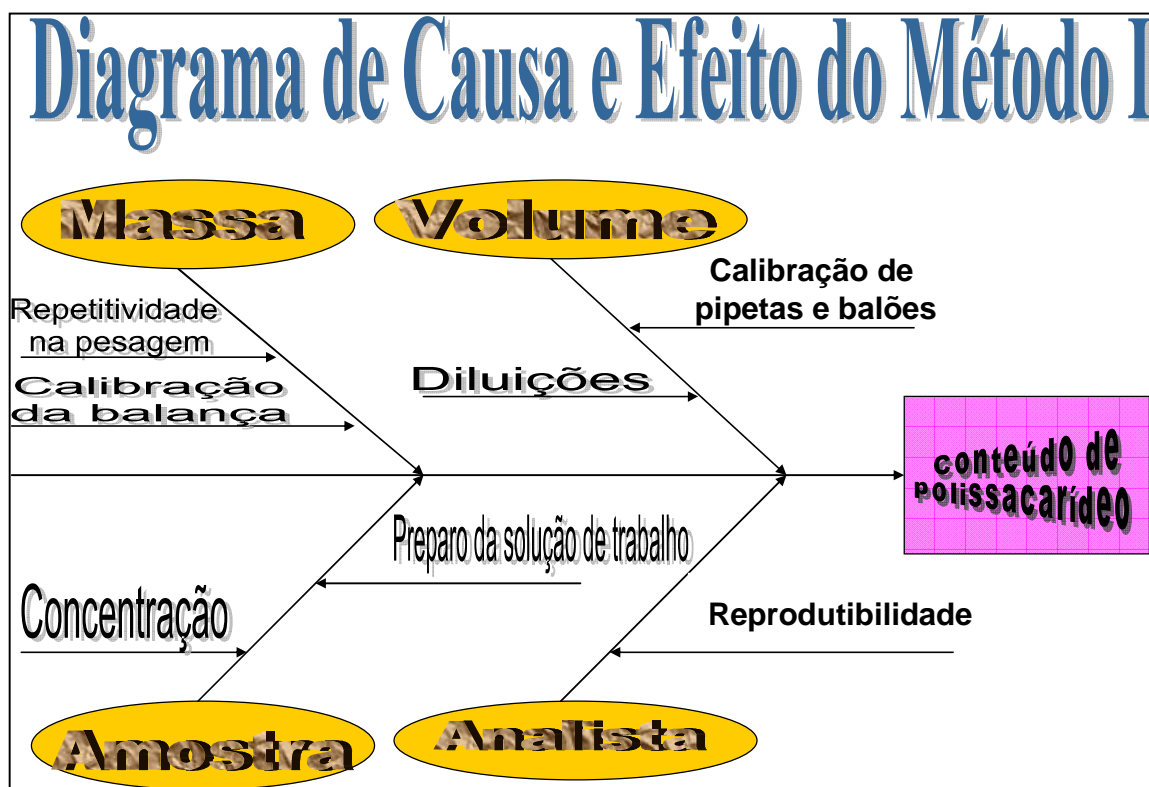


Ilustração 19- Diagrama de Ishikawa refinado do método tipo I

4.1.8 - Contribuições para a Incerteza Padrão Combinada do Método tipo I

As fontes que tiveram importância na estimativa da incerteza padrão combinada para o método tipo I, foram expressas graficamente para a melhor visualização e entendimento de cada contribuição, através da ilustração 20. Na ordem crescente as fontes preponderantes foram: a Reprodutibilidade do método, a concentração da solução de trabalho, as grandezas de volume, a pureza da referência e a massa.

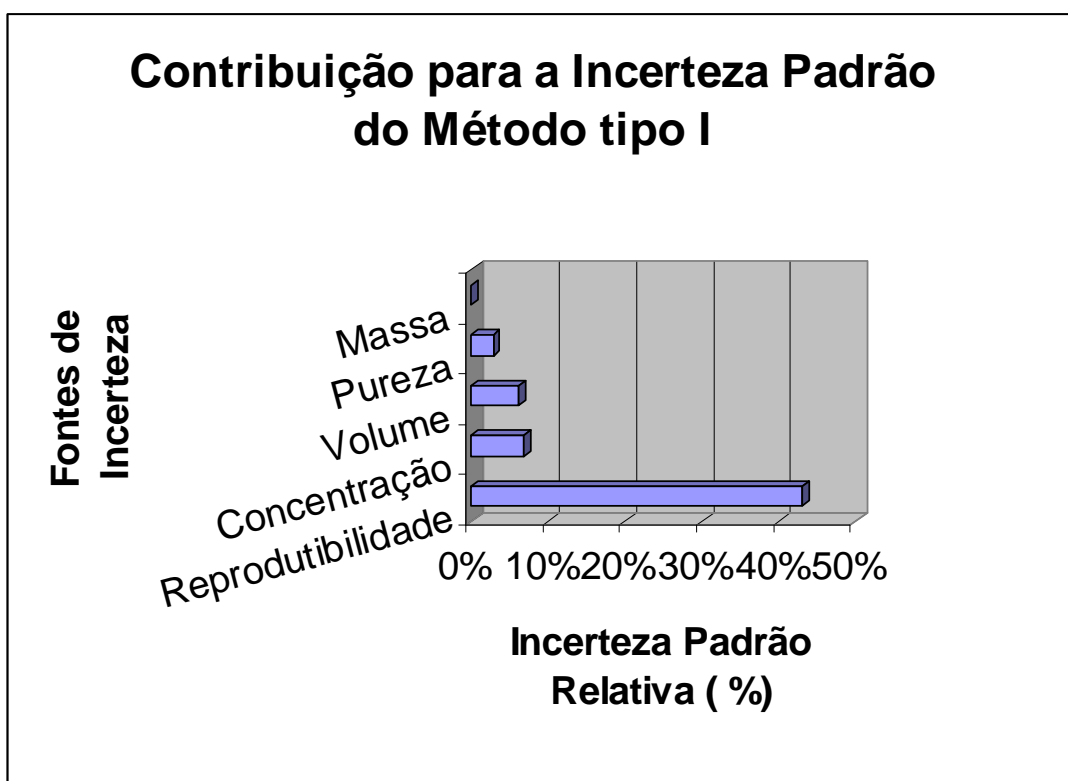


Ilustração 20 - Relação Fontes de Incerteza versus Percentual de contribuição

4.2- Método tipo III

No **Método tipo III** em estudo, o tratamento foi o mesmo que o exposto no método tipo I.

4.2.1- Análise de estabilidade da amostra e carta de controle

Com a finalidade de conhecer a natureza e estabilidade da amostra, conforme USP 24, e sua interação com interferentes e o decréscimo de temperatura, pois a água é coletada na temperatura de saída de sua produção (destilação de cinco passos) - a cerca de 90°C, o método foi reproduzido conforme critérios da farmacopéia americana. Esses testes preliminares foram executados com amostras coletadas todas no mesmo dia, com mesmo analista e mesmo procedimento em triplicatas. Das amostras de WFI de um único ponto, foram medidas as condutividades ao longo do tempo, para avaliar a variabilidade do resultado com a exposição do tempo relacionado à contaminação atmosférica e a diminuição da temperatura. A tabela 23, demonstra os resultados encontrados nos diferentes tempos. Foram medidas as condutividades nos tempos inicial (t_0), a trinta minutos da chegada da amostra (t_{30}), a 60 (t_{60}) e 90 minutos (t_{90}).

Tabela 23 - Resultados de condutividade para o estudo da estabilidade da amostra.

Amostras	Temperatura (°C)	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
t_0 (1)	79,8	0,515
t_0 (2)	79,8	0,530
t_0 (3)	80,0	0,517
t_{30} (1)	66,3	0,520
t_{30} (2)	68,5	0,540
t_{30} (3)	65,8	0,523
t_{60} (1)	55,0	0,547
t_{60} (2)	56,7	0,537
t_{60} (3)	52,9	0,561
t_{90} (1)	45,7	0,585
t_{90} (2)	46,9	0,527
t_{90} (3)	44,1	0,525
Média		0,535
Desvio-Padrão		0,02051

A tabela 23 apresenta as condutividades medidas, cujos valores foram utilizados para construir a carta de controle que retrata a estabilidade da amostra de acordo com a temperatura, ilustração 21.

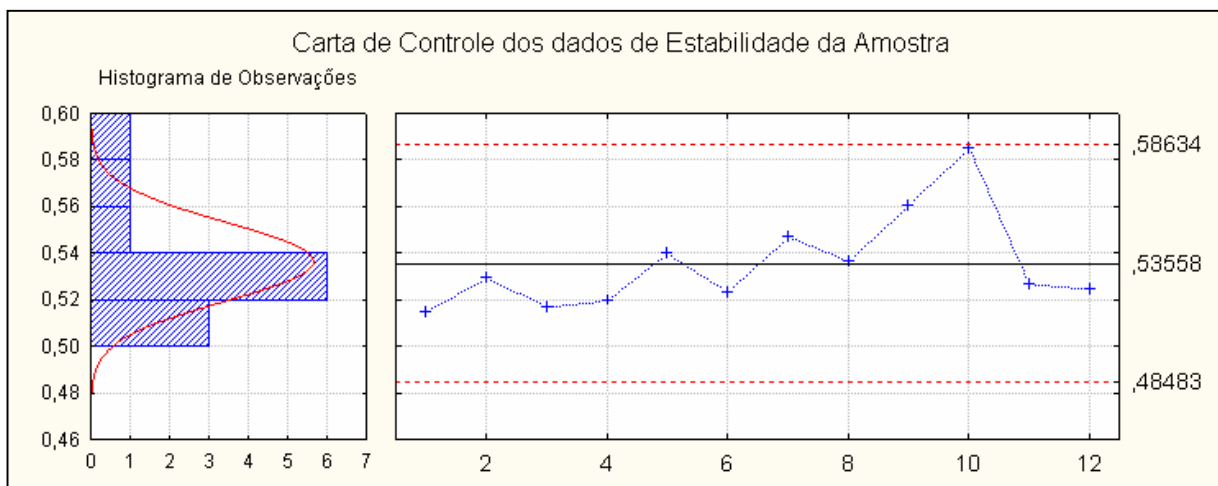


Ilustração 21: Carta de controle com as medidas de estabilidade

Foi então observado que o tempo de exposição das amostras em frascos tampados e completamente cheios não influenciaram significativamente nas medidas. A medida que as amostras foram esfriando naturalmente, as leituras de condutividade feitas em condutímetro que checa e corrige a temperatura, não variavam gradativamente de seus valores iniciais. Considerando o desvio-padrão e o comportamento dos dados na carta de controle nas 12 determinações houve pequena variabilidade durante o tempo de exposição das amostras à temperatura ambiente. tempo, e entre as triplicatas, assumindo-se então que os resultados apresentaram repetitividade.

O estudo foi feito comparando-se os coeficientes de variação de cada variável do método em questão. Os dados coletados demonstraram que a maior variação dos resultados está diretamente ligada à coleta da amostra. A temperatura, transporte e o tempo antes da análise não foram fatores de influência significativa no resultado final.

O coeficiente de variação, para os dados da variável temperatura e tempo de exposição foi igual a $CV\% = \%RSD = \frac{S}{X} \times 100 = \frac{0,02051}{0,53558} \times 100 = 3,83\%$.

De acordo com Horwitz, o desvio padrão relativo para um sistema ter precisão adequada, em ensaios de características físico-químicas, e que garanta a Reprodutibilidade do mesmo deve ser menor ou igual a 10%. Para a repetitividade é recomendada uma variação inferior a 5%, que é o caso do método tipo III. Portanto, ambos os parâmetros foram atendidos, o que sugere que o estudo da temperatura serviu de base para conhecimento da amostra.

Foi verificado o comportamento da água para injetáveis por um período de trinta dias consecutivos. A carta de controle, ilustração 22, representa o comportamento dos dados e fornece subsídios para a compreensão do processo de produção da WFI. Os dados de condutividade utilizados para a confecção da carta de controle foram apresentados na tabela 24.

4.2.2- Comportamento da Amostra e carta de controle

A tabela 24 apresenta os dados de condutividade da WFI obtidos por um mesmo analista ao longo de trinta dias consecutivos. A tabela 25 apresenta os dados estatísticos obtidos com os valores da condutividade .

Tabela 24 - Condutividade da WFI DE amostras coletadas por trinta dias consecutivos.

DIAS	pH (25 °C)		CONDUTIVIDADE (µS/cm)	
	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2
1	5,9	5,9	0,44	0,47
2	6,0	5,9	0,41	0,41
3	5,9	5,9	0,50	0,49
4	5,9	5,9	0,45	0,44
5	5,8	5,8	0,44	0,44
6	5,9	5,9	0,60	0,59
7	6,0	6,0	0,51	0,50
8	5,9	5,9	0,49	0,49
9	5,9	5,9	0,50	0,49
10	6,0	5,9	0,56	0,56
11	5,9	5,9	0,46	0,48
12	5,9	5,9	0,50	0,50
13	5,8	5,8	0,46	0,49
14	5,9	5,9	0,43	0,44
15	5,8	5,8	0,45	0,46
16	5,9	5,9	0,46	0,47
17	5,9	5,9	0,45	0,44
18	5,9	5,9	0,44	0,45
19	5,8	5,8	0,49	0,48
20	5,9	5,9	0,50	0,49
21	5,8	5,8	0,52	0,52
22	5,7	5,8	0,65	0,60
23	5,9	5,8	0,48	0,43
24	5,8	5,8	0,44	0,44
25	5,7	5,8	0,56	0,64
26	5,9	5,9	0,54	0,52
27	5,7	5,7	0,46	0,46
28	5,9	5,9	0,57	0,51
29	5,9	5,9	0,48	0,47
30	5,9	5,9	0,50	0,49

Tabela 25 - Dados estatísticos dos valores da condutividade (comportamento da amostra em 30 dias).

Desvio-padrão ($\mu\text{S/cm}$)	0,0519
Média ($\mu\text{S/cm}$)	0,490
Coefficiente de variação	10,59

A carta de controle, ilustração 22, foi construída originando uma carta de controle, com os resultados das medidas de condutividade das amostras de água coletadas num período de trinta dias consecutivos de um único sistema de produção de água, coletadas por um único analista. A tabela 25 mostra os valores de desvio-padrão, média e coeficiente de variação, atendendo aos critérios de precisão com a Reprodutibilidade do sistema, segundo os critérios de Horwitz.

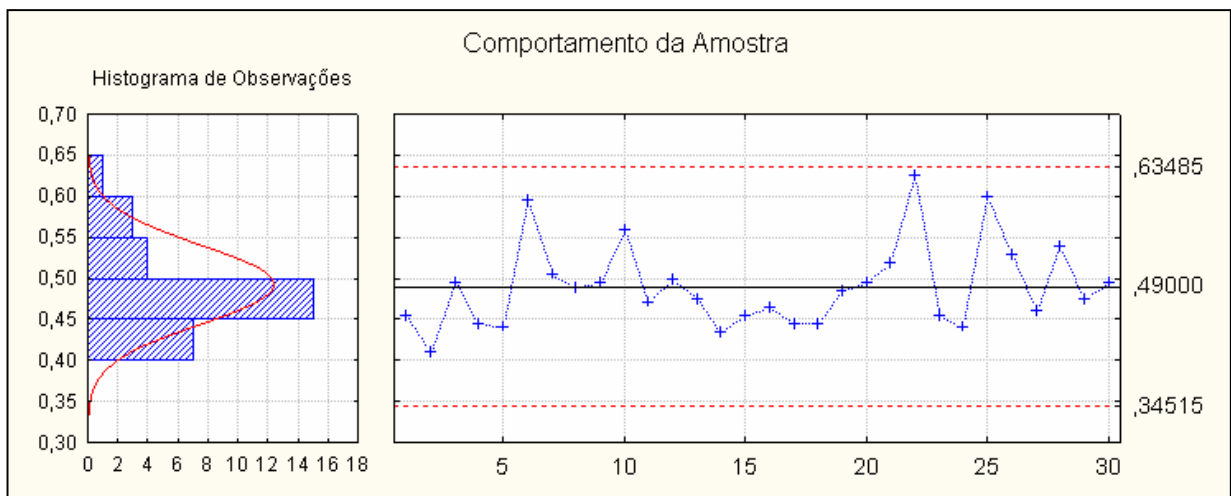


Ilustração 22 : Carta de controle do comportamento dos dados da água WFI ao longo de um mês, com duas amostragens diárias.

Ela teve como objetivo demonstrar a variabilidade do processo de produção da água para injetáveis desse período juntamente com a análise, visto que para esse

método em estudo uma das possíveis fontes de erros é a proveniente da coleta da amostra.

4.2.3- Comportamento dos resultados gerados por três analistas do Método tipo III.

Mesmo não tendo sido recomendado pela USP avaliar os parâmetros de precisão, para o método tipo III pois é oficial, padronizado e já é conhecida sua performance em Laboratórios de Controle, foi importante conhecer a variação dos resultados de acordo com a técnica e os dados gerados pelos três analistas, visto que para o cálculo da estimativa da incerteza é importante conhecer o comportamento de ambos e também o desempenho do Laboratório em estudo.

Com a finalidade de conhecer o comportamento dos dados e a adequação do método em relação à amostra, como sugerido pela USP 24, estas foram coletadas, em dias diferentes, no mesmo ponto e analisadas por três diferentes analistas. O comportamento da amostra já fora conhecido e estudado anteriormente, conforme os dados das cartas de controle, ilustrações 21 e 22. Com os dados da tabela 26, foi possível demonstrar a precisão, através da Reprodutibilidade, realizada pela análise de três diferentes analistas, no mesmo sistema de produção, mesmo ponto de coleta, mesmo equipamento de análise e em dias diferentes.

Na rotina diária do Laboratório é importante conhecer a variabilidade dos resultados obtidos por analistas que podem executar análises em geral, para avaliação dos resultados e melhor alocação de pessoas a diferentes tipos de atividades.

Tabela 26 - Comportamento dos Analistas com a análise de condutividade em WFI.

Análise de condutividade em água para injetáveis em $\mu\text{S}/\text{cm}$, de três analistas diferentes em dias diferentes.			
	Analista 1	Analista 2	Analista 3
	0,596	0,591	0,550
	0,578	0,607	0,549
	0,587	0,609	0,548
	0,590	0,560	0,550
	0,568	0,564	0,551
	0,588	0,561	0,546
Média	0,584	0,582	0,549
Desvio-padrão	0,00995	0,02317	0,00179
Variância	0,000099	0,000540	0,000003

As cartas de controle referentes aos dados da tabela 26 facilitaram a visualização dos dados, a variabilidade e a diferença de resultados entre cada analista. Foi importante levar em consideração que os resultados variaram conforme o esperado, dentro dos limites de controle e muito abaixo da especificação permitida, que é menor que $1,3\mu\text{S}/\text{cm}$. Os valores de desvio-padrão e variância encontraram-se dentro de parâmetros adequados. As ilustrações 23, 24 e 25, demonstraram o comportamento dos dados de acordo com a ordem da coleta das amostras.

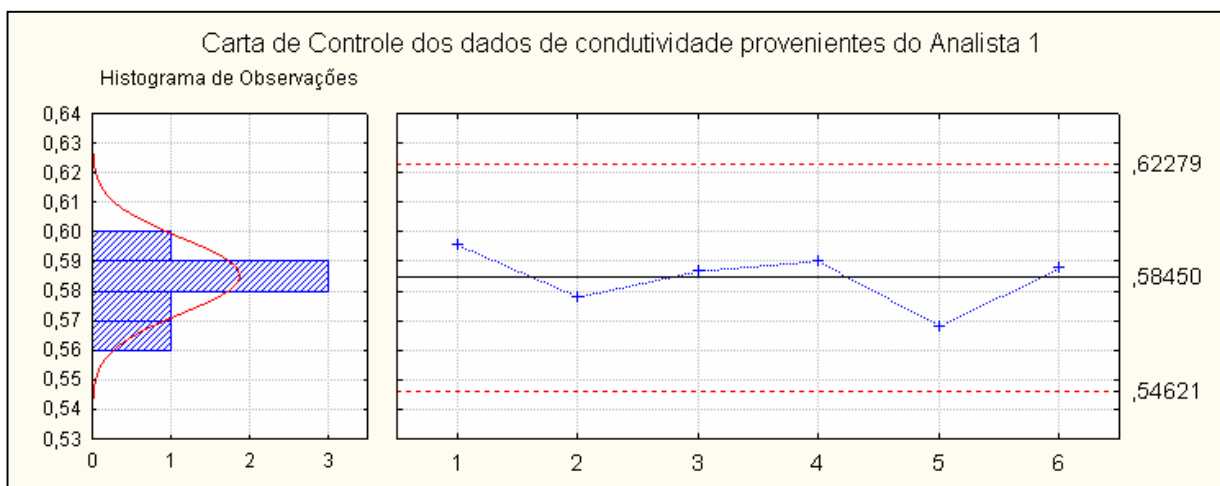


Ilustração 23 - Medidas de condutividade do analista 1

Com o comportamento dos dados obtidos pelo analista 1 foi possível visualizar os valores de condutividade, em seis determinações, e sua variabilidade em torno da média, correspondendo a faixa de normalidade ideal, conforme o histograma de observações que demonstra medidas sob controle com tendência central. O número de determinações diárias foi determinante de acordo com o tempo de coleta e o andamento da análise, que coincidentemente é o número mínimo recomendado de determinações para ensaios de precisão.

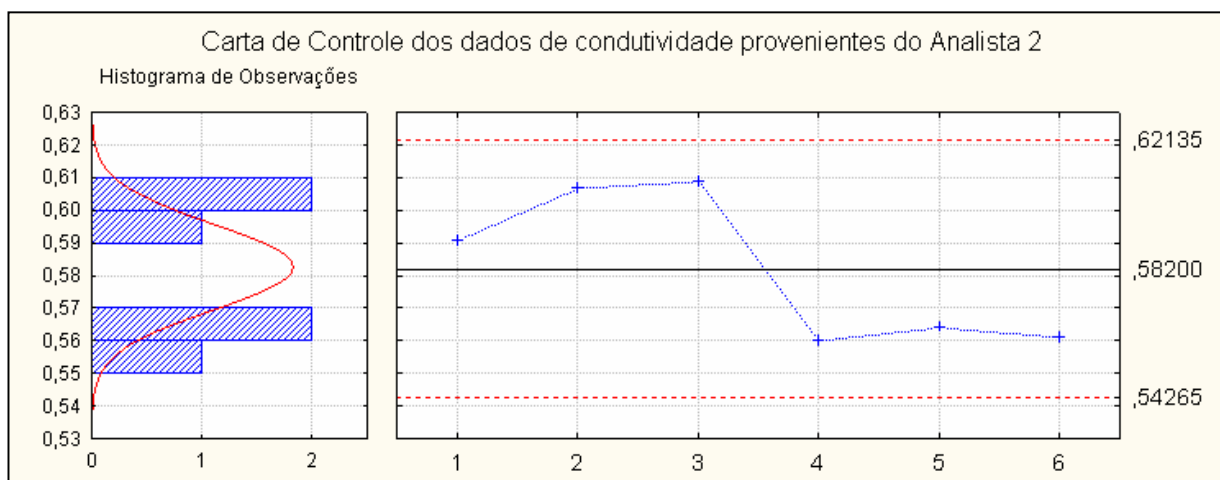


Ilustração 24 - Medidas de condutividade do Analista 2

O segundo analista obteve variabilidade em torno da média, porém com comportamento diferente do anterior.

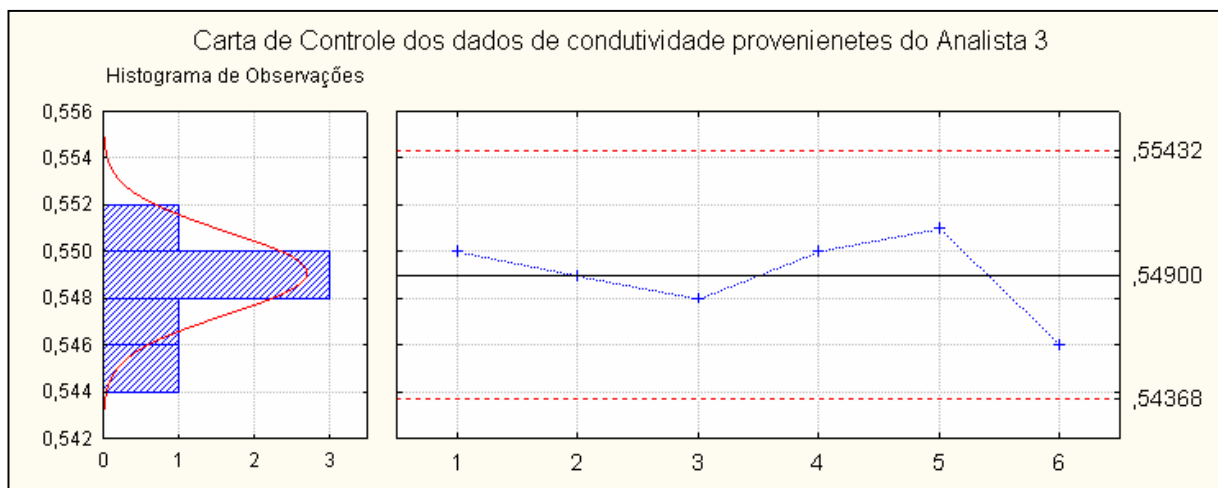


Ilustração 25 - Medidas de condutividade do Analista 3

Os resultados provenientes da análise do terceiro analista tiveram comportamento semelhante ao do primeiro, com distribuição normal centralizada.

Para efeito de comparação entre os três analistas foi feito o teste F de Snedecor, que mede a precisão entre analistas através da comparação das variâncias. A verificação foi feita em duplas. Para n-1 graus de liberdade e 95% de confiança.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \therefore$$

F = Teste de Snedecor

$S_1^2 = \text{Variância do analista 1} = 0,000099$

$S_2^2 = \text{Variância do analista 2} = 0,000537$

$S_3^2 = \text{Variância do analista 3} = 0,000003 = \text{menor variabilidade entre os dados}$

Comparando o analista 1 com o 2 : $F = 0,000537 \div 0,000099 = 5,42$

Analista 1 com o 3 : $F = 0,000099 \div 0,000003 = 33$

Analista 2 com o 3 : $F = 0,000537 \div 0,000003 = 189$

O valor de F_{tabelado} , para $n= 6$, $n-1$ graus de liberdade e 95% de confiança é igual a 5,05.

Então pôde-se concluir que por comparação de variâncias dos dados dos três analistas estes apresentaram diferença estatística de variância, pois $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$.

O analista 3 obteve resultados mais precisos, provenientes de melhor treinamento e experiência na coleta de amostras. A comparação foi adequada para medir o comportamento de cada um, independente da análise da precisão do método em estudo. Todos apresentaram bons resultados e vale aqui a ressalva do treinamento e tempo de experiência. Esses fatores foram determinantes e comprovam o tempo da experiência adquirida pelo terceiro analista, que obteve melhores dados de dispersão. Houve diferença , expressa em $\mu\text{S/cm}$, de uma ordem de grandeza.

Os fatores que se fizeram importantes, no decorrer do estudo para o método tipo III, foram:

- A coleta da amostra, com a amostragem da água, diagnosticado pelo o correto procedimento do analista;
- O comportamento do sistema de produção de WFI, mostrado ao longo de trinta dias consecutivos, que pode ser variável a cada dia.

Outros fatores tais como, a temperatura, a contaminação atmosférica e a calibração diária do equipamento não foram determinantes para esse método como se suspeitava. A temperatura, embora influencie diretamente na condutividade, é corrigida automaticamente pelo equipamento no ato de sua leitura. Não havendo opção de medida de condutividade sem a correção da mesma, portanto não foi fator que contribuísse para a estimativa de incerteza do método. A contaminação atmosférica da amostra não teve relevância para essa medição, pois para a amostragem correta a contaminação não é significativa, conforme provado experimentalmente no teste de estabilidade de WFI. Quanto à calibração do equipamento, ela é realizada diariamente permitindo a correção do mesmo através de artifício mecânico do sistema de medida, antes da leitura das amostras e na leitura de conferência do padrão de condutividade como recomendado pelo fabricante, através do *drift* de calibração.

4.2.4- Parâmetros de Validação

4.2.4.1 - Especificidade

Foram avaliadas as possíveis interferências na análise, tais como a exposição das amostras ao longo de um período determinado e queda de temperatura, conferindo assim sua estabilidade da água em questão, já que não existe padrão de condutividade com mesma matriz e faixa de especificação.

4.2.4.2 - Precisão

1. Reprodutibilidade

Esta é a comparação da variabilidade em condições diferentes, analistas e dias diferenciados, considerando a variabilidade do sistema de produção de WFI. Pela análise dos desvios padrão relativos dos três analistas em dias diferentes e pelos

dados do comportamento da água estudados, o método demonstra precisão entre analistas, através da Reprodutibilidade. Para fins de estudo e de cálculos de incerteza, será utilizado o desvio padrão ponderado.

Tabela 27 - Relação desvio padrão x analista - Método III.

Analista	Desvio padrão relativo (%)
1	1,70
2	3,98
3	0,32

Ao verificar, conforme Horwitz, que a precisão decresce quando a concentração decresce, ou seja, quanto menor a concentração pior é a precisão, é importante que a coleta da amostra seja adequada e homogênea. Mesmo com diferenças significativas entre os analistas, segundo critérios já expostos, de acordo com a tabela 27, existe precisão entre eles caracterizada pela Reprodutibilidade.

Com a ilustração 26 é possível visualizar a variabilidade dos dados dos diferentes analistas, com os desvios médios de cada um nas determinações. Observou-se que o analista 3 obteve valor médio de análise inferior ao valor médio global entre os dados dos três analistas. Os analistas 1 e 2 obtiveram comportamento semelhantes.

Na ilustração 27, gráfico de caixas, estão apresentados além da variabilidade dos três analistas, a amplitude dos dados gerados por cada um deles e a mediana. Foi notória a pequena variabilidade dos dados obtidos pelo analista 3.

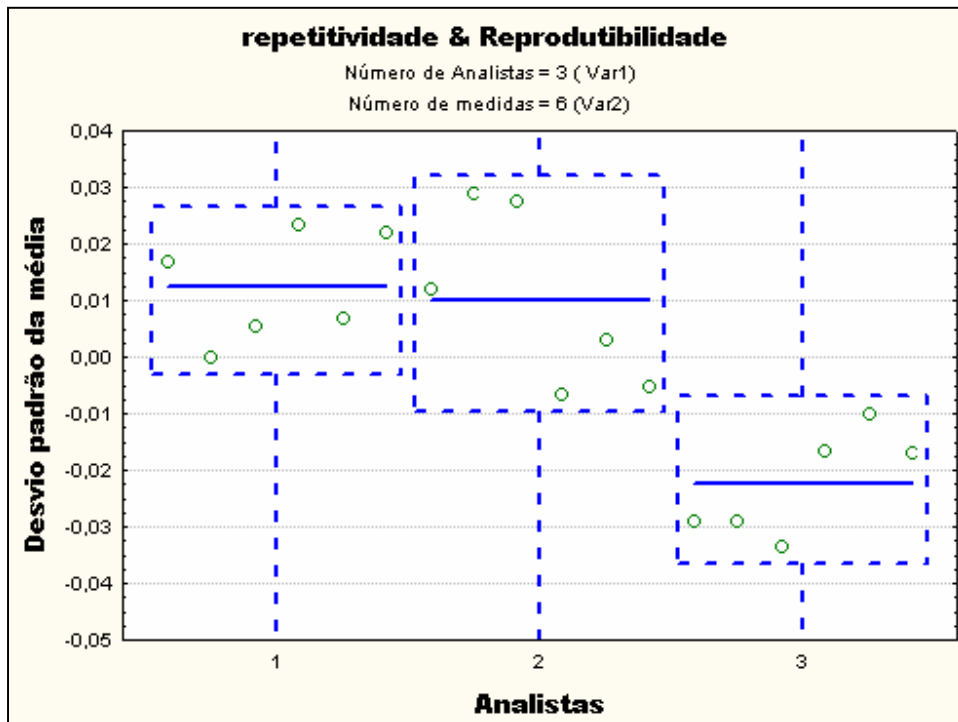


Ilustração 26 - Gráfico de Reprodutibilidade

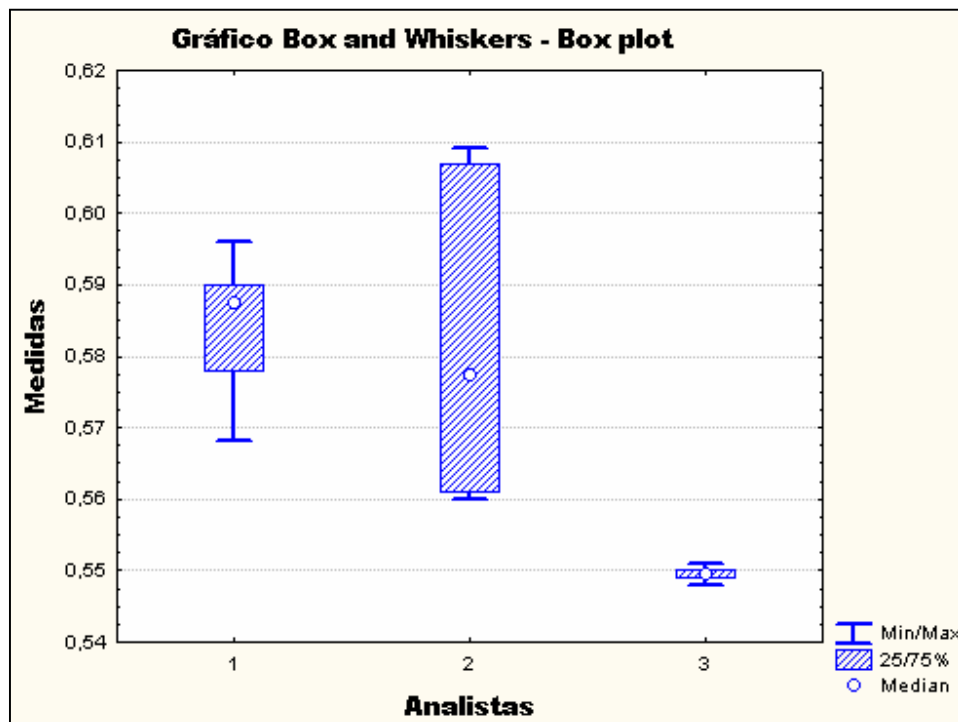


Ilustração 27 - Gráfico Box Whiskers dos três analistas

4.2.4.3 - Robustez

Com a avaliação dos resultados de condutividade e estabilidade das amostras e da análise, foi possível concluir que o método é robusto para essa finalidade, conforme USP 27.

4.2.5 - Diagrama de Causa e Efeito do Método tipo III

No diagrama de causa e efeito do método categoria tipo III, ilustração 28, foram consideradas as fontes de incerteza provenientes de resultados de repetitividade dos dados e a qualificação do condutímetro, cujo certificado de calibração do fornecedor encontra-se no anexo C₇. Todos estes parâmetros contribuíram com a variabilidade rotineira do Laboratório. Estas variáveis aceitas como dados de entrada foram avaliadas ao longo do trabalho e discutidas de acordo com seus resultados, especificações e referencias bibliográficas.



Ilustração 28: Diagrama de Ishikawa do método III

4.2.6 - Estimativas de Incerteza

A tabela 28, apresenta as grandezas de entrada e valores necessários para os cálculos da estimativa de incerteza padrão para o Método tipo III, seguida de observações referentes a cada uma das grandezas.

Tabela 28 - Incerteza padrão do Método tipo III.

Fontes de Incerteza	Tipo de Incerteza	Unidade	Valor	Distribuição de Probabilidade	Incerteza Padrão Relativa
1) Comportamento da Amostra	A	$\mu\text{S/cm}$	0,0519	Normal $\sqrt{30}$	0,0095
2) Estabilidade da Amostra com a temperatura	A	$\mu\text{S/cm}$	0,0205	Normal $\sqrt{12}$	0,0059
3) Reprodutibilidade	A	$\mu\text{S/cm}$	-	-	0,013
4) Calibração do Condutímetro	B	$\mu\text{S/cm}$	0,01	Normal K=2	0,0050
5) Resolução do Display	B	$\mu\text{S/cm}$	0,008	Retangular $\sqrt{3}$	0,0046

Com a finalidade de entendimento dos dados da tabela 28, as seguintes considerações fizeram-se necessárias:

1. O comportamento da amostra ao longo de trinta dias, demonstrou a estabilidade do sistema de produção de WFI, considerado-se o valor de desvio-padrão como contribuição da incerteza tipo A.
2. A estabilidade da amostra com a temperatura, através da carta de controle verificou-se o comportamento das réplicas com o decréscimo de temperatura.
3. Através dos dados de Reprodutibilidade, obtidos pelo cálculo do desvio-padrão ponderado, estimou-se a contribuição para a incerteza padrão.

$$S_c = \sqrt{\frac{S_1^2 \times (n-1) + S_2^2 \times (n-1) + S_3^2 \times (n-1)}{n_1 + n_2 + n_3 - 3}} =$$

$$= \sqrt{\frac{0,00001 \times (6-1) + 0,00054 \times (6-1) + 0,000003 \times (6-1)}{6 + 6 + 6 - 3}} = \mathbf{0,013 \mu S/cm}$$

4. Os dados obtidos da qualificação do equipamento – foi utilizado o certificado do padrão para a calibração, expresso em $\mu S/cm$.
5. A qualificação da performance do condutímetro - utilizou-se os dados fornecidos pelo representante. Os dados de entrada são provenientes de testes de resposta elétrica do display do equipamento (*cover closed - cover open*), cuja resistência foi expressa em $\pm \Omega$ transformada para $\mu S/cm$, através da fórmula $S = \frac{1}{\Omega}$. O dado do somatório do relatório de qualificação é igual a $\pm 0,08 \mu S/cm$.

4.2.6.1 - Cálculo da Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III

Para efeito de cálculo não foram utilizados os dados de estabilidade da amostra, item 2, pois assumiu-se que a contribuição tivesse sido considerada através dos dados do comportamento da amostra ao longo de trinta dias, pois essa contribuição apresentou o pior desvio padrão (maior valor de dispersão). Com os dados da tabela 28, foi possível fazer o somatório pela fórmula de Kragten.

$$u(y) = \sqrt{(0,0095)^2 + (0,013)^2 + (0,0050)^2 + (0,0046)^2} = \mathbf{0,032 \equiv 0,03 \mu S/cm}$$

4.2.6.2 - Estimativa de Incerteza Expandida do método tipo III

Incerteza padrão combinada x k (para 95% de confiança)

$$U = 0,03 \times 2 = 0,06 \mu\text{S/cm.}$$

Calculando um valor médio de condutividade, já que não dispomos de padrão de condutividade como um valor nominal, de todas as etapas igual a **0,548 $\mu\text{S/cm}$** , correspondente à incerteza de **$\pm 0,06 \mu\text{S/cm}$** . A especificação aceita de condutividade para água do tipo WFI é menor que 1,3 $\mu\text{S/cm}$.

4.7- Diagrama de Causa e Efeito “refinado” do método tipo III

De acordo com os dados acima, cálculos das estimativas de incerteza padrão combinada e expandida, foi possível concluir que o gráfico de causa e efeito deveria ser alterado para as reais condições comprovadas experimentalmente, como demonstrada na ilustração 29.

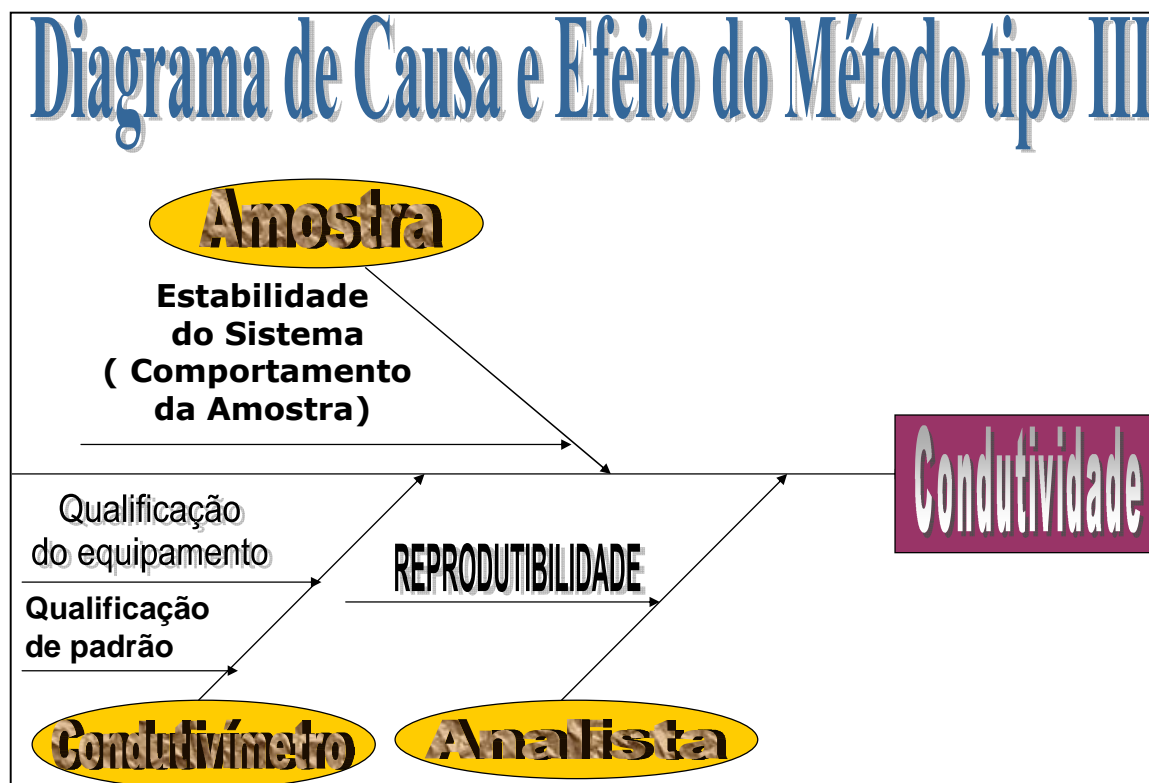


Ilustração 29 - Diagrama de Causa e Efeito refinado do Método tipo II

Todas as variáveis representadas no Diagrama de Ishikawa refinado, foram as que realmente contribuíram no processo de estimativas de incerteza do método tipo III.

4.8 - Contribuições para a Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III

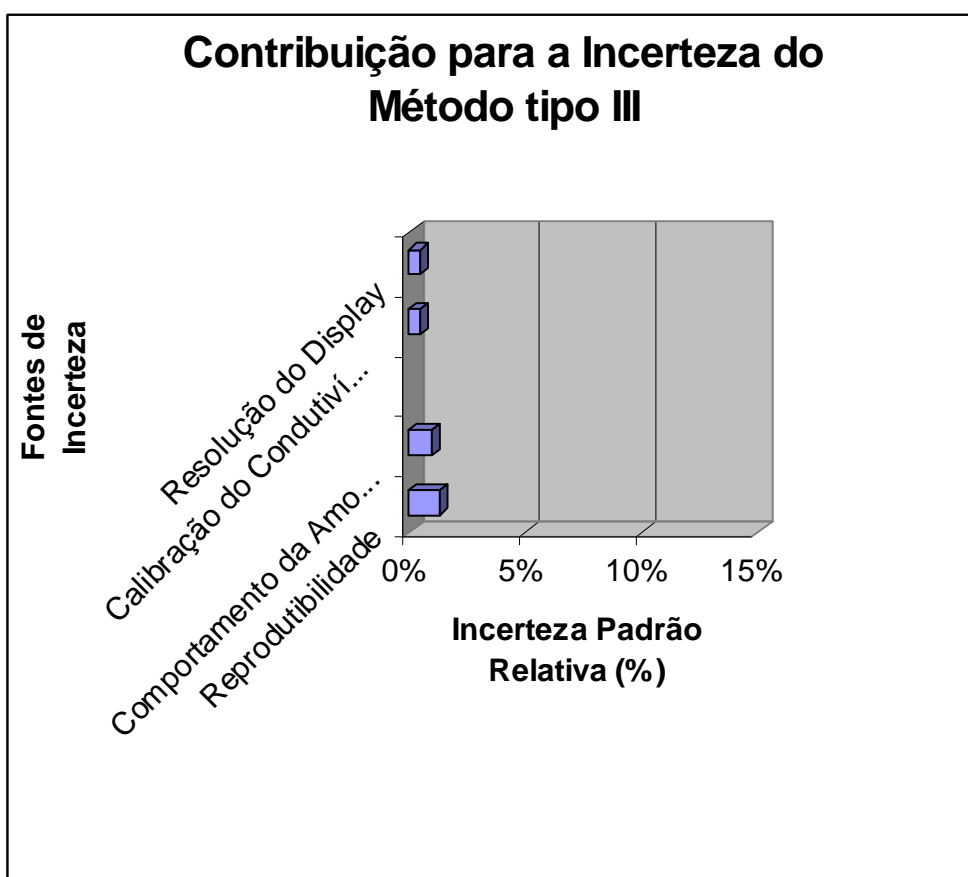


Ilustração 30 - Relação de variáveis que contribuíram para a Estimativa de Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III

Conforme a ilustração 30, gráfico de Pareto, foi possível concluir que as fontes que mais contribuíram para a Incerteza Padrão Combinada do Método tipo III, e que mais influenciaram na estimativa da incerteza, em ordem decrescente, foram: a Reprodutibilidade do Método, o comportamento da amostra, a calibração do condutivímetro e a resolução do display do equipamento.

5 - Conclusão

Com os resultados obtidos ao longo deste trabalho foi possível mostrar que as metodologias utilizadas no LAFIQ para as determinações do teor de PRRP em vacinas e a condutividade em amostras de água produzidas para injetáveis são adequadas ao propósito conforme mostrado pelos parâmetros de validação estudados - precisão, repetitividade e reprodutibilidade obtida em diversos dias por analistas diferentes.

Como ferramentas de controle visando o melhoramento contínuo dos resultados gerados no laboratório de controle de qualidade têm-se o uso contínuo do diagrama de Ishikawa para outros métodos que propiciarão o melhor entendimento das metodologias analíticas utilizadas; a implementação de cartas de controle para avaliar a performance dos analistas e dos métodos; aplicação de testes estatísticos que permitam comparar os resultados obtidos com aqueles esperados e por fim as estimativas de incertezas de medição, que mostram os parâmetros que podem influenciar no resultado analítico.

Através das cartas de controle construídas com os dados gerados por diversos analistas em dias diferentes vem sendo possível avaliar rotineiramente se o processo (a análise) está fora de controle e identificar as possíveis causas desta situação.

Através do cálculo das incertezas de medição dos dois métodos estudados pode-se identificar os parâmetros que mais contribuem para a estimativa de incerteza dos resultados finais. Para o método tipo I, determinação do conteúdo de polissacarídeo em vacina contra a Hib, usando cromatografia de troca iônica com detecção eletroquímica, demonstrando que os parâmetros que mais contribuíram para o valor da incerteza foram: a reprodutibilidade do método, seguida da concentração das soluções de trabalho, a contribuição do volume, da pureza do padrão, e por último as incertezas provenientes de massa. O resultado encontrado para a incerteza padrão combinada foi de $15 \pm 0,50 \mu\text{g} / \text{mL}$ e a incerteza padrão expandida $15 \pm 1,00 \mu\text{g} / \text{mL}$. Para o método tipo III, medida da condutividade em água para injetáveis, as variáveis que influenciaram para a estimativa da incerteza do método foram àquelas provenientes

da reprodutibilidade do método, o comportamento da amostra, a qualificação e resolução do equipamento. Os valores para as incertezas padrão combinada e expandida foram considerados em relação à média das medições de condutividade em estudo igual a $0,548 \mu\text{S} / \text{cm}$. Então podemos considerar os valores das incertezas padrão combinada encontrada igual a $0,548 \pm 0,03 \mu\text{S} / \text{cm}$ e $0,548 \pm 0,06 \mu\text{S} / \text{cm}$, para a incerteza padrão expandida, para o nível de confiança de 95%.

Como avaliação crítica, muitos autores discutem a verdadeira necessidade de expressar as incertezas das medições, considerando o tempo e custo gastos em estudos para calcular este valor. Entretanto as normas de qualidade sejam da área da química analítica ou das normalizações técnicas, fazem recomendações dessa estimativa devido aos benefícios que ela pode proporcionar. No entanto, é necessário o consenso para o cálculo e a expressão da incerteza, a fim de facilitar a interpretação apropriada dos resultados em análises químicas. A estimativa deste valor para um método analítico é fundamental para expressar adequadamente os resultados finais pois o valor da incerteza que “cerca” o resultado é importante para a aceitação de um produto e a garantia da execução da análise química com qualidade.

Em trabalhos futuros pretende-se implementar as ferramentas aqui desenvolvidas e estudadas como recursos para a melhoria na expressão de todos os resultados analíticos do laboratório de Controle Físico-químico garantindo assim a qualidade do trabalho dos analistas e a confiabilidade do Laboratório.

Como disse Chambers e Wheeler, 1992 “ se o gerenciamento sinaliza que atingir as especificações é satisfatório, o resultado invariavelmente será a falha” .

6- Anexos

ANEXO A

Pop relacionados aos métodos tipo I e tipo III.

A₁ – Determinação do conteúdo de polissacarídeo na vacina contra a Hib, por HPLC.

A₂ – Determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo na vacina Hib, PSTT e conteúdo de ribose no PRRP.

A₃ – Monitoramento dos sistemas de purificação de água.

A₄ - Análise físico-química de águas purificadas.

ANEXO B

Cromatogramas obtidos pelos três analistas do método tipo I.

B₁ - Cromatograma dos pontos da primeira curva de calibração.

B₂ - Cromatograma de amostras obtidos pelo analista 1.

B₃ - Cromatogramas de amostras obtidos pelo analista 2.

B₄ – Cromatogramas dos pontos da segunda curva de calibração.

B₅ – Cromatogramas de amostras obtidos pelo analista 3.

ANEXO C

Certificados de calibração e validação.

C₁ – Primeiro relatório de validação do método tipo I.

C₂ – Certificado de análise de amostra referência utilizada no método tipo I.

C₃ – Documentação de qualificação do equipamento, HPLC, utilizado no método tipo I.

C₄ – Certificados de calibração de pipetas automáticas utilizadas no método tipo I.

C₅ – Certificados de calibração de balões volumétricos utilizados no método tipo I.

C₆ – Certificado de calibração da balança utilizada no método tipo I.

C₇ – Documentação de qualificação do equipamento, condutivímetro, utilizado no método tipo III.

ANEXO D

Tabelas Estatísticas.

D₁ – t “ Student”.

D₂ – F “ Snedecor”.

D₃ – Fator de abrangência.

D₄ – Número de graus de liberdade.

D₅ - Fatores para construção das variáveis das Cartas de Controle.

7 - Bibliografia

1) ABNT - INMETRO. Guia para a Expressão da Incerteza de Medição. Terceira Edição Brasileira. Edição revisada de agosto de 2003: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement; NMKL, 1997 – Estimation and expression of measurement uncertainty in chemical analysis. Procedure nº5. NBR ISO/IEC 17025, 2001. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de ensaios. ABNT/RJ, Brasil.

2) Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. RDC 210; 2003.

3) AMC Background paper. Analytical Methods Committee Background nº1; June, 2004: What is Uncertainty from sampling, and why is it important? The Royal Society of Chemistry.

4) AMC, Royal Society Chemistry. The estimation and use of recovery factors. Analytical Methods Committee; London, 2000.

5) ANALION - Fabricante de condutivímetros: A análise da Condutividade. [<http://www.analion.com.br/condutividade.htm>] Capturado em 16 de novembro de 2004, Rio de Janeiro.

6) ANVISA. RDC 304; 2004. Diário Oficial da União de 07/12/2004.

7) AOAC. Horwitz, W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Vol. 2, chapter 50 (MA-CQ. 039). Gaithersburg; Maryland, 2000.

- 8) Associação Brasileira de Normas Técnicas: ABNT: Requisitos Gerais para competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração. NBR ISO/ IEC 17025; Brasil, Rio de Janeiro, 2001.
- 9) Barros, CB, Hirata, YS. Validação de Métodos Analíticos. Revisão 05. São Paulo;Outubro de 1999.[Apostila do curso de Validação de Metodologia Analítica] - EXPOLABOR.
- 10) Bassani, C. Validação de metodologias analíticas. [Apresentação ao Seminário de Validação Analítica]: Consultoria a Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ. Brasil; Rio de Janeiro;2004.
- 11) Bruce, P, Riekkola, ML. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. Finland; 1998.
- 12) Bujard E, Finot PA. Mesure de la disponibilité et du blocage de la lysine dans les laits industriels. Ann.Nutr.Alim.:1978, 32, 291-305.
- 13) Procedimentos operacionais padronizados em anexo
- o Determinação de condutividade em águas para injetáveis (WFI):pop 106040.617.
 - o Determinação do conteúdo de polissacarídeo em vacinas: pop 106040.588.
- 14) Dhillon, BS. Quality Control Reliability, and Engineering Design; 1985; USA.
- 15) Douglas C Montgomery, George C Runger, John Willey & Sons, Inc. Applied Statistics and Probability for Engineers; Third Edition; 2003.
- 16) Environmental Protection Agency. Science and Ecosystem Support. Manual EPA – Division: Region 4; December, 1997.
- 17) EURACHEM / EA Guide 04/10 – rev 02. Accreditation for Microbiological Laboratories; July 2002 .

- 18) FDA. Horwitz, W; Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs; USA; January, 1982.
- 19) FDA: Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation, Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation. USA: August; 2000.
- 20) Finot, PA et al. The extend of the maillard reaction during the processing of milk. Prog. Ed. Nutr.Sci. Vol 5,pp.345-355. Britain, 1981.
- 21) Flaig, JJ. Estimating the Process Sigma. Applied Technology; 2004;USA.
- 22) Funk W, Dammann V ; Donnevert G; Quality Assurance in Analytical Chemistry. Review of the Germain edition; 1995.
- 23) Furman, W B, Dorsey J G, Testes de Sensibilidade do Sistema para Métodos Oficiais de Cromatografia Líquida e Gasosa. Pharmaceutical Technology; agosto 1998.
- 24) Giménez, EC. The Uncertainty in the calculation of the blocked and reactive lysine in milk products, as determined by furosine method - Practitioner's Report. Switzerland. July, 2004.
- 25) Guia EURACHEM/ CITAC: Determinando a Incerteza na Medição Analítica. Segunda Edição- Editores: SRL Elisson (LGC, UK), M Rosslein (EMPA- Switzerland), A Williams (UK); 2002, Versão Brasileira.
- 26) Guimarães R. Pesquisa no Brasil: A Reforma Tardia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ; 2002.
- 27) Hirata, Y S. Gráficos de Controle para Laboratórios de Ensaio; 2002; São Paulo, Brasil.

- 28) INCQS. ALINORM 03/23. Proposta de diretrizes para avaliar métodos de ensaio. Apêndice VII; 11/04/2003.
- 29) Inman, E L, Frischmann, J K et al. General Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Samples . Journal of Chromatographic Science, vol 25; june 1987.
- 30) INMETRO. NIT-DICLA-028; Revisão 00 . BPL – Boas Práticas de Laboratório.
- 31) INMETRO:Orientações Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, (Brasil). DOQ-CGCRE-008; revisão 01:março de 2003.
- 32) Instituto Oswaldo Cruz. Relatório do IV Congresso Interno da FIOCRUZ. Termo de referência; 2002.
- 33) International Standards Organization: ISO 8466-1: Water Quality. Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimations of Performance Characteristics. First edition; 1990.
- 34) IUPAC Guidelines for The In-House Validation of Methods of Analysis. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, twenty-fourth session. Single Laboratory Validation. Consideration of Harmonized. Budapest, Hungary: 18-22; November 2002.
- 35) IUPAC Technical Report. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis: Thompson, M, Ellison Stephen LR, and Wood, R. UK; 1999.
- 36) Joint FAO/ WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling. Twenty-fourth Session: Single-Laboratory Validation. Budapest, Hungary; November, 2002.
- 37) Journal of AOAC International. Horwitz, W. Uncertainty - a chemist's view; 1998.

- 38) Lobo A. “Qualidade e Produtividade”in:[www.inmetro.gov.br]; Capturado em novembro de 2003, Rio de Janeiro.
- 39) Manual do condutivímetro - 712 Conductometer - METRHON AG CH-9101 Herisau - Schweiz.
- 40) Manual do HPLC de troca iônica – DIONEX DX 500 - USA.
- o Monitoramento dos sistemas de purificação de água: 106040.008.
- 41) Montgomery C D. Introduction to Statistical Quality Control. 4th edition. USA; 2001. Moulin, 1996; Fernandes A, 2000. “A Vacinologia é hoje uma Ciência em vias de autonomia”.
- 42) Oliveira A M S, Oliveira R & Hamerski A. Estudo de indicadores de qualidade em obras repetitivas.
- 43) Pharmaceutical Technology. Brittain H G. Validação de Métodos Analíticos Não Cromatográficos. NJ,USA; Junho de 1998.
- 44) Quantification of Carbohydrates and Glycols in Pharmaceuticals [Applications note 117. DIONEX Reference Library; 2004; USA].
- 45) Royal Society of Chemistry. Thompson, M. AMC Technical Brief n° 17: The Amazing Horwitz Function; July 2004.
- 46) Ryan, TP. Statistical Methods for Quality Improvement. Second Edition; 2000; USA.
- 47) Schissatti, M Luiz. Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de mestre em engenharia. Uma metodologia de implantação de cartas de shewhart para o controle de processos; Capítulo IV ; Dezembro de 1998; Santa Catarina; Brasil.

- 48) Schneerson R et al. Vaccines composed of polysaccharide protein conjugates: current status, unanswered questions, and prospects for the future. In: Bell R, Torrigiani G, eds. Towards better carbohydrate vaccines. Chichester, Wiley, 1987: 307 - 327 (published on behalf of the World Health Organization).
- 49) Schneerson R, Barrera O. Sutton A & Robbins JB. Utilização da proteína monomérica tetânica na vacina *Haemophilus influenzae* tipo b :(1980); J. Exp. Med. 152 (361-376).
- 50) Small, H, Bowman, B. Ion Chromatography: a historical perspective. American Laboratory. Ca, USA; 1998.
- 51) Statistics For Analytical Chemistry, Second Edition, Miller, J C; Miller, J N; New York, 1988.
- 52) StatSoft 6: Software STATISTICA. Versão 6.0; Tulsa USA.
- 53) The Determination of Carbohydrates, Alcohols and Glycols in Fermentation Broths. [Application note 122. DIONEX Reference Library; 2004; USA].
- 54) Thomas P. Ryan. Statistical Methods for Quality Improvement; Second Edition; 2000.
- 55) Triola, F M. Introdução à Estatística. Sétima edição;1999.
- 56) United States Pharmacopeia. USP 27. NF 22. The Official Compendia of Standards; 2004.
- 57) VALE L M. Como Obter Resultados Confiáveis em Cromatografia. Boletim Técnico No. 19: UNICAMP; São Paulo, Brasil.
- 58) Valente, L S. Como obter resultados confiáveis em cromatografia; 2001.
- 59) VIM - 3ª Edição. Rio de Janeiro, 2003.

60) Web´s

Página da FIOCRUZ

<http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/out03>

Guia de Navegação Especializada em Salud

<http://www.medicentro.com.co>

Ciência Tecnologia e Meio Ambiente – ABR – RADIOBRAS

<http://www.radiobras.gov.br>

ANVISA – Legislação - Resoluções

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/309-99.htm>

Instituto brasileiro de Pesos e Medidas

www.inmetro.gov.br

Instituto baiano de Metrologia e Qualidade

www.ibametro.gov.br

PDF created with Fine Print PDF Factory trial version

<http://www.fineprint.com>

Portal CAPES

www.periodicos.capes.gov.br

Instituto Nacional de Propriedade Industrial

- Transferência de Tecnologia
- Informações Tecnológicas
- Patentes

www.inpi.gov.br

Trabalhos Científicos sobre pesquisa de Incerteza de Medições Analíticas
www.scielo.org.br

Trabalhos Científicos sobre pesquisa de Incerteza de Medições Analíticas
www.labsgoogle.com/gviewer.html

61) Wheeler, DJ, Chambers, DS. Understating Statistical Process Control; 1992.