

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS / CTM
ESPECIALIZAÇÃO EM TECNOLOGIAS INDUSTRIAIS FARMACÊUTICAS**

Jéssica Yukie dos Reis Nagashima

Produção de material de referência *in house* para vacina contra Hib e produtos intermediários.

Melhorias contínuas de ensaios físico-químicos do controle de qualidade.

Rio de Janeiro, RJ

2013

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS / CTM
ESPECIALIZAÇÃO EM TECNOLOGIAS INDUSTRIAIS FARMACÊUTICAS**

Jéssica Yukie dos Reis Nagashima

Produção de material de referência *in house* para vacina contra Hib e produtos intermediários.

Melhorias contínuas de ensaios físico-químicos do controle de qualidade.

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.
Orientadora: Professora Msc Elô de Oliveira Rodrigues.

Rio de Janeiro, RJ

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJFicha

N147

Nagashima, Jéssica Yukie dos Reis

Produção de material de referência in house para vacina contra Hib e produtos intermediários. Melhorias contínuas de ensaio físico-químicos do controle de qualidade. / Jéssica Yukie dos Reis Nagashima. – Rio de Janeiro, 2013.

xvii, 74 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Msc. Elô de Oliveira Rodrigues

TCC (Especialização) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 68-74

1. Vacina conjugada. 2. PSTT. 3. Material de referência de trabalho. 4. Cálculos de incerteza. I. Título.

CDD 615

Jéssica Yukie dos Reis Nagashima

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientadora: Professora Msc Elô de Oliveira Rodrigues.

BANCA EXAMINADORA

Professora: Msc Elô de Oliveira Rodrigues, ENSP

Orientadora

Professor: Msc Lauro de Sena Laurentino

Professor: Msc Eduardo da Silva Gomes

DEDICATÓRIA

Aos meus referencias,

Meus pais, Armando e Neiva, pelo
ensinamento de vida e confiança
depósitos em mim.

A minha querida irmã, Tammy, por sua
amizade, conselhos e companheirismo.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos e graças concedidas, iluminando-me na realização deste trabalho e sempre olhando por mim.

Aos meus pais, Armando Mitio Nagashima e Neiva Garcia do Reis Nagashima, pelo carinho, apoio e dedicação comigo, sempre zelando e priorizando por uma educação de qualidade.

À minha irmã Tammy Missae dos Reis Nagashima, por sempre estar ao meu lado, me auxiliando nos trabalhos e matérias, e principalmente por seu carinho, companheirismo, amizade, conselhos e paciência.

A Ana Lucia Palmigiani e Cristine Maria Andrade pela permissão e incentivo da realização do curso de Pós-graduação *Lato sensu* em Farmanguinhos.

Agradeço à minha orientadora, Elô de Oliveira Rodrigues, por sua dedicação, paciência, conselhos e por estar sempre presente nos momentos certos.

Agradeço também a todos os amigos do LAFIQ que me apoiaram e incentivaram para a realização deste trabalho, contribuindo sempre para o meu enriquecimento profissional e pessoal. Em especial a Ana Paula Leal, Anelyse Lira, Cláudia Amorim, e Melissa Chamon por me ajudarem nos momentos difíceis.

Aos amigos da especialização, pela união do grupo e apoio nos momentos críticos.

EPÍGRAFE

“o conhecimento amplo e satisfatório sobre um processo ou fenômeno somente existirá quando for possível medi-lo e expressá-lo através de números.”

Lord Kelvin, 1883

RESUMO

Biomanguinhos é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz, responsável pela produção de vacinas, biofármacos e reativos. O departamento de controle de qualidade é constituído pelos laboratórios: Físico-Químicos, Microbiológico e Reativos, onde são responsáveis pela liberação dos produtos finais, intermediários e matérias-primas.

Calibração e qualificação de equipamentos, validação de métodos analíticos, aquisição de padrões, entre outras atividades de melhorias, estão sendo utilizadas para a regularização das metodologias realizadas nos produtos finais e intermediários, devido às exigências do órgão regulamentador. A aquisição e disponibilidade de materiais de referências e/ou padrões que possuam características semelhantes aos produtos produzidos por Biomanguinhos é uma das dificuldades encontradas pelos laboratórios de controle de qualidade. Como também seu elevado custo tornando-os inviáveis para a utilização nas metodologias realizadas nas análises de rotina.

Esta monografia tem como objetivo realizar melhorias contínuas nos ensaios físico-químicos do controle de qualidade na produção de material de referência *in house* nos produtos obtidos em Biomanguinhos. Considerando todas as normas vigentes relacionadas à regularização dos métodos de controle de qualidade serão realizados o planejamento e elaboração do material de referência *in house*. Os requisitos necessário para a obtenção de material de referência para a implementação da sua metodologia será descrito neste trabalho.

O material “candidato” a material de referência é o PSTT, que é formulado a partir da conjugação do PRRP (polirribosil-ribitol fosfato) com a proteína monomérica tetânica, tornando-se assim o produto intermediário utilizado para a produção da vacina contra *Haemophilus influenzae* (vacina Hib).

A partir da utilização de ferramentas estatísticas adequadas será realizada a avaliação do “candidato” o material de referência utilizando os estudos de caracterização, homogeneidade e estabilidade. Com isso, será atribuído um valor de incerteza combinada expandida ao material de referência de trabalho, que tem como componentes as incertezas de medição, homogeneidade e estabilidade. Assim, dando maior confiabilidade aos produtos analisados pelo laboratório.

ABSTRACT

Biomanguinhos is a unit of the Oswaldo Cruz Foundation, responsible for the production of vaccines, biopharmaceuticals and diagnostic kit. The Quality Control Department is composed by the following laboratories: Physicochemical, Microbiological and Diagnostic Kits, which are responsible for the release of the final products, intermediated products and the raw materials.

Calibration and qualification of equipments, analytical methodology validation, purchasing standard among other improvement activities, are used for regularization of methodologies performed to the final products and intermediates, due the requirements of the regulator authority. The acquisition and availability of references materials and/or standards that have similar characteristics to those produced by Biomanguinhos is one of the difficulties that the Quality Control Laboratories face, as well as the high cost of them and these points make the use of them impracticable to the routine analysis.

This monograph purpose to achieve continuous improvement in physical-chemical quality control in the manufacture of “*in house*” reference material obtained in Biomanguinhos. Considering all regulatory norms related to the regularization of quality control methods, will be carried out the planning and preparation of reference material “*in house*”. The requirements necessary to obtain the reference material for the methodology implementation will be described.

The reference “candidate” material is PSTT, which is formulated by the combination of PRRP (polirribosil-ribitol fosfate) and the monomeric tetanus protein, becoming the intermediate product used to produce the *Haemophilus influenzae* vaccine (Hib vaccine).

Based on the adequate statistical tools the reference “candidate” material will be valued through the studies of characterization, homogeneity and stability. Thus, a combined uncertainty expanded value will be attributed to the reference material, which is composed by uncertainty measurements, homogeneity and stability. In this way, it should give more reliability to the results obtained in the quality control analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura da bactéria <i>Haemophilus influenzae</i> (haste azul) colonizando o epitélio nasal humano (Sciencephoto Library 2012).	6
Figura 2 – Estrutura química Poliribosil-ribitol-fosfato (Verez-Bencomo 2004).	9
Figura 3 – Esquema da vacina contra a <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, composta de PRRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico (Almeida 2005).	10
Figura 4 – Fluxograma de produção da Vacina contra Hib (Rodrigues 2009).	11
Figura 5 – Sobreposições de funções associadas com rastreabilidade de medição e qualidade analítica (Inmetro DOQ-CGCRE-016 – Revisão 02 – Fev/2010).	22
Figura 6 – Esquema experimental do preparo do material de referência (ISO GUIDE 35:2003).	23

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Correlação entre ensaios físico-químicos de produtos e intermediários da vacina Hib;	25
Quadro 2 – Principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de D´ribose;	59
Quadro 3 – Principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de Proteína;	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Curva analítica de D-Ribose na Determinação de Conteúdo de Polissacarídeo;	27
Tabela 2 – Curva analítica de BSA na Determinação de Proteína de Lowry;	28
Tabela 3 – Planejamento para estudo de estabilidade (mês);	31

Tabela 4 – Resultados obtidos da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs;	42
Tabela 5 – Resultados obtidos da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT (pesado), após o teste de Grubbs;	43
Tabela 6 – Resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT;	48
Tabela 7 – Anova dos resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de D´ribose;	49
Tabela 8 – Anova dos resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de Proteína;	50
Tabela 9 – Resultados de D´ribose no estudo de estabilidade (2 - 8°C);	54
Tabela 10 – Resultados de Proteína no estudo de estabilidade (2 - 8°C);	55
Tabela 11 – Resultados de D´ribose para a análise de tendência;	56
Tabela 12 – Resultados de proteína para a análise de tendência;	57
Tabela 13 – Incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de D´ribose de cada fonte	60
Tabela 14 – Incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de Proteína de cada fonte.	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de D´ribose no PSTT (pipetado);	37
Gráfico 2 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de D´ribose no PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs;	38
Gráfico 3 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no PSTT (pesado);	38
Gráfico 4 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no PSTT (pipetado);	39
Gráfico 5 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de Proteína no	

PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs;	40
Gráfico 6 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no PSTT (pesado);	41
Gráfico 7 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de Proteína no PSTT (pesado), após o teste de Grubbs;	41
Gráfico 8 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no teste de homogeneidade do PSTT;	45
Gráfico 9 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no teste de homogeneidade do PSTT;	46
Gráfico 10 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no teste de homogeneidade do PSTT, após o teste de Grubbs;	47
Gráfico 11 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;	51
Gráfico 12 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;	52
Gráfico 13 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;	53
Gráfico 14 – Medidas dos resultados de D´ribose <i>versus</i> tempo (meses) – estudo de estabilidade (2 - 8°C);	56
Gráfico 15 – Medidas dos resultados de Proteína <i>versus</i> tempo (meses) – estudo de estabilidade (2 - 8°C);	57
Gráfico 16 – Contribuição de cada componente na incerteza do material de referência;	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Biomanguinhos -	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BPL -	Boas Práticas de Laboratório
BPF -	Boas práticas de Fabricação
BSA -	Soro de Albumina Bovina
CETEM -	Centro de Tecnologia Mineral
CETEPO -	Centro Tecnológico de Polímeros
CG -	Controle de Qualidade
CV -	Coefficiente de Variação
DEBAC -	Departamento de Bacteriologia
DEQUA -	Departamento de Qualidade
DTP -	Difteria, Pertussis e Tétano
GUM -	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement
GQ -	Garantia da Qualidade
GSK -	GlaxoSmithKline
Hi -	<i>Hæmophilus infuenzae</i>
Hib -	<i>Hæmophilus infuenzae</i> tipo b
HiNT -	<i>Hæmophilus infuenzae</i> não tipáveis
ILAC -	International Laboratory Accreditation Co-Operation
INCQS -	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO -	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO -	International Organization for Standardization
IT -	Instrução de trabalho
LAFIQ -	Laboratório Físico-Químico
LRMIPT -	Laboratório de Referência Metrológica
MR -	Material de Referência

MRC -	Material de Referência Certificado
NIBSC -	National Institute for Biological Standards and Control - Reino Unido
NIST -	National Institute Standard and Technology - Estados Unidos
POP -	Procedimento Padronizado Padrão
PMT -	Proteína Monomérica Tetânica
PRRP -	Polirribosil-ribitol fosfato
PSTT -	Conjugado do Polissacarídeo com a Proteína Monomérica Tetânica
s -	Desvio-padrão
VIM -	Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia
u -	Incerteza
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	3
3. OBJETIVO	4
4. DESENVOLVIMENTO	5
4.1. O microrganismo <i>Haemophilus influenzae</i> (Hi)	5
4.2. Patogênese	7
4.3. A vacina conjugada contra <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b (Hib)	7
4.4. Fatores determinantes da eficácia de vacina conjugadas	8
4.5. Cápsula polissacarídica: Poliribosil-Ribitol-Fosfato (PRP)	8
4.6. O polissacarídeo conjugado com proteínas carreadoras	9
4.7. A vacina conjugada contra <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b (Hib): a matriz analítica	10
4.8. A importância vacina Hib e sua vacinação	11
4.9. Controle de qualidade	13
4.10. Material de Referência (MR)	14
4.11. Material de Referência Certificado (MRC)	15
4.12. ISO Guias	16
4.13. O Material de Referência no Brasil	17
4.14. Caracterização, estudos de homogeneidade e estabilidade	18
4.15. Estimativa da incerteza de medição	19
4.16. Fontes de incerteza	21
4.17. Rastreabilidade e confiabilidade	22
5. METODOLOGIA	23
5.1. Planejamento técnico do material de Referência	23
5.2. Preparo do candidato o material de referência	24
5.3. Envase	24
5.4. Metodologias analíticas	25
5.4.1. Determinação de D'ribose (Orcinol)	26

5.4.1.1. Preparo dos reagentes	26
5.4.1.2. Soluções padrão	26
5.4.1.3. Curva analítica	26
5.4.1.4. Execução do método	27
5.4.2. Determinação de proteína (método Lowry)	27
5.4.2.1. Preparo dos Reagentes	27
5.4.2.2. Preparo da solução padrão BSA 200 µg/mL	28
5.4.2.3. Curva Analítica	28
5.4.2.4. Execução do método	29
5.5. Caracterização, homogeneidade e estabilidade	29
5.6. Estudo de estabilidade a longo prazo	30
5.7. A análise de tendência	31
5.8. Teste de Grubbs (G)	32
5.9. Procedimento para determinação da incerteza do MRC	33
5.10. A avaliação dos resultados	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
6.1. Caracterização e comparação das metodologias	36
6.1.1. Carta controle	36
6.1.1.1. Determinação de D´ribose	37
6.1.1.2. Determinação de Proteína	39
6.1.2. Resultados do coeficiente de variação	42
6.2. Homogeneidade	44
6.2.1. Carta controle	44
6.2.1.1. Determinação de D´ribose	45
6.2.1.2. Determinação de Proteína	46
6.2.2. Resultados do coeficiente de variação	47
6.2.3. Análise da variância	48
6.2.3.1. Determinação de D´ribose	48
6.2.3.2. Determinação de Proteína	49

6.3. Estabilidade	50
6.3.1. Carta controle	51
6.3.1.1. Determinação de D´ribose	51
6.3.1.2. Determinação de Proteína	52
6.3.2. Resultados do coeficiente de variação	53
6.3.3. Análise de Tendência	56
6.4. Cálculos de incerteza do material de referência	58
6.4.1. Componente associada à caracterização	58
6.4.1.1. Estimativa de Incerteza dos Resultados das medições de D – Ribose (Orcinol)	58
6.4.1.2. Estimativa de Incerteza dos Resultados das medições de Proteína (Lorwy)	61
6.4.2. Componente associada à homogeneidade	63
6.4.3. Componente associada à estabilidade	63
6.4.4. Incerteza Combinada	63
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

Para o sucesso das empresas e instituições no Brasil, o Sistema de Qualidade vem se tornando essencial. No Sistema da Qualidade, o laboratório deve estabelecer, implementar e manter um sistema apropriado ao escopo das suas atividades (ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005). Este sistema é uma estrutura organizacional que envolve os procedimentos, responsabilidades, processos e recursos necessários para implementação da Gestão de Qualidade (ISO 8402).

Setores regulamentados legalmente devem atender às “Boas Práticas de Laboratório” (BPL) e “Boas Práticas de Fabricação” (BPF). As Boas Práticas de Laboratório referem-se ao Sistema da Qualidade que diz respeito à organização e às condições sob as quais estudos em laboratório e campo são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados. As Boas Práticas de Fabricação, voltadas para a produção de medicamentos, assegura que os produtos sejam fabricados em conformidade e controlados em relação aos padrões de qualidade solicitados pelo registro sanitário do produto (PIC/S 2009). Sendo assim, as “Boas Práticas” estão relacionadas com os procedimentos de fabricação e controle de qualidade.

O maior desafio para qualquer laboratório que tem como objetivo o controle de qualidade é garantir que os resultados dos métodos analíticos utilizados na rotina – produtos finais e intermediários – sejam de qualidade. A confiabilidade dos resultados é determinada através de diversos meios, tais como: a validação de métodos, rastreabilidade através de padrões certificados, analistas qualificados e treinados, equipamentos calibrados, entre outros.

A Vacina Hib e seus intermediários são produzidos e controlados através de procedimentos provenientes do processo de transferência de tecnologia com a GlaxoSmithkline (GSK) – Bélgica. Os métodos de controle físico-químicos relacionados aos produtos intermediários da vacina Hib, já se encontram estabelecidos e as metodologias validadas (Rodrigues 2009).

Em função da crescente demanda do mercado e o controle exigido em cada processo, a utilização destes materiais em ensaios analíticos torna-se essencial para

garantir a rastreabilidade e confiabilidade metrológica das medições, aliada às ferramentas estatísticas como as cartas de controle (EURACHEM/ CITAC -2003).

2. JUSTIFICATIVA

Farmacos e vacinas produzidos em BioManguinhos possuem matrizes biológicas com características próprias. Há poucos materiais de referência certificados disponíveis no mercado com as características que atendam aos ensaios necessários para aprovação do controle de qualidade. Mesmo os poucos disponíveis ficam inviabilizados de utilização em ensaios de rotina por serem caras e poucas quantidades ofertadas. O Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Biomanguinhos possui um grupo que tem se dedicado a estabelecer materiais de referência que atendam suas necessidades analíticas.

Este projeto tem como objetivo dar continuidade ao processo do Departamento de Controle de Qualidade em estabelecer materiais de referência para ensaios físico-químicos utilizando ISO guias da série 30-35, que estabelecem os critérios de produção de materiais de referência.

É possível acompanhar a resposta do método, sua tendência e os possíveis erros aleatórios e/ou sistemáticos. Desta forma, o desenvolvimento de materiais de referência viabilizaria a diminuição de custos do departamento, possibilitaria a produção de materiais com características similares aos produtos em análise, agregando uma maior confiabilidade aos produtos de Biomanguinhos.

3. OBJETIVO

Com base nas informações anteriormente expostas, este projeto possui como proposta a elaboração de um material de referência *in house*, a fim de atender a demanda da própria unidade. Com o objetivo de avaliar a viabilidade da utilização de um dos intermediários da vacina Hib a partir de ensaios de caracterização, homogeneidade, estudo de estabilidade e tratamento dos dados estatisticamente.

Para a realização deste estudo será utilizado um lote de PSTT, que foi obtido a partir da conjugação do polirribosil-ribitol fosfato (PRP) com a proteína monomérica tetânica (PMT). A escolha do material de referência se deve aos seguintes fatores:

- O custo do padrão fornecido e a quantidade disponível;
- A validade do PSTT (01 ano estabelecido por Biomanguinhos);
- A facilidade do uso do PSTT nas análises em relação à vacina Hib;
- A abrangência em relação à(s) técnica(s) que podem ser utilizadas para ensaios em comum com a vacina Hib e com o polirribosil-ribitol fosfato (PRP).

4. DESENVOLVIMENTO

Este item consiste em desenvolver um arcabouço teórico sobre o assunto escolhido como objetivo de estudo, abordando desde a vacina Hib até a elaboração do material de referência *in house*, como também as metodologias utilizadas no controle de qualidade.

4.1. O microrganismo *Haemophilus influenzae* (Hi)

O gênero *Haemophilus* pertence à família *Pasteurellaceae*. É classificado como uma bactéria gram-negativa, imóvel, que não forma esporos, e que pela microscopia, sua morfologia pode ser de cocobacilo Gram-negativo ou de bastonete curto, sendo por isso os *Haemophilus* também referidos como bacilos pleomórficos. Podem ser capsulada ou não-encapsulada, dependendo da estrutura química da camada externa polissacarídica (Jordens e Slack 1995; Euzéby, 2010).

Os *Haemophilus* também podem ser classificados fenotipicamente, de acordo com seu biotipo. São divididos em oito biotipos fornecendo informações valiosas para a epidemiologia, pois os biotipos dos Hi estão associados a diferentes tipos de infecção, fontes de isolamento, propriedades antigênicas e resistência a antibióticos (Campos 1999).

O *Haemophilus influenzae* (Hi) foi descrito pela primeira vez por Pfeiffer, em 1892. A denominação do gênero foi devido à necessidade da hemina (fator X) para o seu crescimento, que é encontrada no sangue de alguns mamíferos. O nome da espécie foi dado erroneamente, pois acreditava-se que era o microrganismo causal da gripe, epidêmica na época (Marrs *et al.* 2001). Mais tarde, foi descoberto que o agente da gripe era o vírus influenza e que o Hi era o responsável por infecções secundárias (CDC, 2006).

A espécie *Haemophilus influenzae* (Hi) é a mais importante e inclui diversos sorotipos capsulares (a-f) bem como cepas não tipáveis. As doenças causadas por esse microrganismo compõem um leque de infecções, de caráter agudo, que

acometem, sobretudo o Sistema Nervoso Central (SNC) e os tratos respiratórios alto e baixo, francamente predominantes em crianças e associadas principalmente ao *Haemophilus influenzae* do tipo capsular b ou Hib (Murphu *et al.* 1993).

Os *H. influenzae* são classificados de acordo com os antígenos específicos de suas cápsulas em sorotipos de **a** até **f**, descritos originalmente por Pittman em 1931. Esta classificação ainda é utilizada nos dias atuais em laboratórios clínicos e de pesquisa que isolam e identificam estes microrganismos. Aqueles que não reagem com os antissoros específicos (a-f), não expressando a cápsula na sua superfície, são denominados *Haemophilus influenzae* não tipáveis (HiNT). Os que reagem com um dos seis sorotipos (a-f) são denominados capsulados (tipáveis), recebendo a letra do sorotipo na sua nomenclatura, por exemplo: *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (CDC, 2006).

A espécie *Haemophilus influenzae* é considerada como a mais importante em relação à infecção em humanos (Almeida 2005). Existem seis sorotipos capsulados de *Haemophilus influenzae* (a, b, c, d, e, f) (Kelly *et al.* 2004). Sendo o tipo b (Hib) responsável por 95% dos casos de infecções invasivas em crianças menores de cinco anos de idade (Figura 1) (Lorthiois 2007). Podendo causar diferentes manifestações que variam da infecção assintomática a doenças invasivas graves, com altos índices de mortalidade e morbidade na infância no mundo todo (Bouskela *et al.* 2000, Bricks 1998).

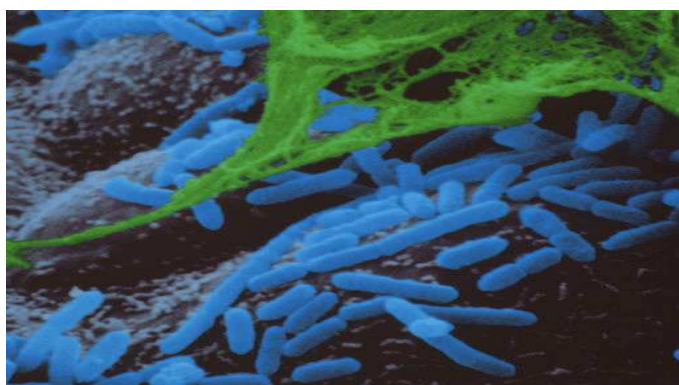


Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura da bactéria *Haemophilus influenzae* (haste azul) colonizando o epitélio nasal humano (Sciencephoto Library 2012).

4.2. Patogênese

A patogenicidade deste sorotipo está relacionada à cápsula e compreende epiglótite, pneumonia, artrite séptica, conjuntivite e pericardite. Sendo a mais grave de todas e digna de destaque a infecção no Sistema Nervoso Central (SNC), que pode ser letal ou deixar seqüelas neurológicas permanentes como perda de audição, retardo mental e convulsões (Almeida 2005; Ayub e Pinto 1994; Carvalho e Andrade, 2006).

O sorotipo b de *Haemophilus influenzae* é a causa mais comum de meningite bacteriana e uma causa frequente de outras infecções graves acometendo, principalmente, crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos imunossuprimidos (Kaplan 1988). Dentre outras manifestações, a Hib pode provocar bacteremias, otite média aguda, septicemia, epiglótite, osteomielite, pneumonia e artrite séptica (Kaplan 1988, Kelly *et al.* 2004).

Embora tenham sido relatados muitos casos de infecções promovidas pela Hib, sua patogênese não está completamente esclarecida (Albani 2008). Entretanto, o *Haemophilus influenzae* tipo b apresenta algumas estruturas presentes em sua superfície e secreta algumas substâncias que podem ser determinantes para a patogenicidade do microrganismo. Dentre estas, a cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência (Lorthiois 2007).

4.3. A vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib)

As vacinas conjugadas de polissacarídeos-proteínas são membros de uma nova classe de vacinas, planejadas para imunizar bebês contra doenças causadas por bactérias cuja virulência está ligada à presença de cápsula de polissacarídeos extracelulares. Isto inclui a cepa 20752 (*Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib)), que produz uma cápsula de polissacarídeos consistindo de unidades alternadas de ribose e ribitol, covalentemente agrupadas por um fosfato através de ligações de diéster fosfórico. O polissacarídeo de Hib 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 ao toxóide tetânico através de condensação com carbodiimida.

Após a purificação, o conjugado é liofilizado em presença de lactose como estabilizador (Bula da Vacina Conjugada contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib) (Biomanguinhos 2010)).

4.4. Fatores determinantes da eficácia de vacina conjugadas

As vacinas conjugadas utilizam o mesmo polissacarídeo de Hib, porém diferem em alguns fatores, tais como o tipo do carregador protéico empregado, o tamanho da cadeia polissacarídica e o método pelo qual é realizada a conjugação química, a proporção polissacarídeo/proteína e a presença de molécula espaçadora (Lorthiois 2007).

Como a imunogenicidade da vacina conjugada produzida depende dos fatores citados anteriormente (principalmente em relação ao processo de conjugação polissacarídeo-proteína que não apresenta um rendimento de 100%, havendo a presença de polissacarídeo e proteína livres em solução), para obter conjugados com características físico-químicas bem definidas, uma série de parâmetros deve ser controlada, a fim de garantir a reprodutibilidade do processo (Lorthiois 2007). Sendo assim, torna-se importante o desenvolvimento de métodos apropriados de controle de qualidade do produto final. Pesquisas continuam sendo realizadas de forma a desenvolver métodos mais simples, rápidos, sensíveis e de menor custo (Silva 2008).

4.5. Cápsula polissacarídica: Polirribosil-Ribitol-Fosfato (PRP)

A cápsula de polissacarídeo dos Hi é o principal fator de virulência entre os seis sorotipos (a-f), sendo o Hib mais freqüente nos quadros infecciosos. A sua cápsula é constituída de polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), quimicamente composta por monômeros contendo unidade de ribose, ribitol e fosfato. Esta cápsula faz com que seja menos vulnerável aos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, protegendo-o contra a fagocitose, ao impedir a fixação de anticorpos e a lise bacteriana pela fixação do complemento (Trabulsi e Martinez 2004).

Felizmente, o PRRP atua como antígeno, sendo então capaz de induzir uma resposta imune protetora timo independente ao homem. Esta característica foi explorada pelos cientistas durante o desenvolvimento da primeira geração de vacinas que eram compostas apenas pelo polissacarídeo capsular (Almeida 2005; Ayub e Pinto 1994; Carvalho e Andrade 2006).

Além destes mecanismos de defesa, a cápsula, presente também em outros microrganismos, pode prevenir a desidratação da célula bacteriana no ambiente em que se encontra, o que facilita a transmissão entre os hospedeiros. É composta de uma longa cadeia de polissacarídeos consistindo de unidades repetidas menores. Sua biossíntese ocorre no citoplasma e o polissacarídeo é transportado através da membrana citoplasmática para o periplasma, atravessando a membrana externa e ancorando-se na superfície bacteriana (Sukupolvi-Petty *et al.* 2006).

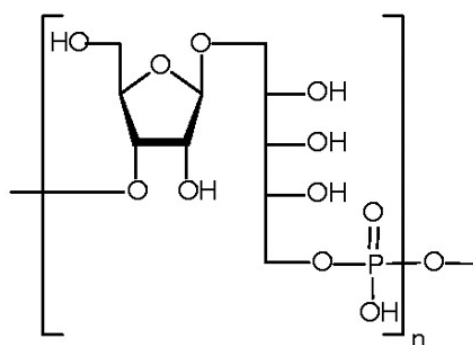


Figura 2 – Estrutura química Poliribosil-ribitol-fosfato (Verez-Bencomo 2004).

4.6. O polissacarídeo conjugado com proteínas carreadoras

Contudo, a primeira geração de vacinas era capaz de induzir imunidade protetora em crianças acima de 24 meses de idade, mas era ineficaz em crianças entre 6 e 17 meses, grupo de maior risco de infecção pelo Hib.

O desenvolvimento de vacinas polissacarídicas conjugadas representou um grande avanço na tecnologia de produção de imunobiológicos, pois foi demonstrado que um polissacarídeo covalentemente ligado a uma proteína transportadora

aumentaria sua imunogenicidade ((Almeida 2005; Ayub e Pinto 1994; Carvalho e Andrade 2006).

Por esta razão, uma nova geração de vacinas foi desenvolvida a partir da conjugação de uma proteína carreadora com polissacarídeos. Esta conjugação não somente induziu a circulação de anticorpos e a memória imunológica em crianças, como também resultou na diminuição da colonização nasofaríngea de Hib no organismo (WHO core 2002).

As vacinas licenciadas para uso contra o *Haemophilus influenzae* tipo b são baseadas na conjugação com o toxóide diftérico, o toxóide tetânico ou com uma proteína externa de membrana meningocócica. Deste modo, as vacinas conjugadas contra Hib apresentam variações quanto ao tipo de proteína carreadora, ao método de conjugação utilizado e ao tamanho da cadeia do polissacarídeo, fornecendo diferentes propriedades imunológicas (WHO 2002).

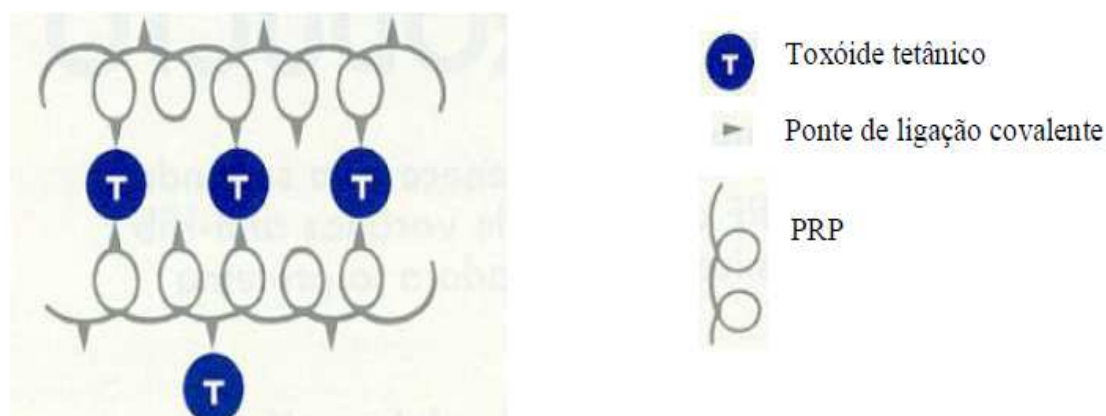


Figura 3 – Esquema da vacina contra a *Haemophilus influenzae* tipo b, composta de PRRP covalentemente ligado ao toxóide tetânico (Almeida 2005)

4.7. A vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib): a matriz analítica

Para a produção da vacina conjugada contra a Hib, são utilizados processos avançados de conjugação química e de bioengenharia para fermentação, purificação e caracterização de macromoléculas(Gadelha 2003), como mostra o fluxograma simplificado abaixo:

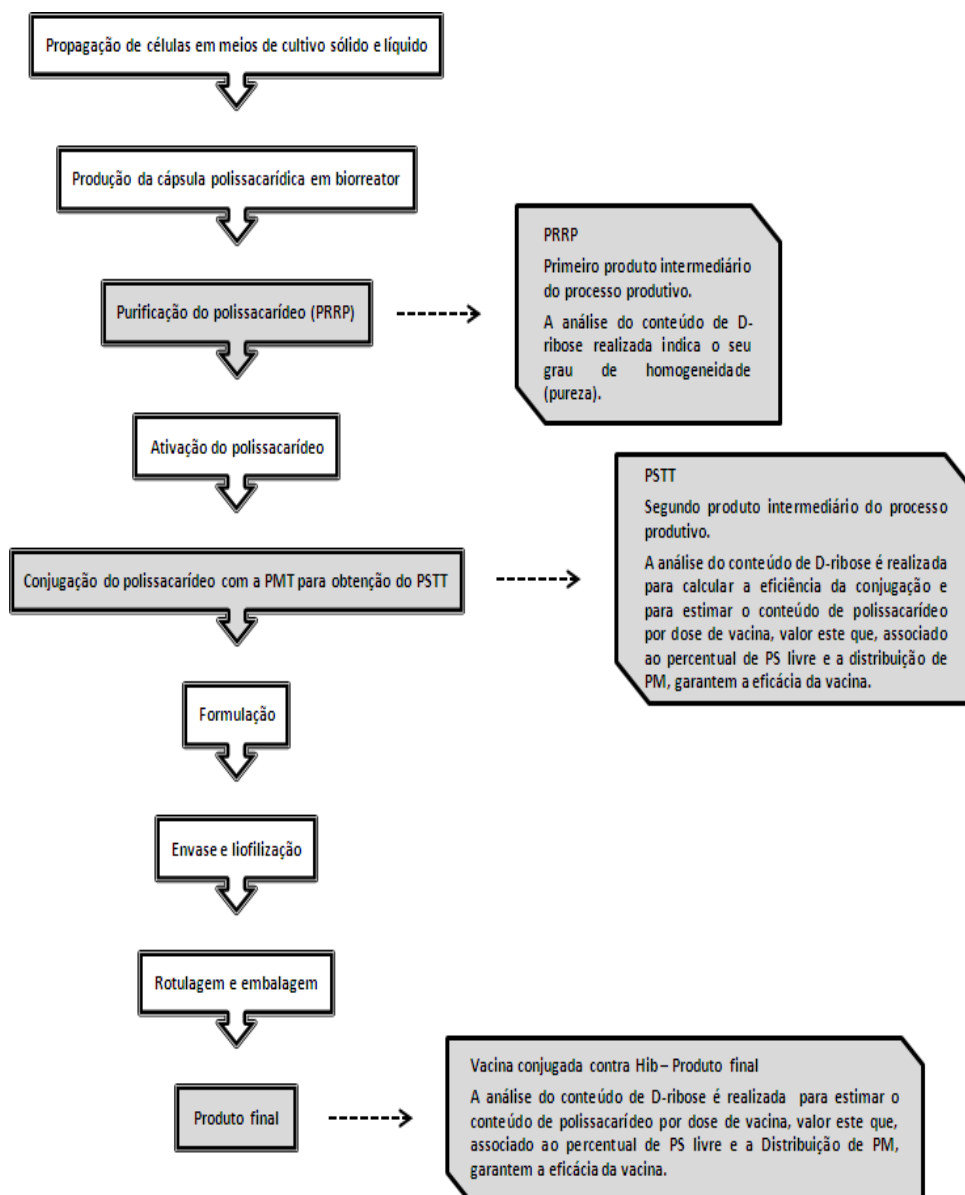


Figura 4 – Fluxograma de produção da Vacina contra Hib (Rodrigues 2009).

4.8. A importância vacina Hib e sua vacinação

As vacinas conjugadas aplicadas mundialmente modificou radicalmente o estudo das causas de muitas doenças infantis. O *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um dos patógenos mais importantes que constitui a causa de doenças infecciosas invasivas, especialmente nos 2 primeiros anos de vida. Nos países em

desenvolvimento, o *H. Influenzae* chega a causar 30% dos casos de pneumonia com cultura positiva e de 20 a 60% dos casos de meningite bacteriana (Bouskela et al. 2000). Devido ao elevado custo para a produção da vacina Hib começou a ser produzida no Brasil, para que esta possa ser introduzida no programa de vacinação dos países menos desenvolvidos. (Bio-Manguinhos 2007, Gadelha 2003).

O primeiro acordo formal de transferência de tecnologia da vacina conjugada contra Hib no país foi realizado entre a empresa Belga GlaxoSmithKline (GSK) e o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), responsável pela produção industrial de Imunobiológicos. Na época da negociação a tecnologia era considerada de ponta e apenas dois laboratórios no mundo produziam essa vacina. A transferência de tecnologia foi concluída em 2005, com a produção nacional de todo ciclo da vacina, trazendo diversas vantagens, sendo a principal: a não necessidade de importar o imunizante e um produto totalmente nacionalizado. Outras vantagens também devem ser consideradas, como: formação de pessoal técnico altamente especializado, fortalecimento dos laboratórios de controle de qualidade e todas as atividades envolvidas no apoio operacional e administrativo (Bio-Manguinhos 2009).

Atualmente, a Hib é produzida combinada com a vacina DTP (Difteria, Tétano e Coqueluche) - fornecida pelo Instituto Butantan. O Programa Nacional de Imunizações recomenda a administração de três doses, sendo com dois, quatro e seis meses de vida, caso não possa ser cumprido completa-lo até os 12 meses. A vacina é contraindicada para maiores de sete anos de idade (Alonso 2005, Bio-Manguinhos 2009, Ribeiro 2007).

Segundo a OMS vacina é qualquer preparo que induza a imunidade a alguma doença, ativando a memória imunológica e estimulando a produção de anticorpos. As vacinas são capazes de imunizar os indivíduos contra doenças causadas por microrganismos, através da inativação ou atenuação de suas culturas, a fim de eliminar sua ação patogênica e conservar sua propriedade de induzir uma resposta imunológica contra o agente agressor (Nature 2011).

A vacinação sensibiliza o sistema imunológico, prevenindo o surgimento de doenças causadas por patógenos específicos. O processo imunológico pelo qual se desenvolve a proteção conferida pelas vacinas compreende o conjunto de mecanismos através dos quais o organismo humano reconhece uma substância como exógena, para, em seguida, metabolizá-la, neutralizá-la e/ou eliminá-la. Este procedimento permite ao sistema imunológico de um indivíduo imunizado reagir rápida e eficazmente quando exposto à doença prevenindo, assim, a infecção (Martins 2011).

No campo de erradicação, controle e prevenção de doenças infecciosas as vacinas são os agentes disponíveis mais efetivos. No caso das doenças promovidas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b a vacinação se tornou a melhor forma de prevenção, já que começaram a surgir linhagens resistentes aos agentes antimicrobianos e os antibióticos utilizados na época se tornaram ineficientes (Lorthiois 2007, Martins 2011).

Antes do desenvolvimento da vacina, a bactéria Hib podia ser isolada em cerca de 0,5% a 3,0% das crianças saudáveis, inclusive dentre aquelas que não apresentam quadro clínico característico da doença. Com a implementação de programas de vacinação abrangentes e a aplicação do esquema completo de imunização, vários países praticamente eliminaram doenças como, por exemplo, a meningite e a pneumonia (Lorthiois 2007).

4.9. Controle de qualidade

O controle de qualidade compreende as técnicas e as atividades operacionais usadas para satisfazer as necessidades da qualidade (Bareta 1994).

O controle de qualidade é exigido em todas as indústrias para verificação da conformidade com os padrões estabelecidos e está intimamente ligado aos fatores econômicos. Qualquer falha no processo produtivo pode traduzir-se em risco para o paciente, podendo evoluir desde a ineficácia à toxicidade ou, eventualmente, à morte (Gomes 2006). Em preparações caseiras não são cumpridas ou seguidas técnicas e atividades que compreendem o controle de qualidade. Como tais produtos são

livremente comercializados, seu consumo pode apresentar riscos, por não garantir sua eficácia e pela possibilidade de causar algum efeito adverso.

Entende-se por “qualidade” o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. A partir do estabelecimento dos parâmetros de qualidade para a matéria-prima, e considerando-se um planejamento adequado e um controle de processo de produção, a qualidade do produto final estará, em grande parte assegurada.

Realizar um controle rigoroso em todas as etapas do processo de produção garante reprodutibilidade da eficácia, segurança, qualidade de suas formas farmacêuticas e adequações aos padrões Farmacopéicos, assim como a uniformidade dos diferentes lotes.

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas o controle de qualidade evoluiu significativamente. Inicialmente restrito à matéria prima e/ou produto acabado. O controle de qualidade era estático. Nas últimas décadas assume um maior dinamismo passando a controlar as diversas etapas da produção, caracterizando-se mais como um processo preventivo, que visa monitorar as diversas etapas de produção, para que se alcance um produto final com a devida qualidade (Gomes 2006).

4.10. Material de Referência (MR)

Segundo o ISO GUIA 30:2000, e o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM:2005), **material de referência** é um material ou substância que possui um ou mais valores de propriedade que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

Materiais de referência são uma importante ferramenta na determinação de muitos aspectos da qualidade de medição e são usados para fins de validação de métodos, calibração, estimativa da incerteza de medição, treinamento e para fins de

CQ - Controle de Qualidade interno e GQ - Garantia da Qualidade externa (ensaios de proficiência)(Inmetro 2010).

Materiais de referência “*in-house*”, freqüentemente referenciados como material referência de trabalho, material de verificação, padrão de controle de qualidade ou padrão de trabalho secundário, são produzidos no próprio laboratório e requeridos para uso no dia a dia de acordo com o “Guideline for the *in-house* production of reference materials” (LGC/VAM/1998/40). Dessa forma, deve-se considerar as necessidades do usuário e as limitações existentes quanto à manutenção das características dos testes envolvidos do material, para a elaboração e produção do material de referência.

De acordo com o Inmetro, os ISO GUIAS (International Organization for Standardization) reconhecem duas classes de materiais: Material de Referência Certificado e Material de Referência.

4.11. Material de Referência Certificado (MRC)

O Material de Referência certificado é descrito como sendo um material de referência, acompanhado por certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual valores de propriedades são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido (ISSO GUIA 30:200).

De acordo com o ISO GUIA 33:2002, para a adequação do uso do Material de Referência Certificado, os seguintes critérios devem ser aplicados:

- Sob condições reais de armazenamento, transporte e utilização, os valores de propriedade devem ser estáveis por um período de tempo aceitável;
- Devem ser suficientemente homogêneo, ou seja, dentro dos limites aceitáveis de incerteza os valores medidos em uma porção do lote devem ser aplicados a qualquer outra;

- Seus valores estabelecidos devem estar disponíveis em uma documentação, de modo que inclua um certificado de acordo com o ISO GUIA 31:2000;

Quando um material de referência é estabelecido depois da realização de um estudo colaborativo internacionalmente, e estabelece como finalidade unificar todas as terminologias e a transmissão de unidade de medida, este é chamado de Material de referência Internacional.

4.12. ISO Guias

A produção de material de referência (referência e certificado) é guiada pelos ISO guias da série 30 a 35.

- **ISO GUIA 30 – Termos e definições relacionados com materiais de referência** – Este Guia recomenda os termos e os significados que devem ser associados a eles quando relacionados com materiais de referência, com atenção particular aos termos que são usados nos certificados e nos relatórios de certificação correspondentes.
- **ISO GUIA 31 – Material de referência: conteúdos certificados e rótulos** – Este Guia ressalta que o certificado deve comunicar as informações sobre o material de referência do produtor ao usuário, isto é, deve conter uma declaração dos valores de propriedade certificadas, seus significados e limites de confiança. Além disso, deve descrever a natureza geral e uso do MR e assegurar a sua integridade ao usuário.
- **ISO GUIA 33 – Utilizações de materiais de referência certificados** – Este Guia mostra a importância dos materiais de referência certificados na metrologia, desta maneira assegurando a rastreabilidade das medidas, dando-lhes a devida atenção em relação à matriz e aos parâmetros ensaiados.

- **O ISO GUIA 34 – General requirements for the competence of reference material producers** – Este Guia trata os requisitos gerais para a competência dos produtores de materiais de referência, fazendo referência ao sistema da qualidade que deve estar implantado no laboratório que pretende produzi-lo. Todas as etapas que devem ser cumpridas por um produtor de material de referência estão descritas neste documento.
- **O ISO GUIDE 35 – Reference materials: General and statistical principles for certification** – Este Guia descreve as etapas para a produção do material de referência, desde o planejamento (envolvendo as questões relacionadas com a possibilidade de produção), a preparação da amostra, estudo de homogeneidade, estudos de estabilidade (podem ser de longo e curto tempo). Além disso, trata da caracterização e do cálculo de estimativa de incerteza associado a estes parâmetros.

4.13. O Material de Referência no Brasil

O Inmetro é um instrumento de Estado que tem um papel central na formulação, coordenação e execução das ações relacionadas a todos os aspectos dos processos metrológicos. Uma das metas é intensificar a produção de materiais de referência certificados (CBM 2008).

Diversos eventos foram organizados sobre material de referência e ensaios de proficiência entre usuários, produtores e organizadores de ensaios de proficiência e órgãos acreditadores buscando melhorias e integração. O principal ponto discutido até hoje, é a respeito da obtenção de padrões e matérias de referência que atendam as necessidades dos usuários. Alguns dos principais problemas foram são: custo (padrões caros), tempo de importação, transporte (armazenamento adequado) e falta de informações técnicas (determinação da incerteza).

É importante levar em consideração algumas relevâncias técnicas e econômicas para o desenvolvimento do Material de Referência Certificado, como a

rastreabilidade do produto, sendo o estudo de homogeneidade de vital importância para a sua variabilidade.

A acreditação de produtores de materiais de referência, realizado pelo Inmetro, é de natureza voluntária, sendo concedida para qualquer produtor de materiais de referência, independente ou vinculado a outra organização, de entidade governamental ou privada, nacional ou estrangeiro, independente do seu porte ou área de atuação.

Atualmente no Brasil, existe um esforço para acreditar produtores de material de referência para atender as necessidades dos laboratórios. Alguns laboratórios já foram acreditados, como:

- Centro Tecnológico de Polímeros (Senai/CETEPO);
- Centro de Tecnologia Mineral – CETEM;
- Visomes Comercial Metrológica Ltda;
- Laboratório de Referências Metrológicas (LRM/IPT).

4.14. Caracterização, estudos de homogeneidade e estabilidade

De acordo com os guias ISO 30-35, os materiais de referências são caracterizados com relação à homogeneidade e estabilidade. Para o Controle de Qualidade Interno (CQI) a homogeneidade e estabilidade adequadas são consideradas critérios essenciais (Inmetro, 2005).

A **caracterização** de um material de referência é o processo de determinação de seus valores de propriedade como parte da certificação do processo. Na certificação do lote produzido, esta se refere a valores próprios do lote (ISO GUIDE 35:2003).

Homogeneidade é a condição de uniformidade de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades especificadas. Um material de referência é dito homogêneo com respeito a uma determinada propriedade, se o valor da propriedade, determinado por ensaios em amostras de tamanho determinado, se encontra dentro dos limites de incerteza especificados. As amostras podem ser

tomadas de embalagens diferentes (frascos, pacotes e etc.) ou de uma única embalagem (ISO GUIA 30:2000).

Estabilidade é a capacidade do material de referência de manter o valor de uma determinada propriedade dentro dos limites especificados por um período de tempo pré-estabelecido, quando estocado nas condições específicas (ISO GUIA 30:2000).

O ISO GUIDE 35 que orienta sobre a certificação de material de referência, estabelece dois tipos de estudo de estabilidade a serem considerados na certificação:

- Estabilidade de longa duração em tempo real – O estudo é realizado para verificar o comportamento do material, visando definir o prazo de validade, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. O acompanhamento em tempo real permite a utilização do material no período de avaliação da sua estabilidade. Para estas situações, a validade fica determinada “em andamento” e a verificação é feita de acordo com o planejamento do projeto para MR;

Estabilidade acelerada – Estudo projetado para acelerar a degradação do material, avaliando o impacto de curtas exposições a condições fora das estabelecidas para o armazenamento do produto, que eventualmente possam ocorrer durante o transporte ou dano no equipamento de estocagem do material (freezer ou geladeira).

4.15. Estimativa da incerteza de medição

O conceito de incerteza como atributo quantificável é relativamente novo na história das medições, mesmo que os conceitos de erro e análise de erro seja uma parte prática da metrologia. Agora reconhece que mesmo quando todas as causas conhecidas e suspeitas de erro tenham sido avaliadas e as correções necessárias implementadas, ainda existem incertezas do resultado expressado, colocando em dúvida o resultado de medição. Sendo assim, é necessária à inclusão da incerteza de medição para que a expressão torne-se completa (ABNT Inmetro 2003).

Segundo o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, a incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição e é caracterizada como a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (Inmetro, 2008). A incerteza de medição é definida matematicamente como um intervalo de confiança, onde o desvio-padrão utilizado e o desvio combinado de todas as fontes de incerteza do mensurando.

Para se estimar a incerteza combinada padrão (incerteza global) deve-se levar em consideração a contribuição de todas as componentes de incerteza padrão (fontes de incerteza) durante o processo de medição. Para se obter a incerteza expandida, multiplica-se a incerteza padrão combinada por um fator de abrangência, que garante um intervalo de confiança dentro do qual acredita-se estar o valor verdadeiro do mensurando. Geralmente usa-se o valor do fator de abrangência igual a dois, para um nível de confiança de aproximadamente 95%, e uma distribuição normal de probabilidade (EURACHEM 1999).

Os componentes da incerteza podem ser classificados em dois tipos: Tipo A e Tipo B. Além disto, as distribuições podem ser classificadas em uniforme, retangular, triangular, normal, etc. Logo, a incerteza padrão combinada pode ser estimada a partir das fontes de incerteza.

- **Componente do tipo A (IQM,2009)** – a avaliação é realizada através de análise estatística de uma série de observações da grandeza medida (condição de repetitividade). Assim obtendo o valor de repetitividade ou aleatoriedade de um processo de medição em um dado momento.
- **Componente do tipo B (Stavale, 2005)** – é quando assume que cada grandeza de entrada tem uma distribuição e um intervalo, e pode ser estimado pelos seguintes fatores:
 - Incerteza dos certificados de calibrações ou padrões – As incertezas obtidas dos certificados dos padrões utilizados devem ter distribuição normal, com fator de abrangência e nível de confiança de aproximadamente 95%.

Pelo ISO GUM as incertezas devem estar na mesma probabilidade (68%) para proceder à expansão, através do fator de abrangência, para atingir o nível de confiança de 95%. Os componentes de possuam certificados com valores de incerteza declarados como balanças, balões volumétricos, micropipetas, espectrofotômetro entre outros utilizados neste projeto, devem ter a incerteza determinada desta forma.

- Distribuição retangular – Quando é possível assumir limites superiores ou inferiores do erro (efeito sistemático) de uma grandeza de influência sobre um mensurando, deve-se assumir que a sua distribuição é do tipo retangular. Utiliza-se este tipo de distribuição para resolução de balança e outros equipamentos analíticos.

- Distribuição triangular – refere-se a equipamentos analógicos, ou para algumas vidrarias, por exemplo, a bureta tem a tendência a um valor central e probabilidade dos valores próximos aos limites (IQM,2009).

4.16. Fontes de incerteza

De acordo com a EURACHEM, a incerteza do resultado pode provir de muitas fontes possíveis tais como efeitos de matriz, condições ambientais, pureza dos reagentes, incerteza das massas e equipamentos volumétricos, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição.

Para determinação da incerteza do material de referência, as incertezas relacionadas ao método estão incluídas no componente de caracterização.

Alguns exemplos de fontes de incerteza fornecidos pelos guias da Eurachem e ISO GUM, seguem abaixo:

- Menisco do balão volumétrico;
- Curva analítica;
- Instrumento de pesagem;
- Condições ambientais de umidade relativa, pressão, temperatura;
- Resolução do equipamento;

4.17. Rastreabilidade e confiabilidade

A busca pela melhoria dos métodos analíticos é constante. Garantir a confiabilidade de uma medição através do treinamento de analistas, validação dos métodos, uso de padrões, calibração/qualificação de equipamentos, procedimentos de controle e garantia da qualidade definidos, são exigidos cada vez mais para empresas com política de qualidade regulamentada por órgãos de controle. De acordo com o Inmetro (2010) os principais tópicos que devem ser considerados para garantir uma medição com confiabilidade/rastreabilidade representados na figura abaixo:

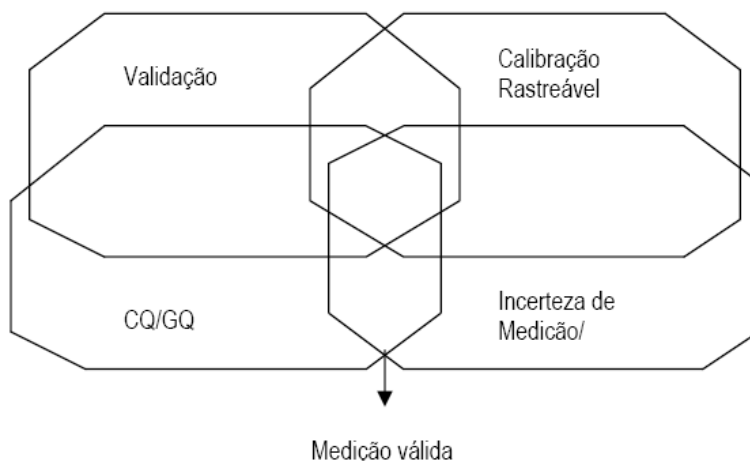


Figura 5 - Sobreposições de funções associadas com rastreabilidade de medição e qualidade analítica (Inmetro 2010).

Todos os tópicos acima fazem parte do sistema da qualidade de Biomanguinhos. De acordo com o VIM:2000, a rastreabilidade é a propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão que está relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia continua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas.

5. METODOLOGIA

O PSTT é avaliado por métodos preconizados pela Farmacopéia Européia e recomendações da produção e controle da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000). Posteriormente, o PSTT candidato a Material de referência foi denominado de 02/2010 MR.

5.1. Planejamento técnico do material de Referência

O esquema abaixo apresenta o planejamento de todos os itens necessários para do material de referência, demonstrando a seqüência das etapas de preparo.

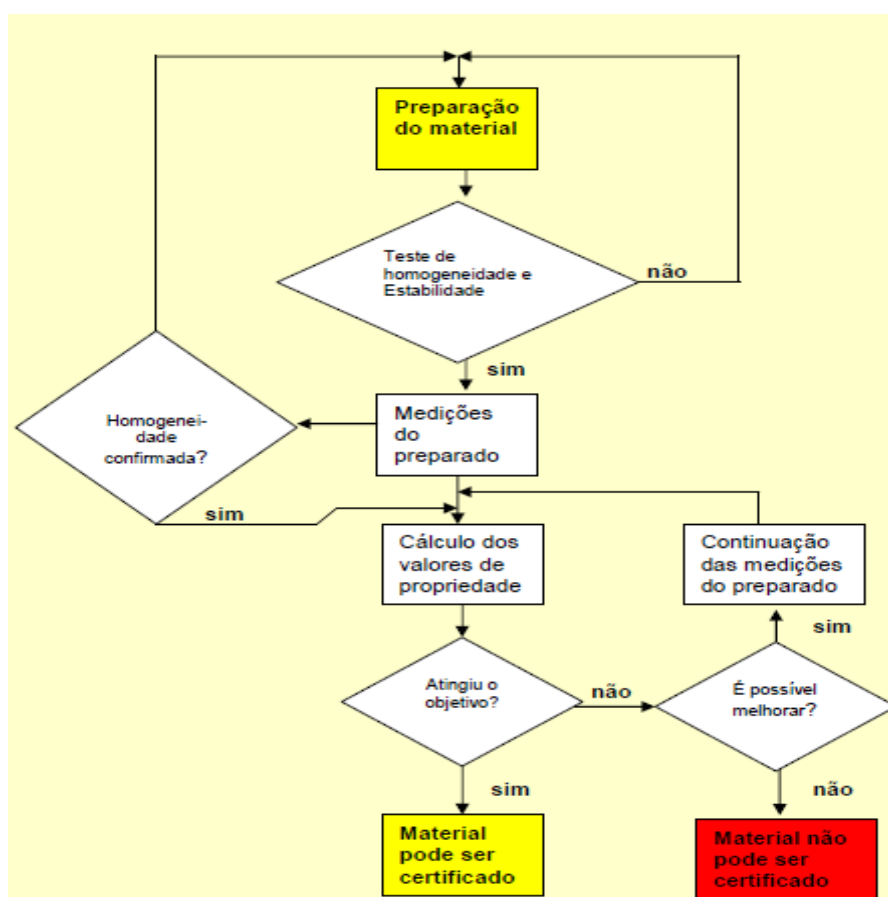


Figura 6 – Esquema experimental do preparo do material de referência (ISO GUIDE 35:2003).

5.2. Preparo do candidato o material de referência

O candidato a material de referência, PSTT02/2010 foi preparado de duas formas, como descrito abaixo:

1. Diluição: o PSTT02/2010 foi diluído 20 vezes, com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 100mL para um balão volumétrico de 2,0L.
2. Pesagem: foi pesado cerca de 100,0g do PSTT02/2010 em uma balança de precisão, em seguida transferido para um balão volumétrico de 2,0L. com outra fração da amostra (PSTT02/2010) foi feita a densidade no densímetro automático (Density Meter – Anton Paar) e feito a correção da diluição nas curvas de análise.

Foram realizados dois preparos diferentes da amostra, para definir posteriormente qual deles seria o mais indicado a ser utilizado, uma vez que o candidato a material de referência tem uma viscosidade elevada. Dessa forma garantindo que os resultados obtidos estejam dentro das curvas das análises realizadas (Proteína e D'ribose).

5.3. Envase

De acordo com orientações contidas no documento “Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and other Biological Reference Standards-WHO 2004”, o envase deverá ser realizado em uma sala limpa ou em cabina de fluxo laminar equipada com filtro HEPA (High Efficiency Particulate Arresting) para evitar qualquer forma de contaminação. Neste caso o envase foi realizado em uma cabine de fluxo laminar.

O volume de envase neste projeto será feito de acordo com o volume gasto em cada método analítico. No método de determinação do conteúdo de proteína será de 0,8mL, já na determinação do conteúdo de D'ribose será de 1,4mL, volume necessário para fazer 3 medições (alíquotas). Totalizando cerca de 1200 frascos para a análise de proteína e 672 frascos para a análise de D'ribose. Os frascos utilizados são

tubos criogênico estéreis com tampa de rosca, fundo cônico e base sustentada com volume de 2,0 mL.

5.4. Metodologias analíticas

Todas as metodologias analíticas utilizadas para a elaboração do material de referência devem seguir os procedimentos padronizados (POP ou IT). As metodologias utilizadas no controle de qualidade, eleitos neste projeto para utilização do PSTT como material de referência são:

- Método colorimétrico de determinação do conteúdo de D-ribose - Método de Bial (Ashwell 1957, Kabat 1961) – Neste método o grau de pureza do polissacarídeo pode ser estimada pela medição da concentração de D-ribose, que é determinado pela reação de Bial para pentose, usando D-ribose como um padrão.
- Método colorimétrico de determinação do conteúdo de proteína – Método de Lowry – O princípio do método de Lowry baseia-se no acoplamento do método do Biureto a uma redução do ácido fosfotungstíco fosfomolibdítico (Reagente de Folin-Ciocalteu) pela tirosina presente nas moléculas protéicas. Assim, à solução de proteína adiciona-se sulfato de cobre (CuSO_4) em meio alcalino e alguns minutos depois se adiciona o reagente de Ciocalteu. A coloração desenvolvida é muito mais intensa tornando este o método 100 vezes mais sensível.

Estes métodos foram escolhidos, pois são dois parâmetros que oferecem dados sobre o grau de homogeneidade.

Abaixo segue o Quadro 1 com as especificações para os produtos intermediários (PRRP e PSTT) e para a vacina Hib, considerando-se cada método empregado.

Quadro 1 – Correlação entre ensaios físico-químicos de produtos e intermediários da vacina Hib.

	Conteúdo de D’Ribose	Especificação	Conteúdo de Proteína	Especificação	Situação
PRP	Realizado	$\geq 32\%$	Realizado	$\leq 1\%$	Método validado e equipamentos qualificado
PSTT	Realizado	A quantificar	Realizado	A quantificar	
Vacina Hib	Realizado	10 a 15 mg/dose	Não	---	

5.4.1. Determinação de D’ribose (Orcinol)

5.4.1.1. Preparo dos reagentes

▪ Reagente de orcinol

Solução A: 375 mg de orcinol monohidratado dissolvidos em 5 mL de etanol a 99%.

Solução B: 50 mg de cloreto férrico hexahidratado dissolvidos em 100 mL de ácido clorídrico concentrado.

No momento do uso, misturar as duas soluções na proporção 1:20 (1 parte da solução A + 20 partes da solução B).

5.4.1.2. Soluções padrão

▪ Solução estoque de D-ribose

25 mg de padrão de referência de D-ribose devem ser dissolvidos em 100 mL de água milli-Q, de forma a obter uma solução estoque de concentração igual a 0,25 mg/mL.

Pipetar 5,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 50,00 mL e completar o volume até o traço de aferição com água milli-Q.

Distribuir alíquotas de 3,0 mL em pequenos frascos e estocá-los a -20°C durante um ano, no máximo.

5.4.1.3. Curva analítica

Preparar quatro soluções padrão de acordo com o seguinte procedimento de diluição:

Quantidade de D-ribose no tubo da amostra (em μg)	Volume de estoque de ribose ($25 \mu\text{g/mL}$)	Volume de água deionizada a ser adicionada no tubo
branco 0	0 μL	400 μL
2,5	100 μL	300 μL
5,0	200 μL	200 μL
7,5	300 μL	100 μL
10,0	400 μL	-

Tabela 1 – Curva analítica de D-Ribose na Determinação de Conteúdo de Polissacarídeo.

5.4.1.4. Execução do método

Pipetar 400 μL das amostras nos tubos de ensaio em triplicata.

Adicionar 800 μL do reagente de orcinol ao conteúdo de cada tubo e agitar.

Colocar os tubos contendo o branco e as amostras em banho termostático a 100°C , por 20 minutos.

Remover os tubos do banho-maria e deixar esfriar até temperatura ambiente.

Transferir os conteúdos dos tubos para uma cubeta de quartzo e faça as leituras na absorbância de 669 nm (Vis).

Fazer a curva analítica e calcular o conteúdo de ribose nas amostras.

5.4.2. Determinação de proteína (método Lowry)

5.4.2.1. Preparo dos Reagentes

▪ Reagente A: Solução de Na_2CO_3 a 2% em NaOH 0,1 N

Preparo da solução de NaOH 0,1N: Pesar 4,0 g de NaOH P.A., dissolver em água purificada e transferir para um balão volumétrico de 1000 mL completando o volume com água purificada até a marcação.

Preparo de A: Pesar 20g de Na_2CO_3 e dissolver em solução de NaOH 0,1 N. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com solução de NaOH 0,1 N até a marcação.

▪ **Reagentes B1 e B2: Solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 1% e Solução de tartarato de sódio e potássio a 2%**

B1: Pesar 1,0g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dissolver em água purificada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar com água purificada até a marcação.

B2: Pesar 2,0g de tartarato de sódio e potássio, dissolver em água purificada, transferir para um balão volumétrico de 100 mL e completar com água purificada até a marcação.

▪ **Reagente C: Solução alcalina de sulfato de cobre**

Pipetar 0,5 mL de B2 e 0,5 mL de B1 e transferir para um balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume com o reagente A, até a marcação. Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

▪ **Reagente D**

Diluir o reagente de fenol Folin-Ciocalteu em água destilada na proporção 1:1. Calcular e preparar a quantidade suficiente para o número de amostras no momento do uso.

5.4.2.2. Preparo da solução padrão BSA 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$

No caso do uso de padrão BSA da marca Pierce: Pipetar 2,5mL de BSA (3 ampolas) e avolumar com água purificada para um balão volumétrico de 25mL (10x).

5.4.2.3. Curva analítica

Pipetar para tubos de ensaio os seguintes volumes de solução padrão de BSA 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e água milli-Q, para construção da curva analítica, conforme a tabela:

Concentração BSA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume de BSA estoque (μL)	Volume de água milli-Q (μL)
10	10	190
25	25	175
50	50	150
100	100	100
150	150	50
200	200	---

Tabela 2 – Curva analítica de BSA na Determinação de Proteína de Lowry.

5.4.2.4. Execução do método

Preparar as amostras e as referências com alíquotas de 200 µL em triplicata.

Preparar o ensaio em branco em duplicata com 200 µL de água destilada.

Adicionar ao branco, padrões e amostras 1 mL do Reagente C.

Homogeneizar e esperar 10 min.

Adicionar 100µL de Reagente D.

Homogeneizar imediatamente e esperar 30 min.

Ler as amostras na absorbância de 750 nm (VIS).

Traçar a curva analítica, concentração de BSA (µg/mL) x leituras de absorbância, com os resultados obtidos nas diversas diluições e calcular, através da mesma, a concentração de proteína na amostra.

5.5. Caracterização, homogeneidade e estabilidade

A **Caracterização** será realizada da forma nominal, ou seja, será determinado pelos métodos colorimétricos de conteúdos de D-ribose (Método de Orcinol) e de proteína (método de Lowry) serão realizados. Ambos são necessários para determinar a incerteza associada à caracterização. Para a determinação da caracterização, foram retiradas 21 alíquotas da solução de PSTT do balão volumétrico antes do processo de envase. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições, no mesmo dia, com um único analista e no mesmo equipamento.

Os ensaios de homogeneidade e estabilidade são os dois principais critérios para estabelecer o material de referência (Inmetro 2005). Sendo necessário estabelecer as quantidades de amostras utilizadas no estudo, como também a temperatura e o tempo adequado para o material que deverá ser avaliado.

O estudo de **homogeneidade** do material investigado é utilizado para garantir a manutenção das propriedades físico-químicas e demonstrar que são suficientemente homogêneas em uma amostragem representativa de frascos (unidades). Para assegurar esta qualidade, cada frasco deve ser avaliado e a incerteza

da homogeneidade deve ser incluída na estimativa da incerteza de medição do valor de propriedade do material estudado.

Para testar a homogeneidade nos frascos e entre frascos, 15 frascos serão retirados aleatoriamente do lote envasado, utilizando-se a função de números aleatórios feita pelo Excel para esta seleção. Os frascos serão enumerados de 1 a 15 e os ensaios (conteúdo de D-ribose e de proteína), serão realizados em 3 leituras para cada frasco.

O estudo de **estabilidade** será utilizado para determinar o prazo de validade e condições de armazenagem ideais e verificar a estabilidade do material.

Neste caso recomenda-se que produtos com validade estimada de 1 ano ou menos deverão ser ensaiados mensalmente para os primeiros 3 meses e posteriormente em intervalos de 3 meses. Sendo assim, conforme orientação do guia do ICH (International Conference on Harmonisation), esta etapa do estudo de estabilidade será realizada mensalmente por 6 meses e posteriormente por 3 meses. Para garantir os resultados foram retirados frascos do início, meio e fim do envase.

5.6. Estudo de estabilidade a longo prazo

O estudo de estabilidade será realizado para determinar o prazo de validade e condições de armazenamento ideais. Para o planejamento do estudo de estabilidade do candidato a material de referência, além das normas ISO 30 a 35 sobre material de referência, será utilizada, também, o guia do ICH (International Conference on Harmonisation) sobre testes de estabilidade para produtos biológicos (ICH, 1995). Esta norma ressalta que produtos biológicos têm datas de validade que diferem de acordo com a sua origem. O planejamento do estudo deve considerar a expectativa relacionada ao produto, ou seja, ao seu histórico. Como diretriz, o ICH recomenda que:

- Produtos com validade estimada de 1 ano ou menos deverão ser ensaiados mensalmente para os primeiros 3 meses e posteriormente em intervalos de 3 meses.

- Produtos com propostas de validade de mais de 1 ano, devem ter seus estudos realizados a cada 3 meses durante o primeiro ano de armazenamento, a cada 6 meses durante o segundo ano e anualmente.

Como citado anteriormente, o PSTT possui validade estimada de 05 anos, estocado a 2 – 8°C. Com base nesta informação, o candidato a material de referência será avaliado mensalmente, por um período de 6 meses. A tabela abaixo apresenta os parâmetros e os tempos (T (mês)) em que as amostras serão analisadas.

Tabela 3 - Planejamento para estudo de estabilidade (mês)

Testes	T0 Mês 0	T1 Mês 1	T2 Mês 2	T3 Mês 3	T4 Mês 4	T5 Mês 5	T6 Mês 6	T9 Mês 9	T12 Mês 12	T18 Mês 18	T24 Mês 24	T36 Mês 36	T48 Mês 48	T60 Mês 60
D-ribose														
Proteína														

O estudo de estabilidade será acompanhado por 5 anos ou até a verificação de degradação do material. Neste projeto serão relatados e avaliados somente os resultados obtidos durante os 6 primeiros meses devido à limitação de tempo.

5.7. A análise de tendência

A análise de tendência é a principal forma de avaliar a estabilidade do candidato à material de referência de acordo com o ISO GUIDE 35. Primeiramente é necessário verificar qualquer tendência para avaliar os dados que possam ser observados.

O cálculo da sensibilidade é realizado da seguinte forma:

$$b1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}}) * (y_i - y_{\text{média}})}{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}})^2}$$

Onde: $y_{\text{média}}$ = média dos resultados;
 $x_{\text{média}}$ = média do tempo.

O intercepto é calculado da seguinte forma:

$$b_0 = y_{\text{média}} - b_1 x_{\text{média}}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n - 2}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}})^2}}$$

$s(b_1)$ é o desvio ou incerteza associada à sensibilidade (slope).

A avaliação da sensibilidade deve ser feita da seguinte forma:

$$|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$$

Onde: o valor de *t-Student* (t) para $n-2$ graus de liberdade e $P=0,95$ (95% nível de confiança).

Se a condição da expressão acima for obedecida, a sensibilidade é insignificante. Como consequência, não há instabilidade observada.

5.8. Teste de Grubbs (G)

Os resultados obtidos na caracterização, que estiverem fora dos limites de atenção apresentado na carta controle (gráfico de dispersão), deverá ser realizado o teste de Grubbs para verificar a existência dos valores aberrante. Neste teste, rejeitam-se os valores em relação a estimativa do desvio-padrão (Leite 1998).

Para aplicação deste teste os valores deverão obedecer aos seguintes passos:

- Colocar os valores em ordem crescente;
- Determinar a média e o desvio-padrão;
- Testar o maior ou menor valor do conjunto, segundo as equações abaixo:

$$G = \frac{(x_{\text{maior}} - x_{\text{Média}})}{s} \quad \text{ou} \quad G = \frac{(x_{\text{Menor}} - x_{\text{Média}})}{s}$$

O valor tabelado de Grubbs com 95% de confiança deve ser comparado com o resultado encontrado no teste de Grubbs (G), caso o valor encontrado seja maior que o tabelado, este deverá ser rejeitado.

5.9. Procedimento para determinação da incerteza do MRC

A determinação da incerteza do material de referência certificado deverá ser feita conforme a ISSO Guide 35, como os ítems abaixo:

- Expressar o valor de propriedade a ser certificada e todas as contribuições nas quais o valor de propriedade depende matematicamente;
- Determinar o valor de todas as contribuições, com base na análise estatística da série de dados ou por outros meios;
- Utilizar as incertezas padrão do tipo A e as principais do tipo B;
- Calcular o valor de característica a ser certificado;
- Determinar a incerteza padrão combinada do valor de propriedade a partir das incertezas padrões e as covariâncias associadas com as contribuições;

Após a verificação dos componentes de incerteza, a incerteza combinada padrão do MRC pode ser expressa por:

$$U_{MRC} = k \sqrt{(u_{\text{caracterização}}^2 + u_{\text{homogeneidade}}^2 + u_{\text{estabilidade}}^2)}$$

onde:

k= fator de abrangência para um nível de confiança de 95%.

Para cálculo da incerteza combinada padrão, realizou-se a avaliação de cada um dos componentes acima.

- **Cálculo do componente de incerteza da Caracterização:** Para cálculo do componente de incerteza de caracterização, inclui as variáveis relacionadas ao processo de medição, como a pipetagem ou pesagem na preparação da amostra, leitura, pipetagem, entre outros. Portanto utilizou os valores de repetitividade (incerteza tipo A) e as incertezas relacionadas à medição (tipo B).

- **Cálculo do componente de incerteza de Homogeneidade:** a determinação do componente de incerteza deve ser determinado através da análise de variância.

Para o cálculo, há duas possibilidades:

Quando a média quadrática entre frascos for maior que a média quadrática dentro do frasco, utiliza-se:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{\frac{(M_{\text{Quadráticaentre frascos}} - M_{\text{Quadrática dentro dos frascos}})}{n}}$$

Quando a média quadrática entre frascos for menor que a média quadrática dentro do frasco.

Neste caso utiliza-se a expressão:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{\frac{M_{\text{Dentro das frascos}}}{n} * \frac{2}{(n-1)}}$$

onde n=replicata

- **Componente de incerteza da estabilidade:** a determinação deste componente, utiliza o desvio padrão da sensibilidade, denominado em $s(b_1)$ e o tempo utilizado.

$$u_{\text{estabilidade}} = s(b_1)(\text{desvio padrão calculado em análise de tendência}) \times \text{tempo}$$

5.10. A avaliação dos resultados

A partir do uso de ferramentas estatísticas adequadas será feita a avaliação para os resultados obtidos durante o estudo e a estimativa de incerteza de medição do material preparado. Onde são essenciais para definir o seu potencial como material de referência.

Como referência para cada parâmetro estudado, de modo a disponibilizar uma análise crítica dos resultados obtidos, será utilizado o ISO GUIDE 35. Assim, de acordo com a ISO GUIA 31 o material de referência será acompanhado de um documento para assegurar sua validade e rastreabilidade.

Caso o material candidato seja adequado para uso como material de referência, ele poderá ser utilizado nos ensaios de rotina do Controle de Qualidade do LAFIQ, no laboratório de controle de processos do DEBAC e pelo INCQS que realiza controle de vacinas para liberação pela ANVISA.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos experimentalmente nas análises de Determinação de D-Ribose (Orcinol) e Determinação de Proteína (Lowry), descritas na metodologia são expostas e discutidas a seguir. Nesta etapa, discutem-se as principais ferramentas estatísticas utilizadas para cada processo de elaboração do material de referência.

6.1. Caracterização e comparação das metodologias

Devido à elevada viscosidade do candidato a material de referência foram realizados dois preparos diferentes (pipetando e pesando). Assim, o cálculo estatístico da precisão foi realizado com os dois preparos para que a partir deste, definir com qual deles o estudo será mantido.

Os dados serão avaliados através do coeficiente de variação relativo (CV), com o gráfico da carta controle e pela análise de variância (ANOVA), para poder definir estatisticamente qual é o preparo mais indicado. Caso as metodologias sejam estatisticamente equivalentes, utiliza-se para caracterização os valores da metodologia padronizada no laboratório.

6.1.1. Carta controle

Para visualizar a dispersão dos resultados, foi confeccionada uma carta controle de acordo com a norma ISO 5725-6.

Conforme mostrado na metodologia à aplicação do teste de Grubbs, será realizado para verificar a existência dos valores aberrantes obtidos na caracterização, a partir da análise dos gráficos apresentados a seguir.

6.1.1.1. Determinação de D'ribose

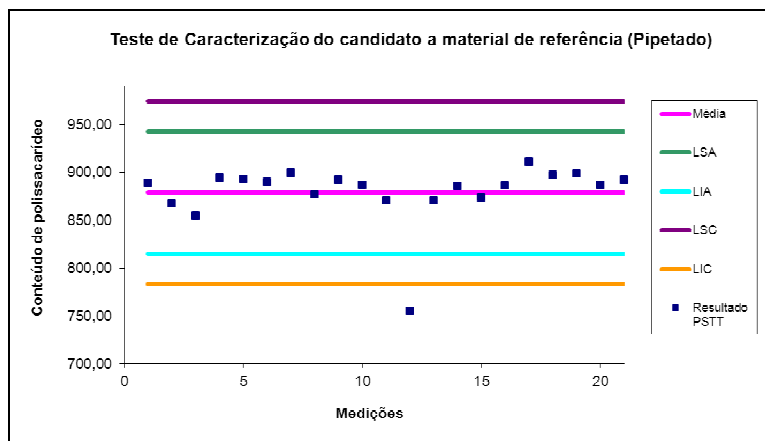


Gráfico 1 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de D'ribose no PSTT (pipetado).

Neste gráfico apenas um ponto está fora dos limites de atenção, sendo este resultado o menor entre os demais, definido como amplitude inferior do conjunto de dados. Para avaliar se este resultado é aberrante, foi realizado o teste de Grubbs como mostrado abaixo:

Média	879,37
Desvio Padrão	31,23
$G_{(menor)}$	3,97
$G_{(tabelado) n=21}$	2,58

De acordo com os resultados apresentados acima, este valor é considerado aberrante. Logo, deve-se ser rejeitado.

Desta forma, um novo o gráfico da dispersão dos resultados foi realizado de modo a retirar o valor aberrante. Conforme gráfico abaixo:

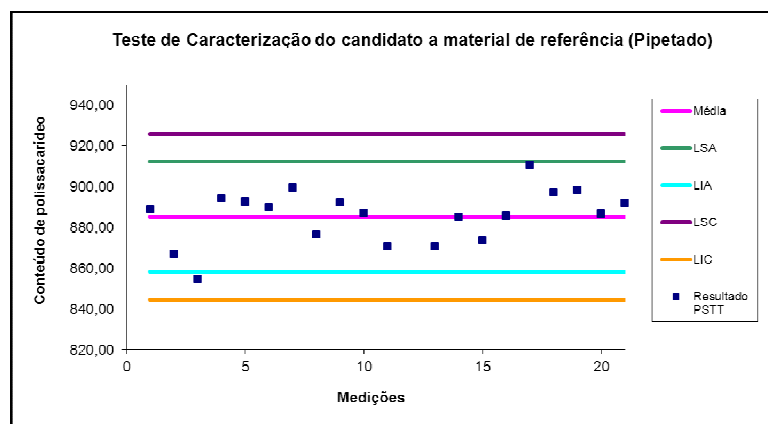


Gráfico 2 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de D'ribose no PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs;

Porém, com os novos resultados apresentados outro ponto encontrou-se dentro dos limites de atenção. Tendo a necessidade de realizar novamente o teste de Grubbs, onde se obteve os seguintes resultados:

Média	885,57
Desvio Padrão	13,28
$G_{(menor)}$	2,34
$G_{(tabelado)} n=20$	2,56

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor suspeito não é considerado aberrante. Logo, permanecendo nos cálculos.

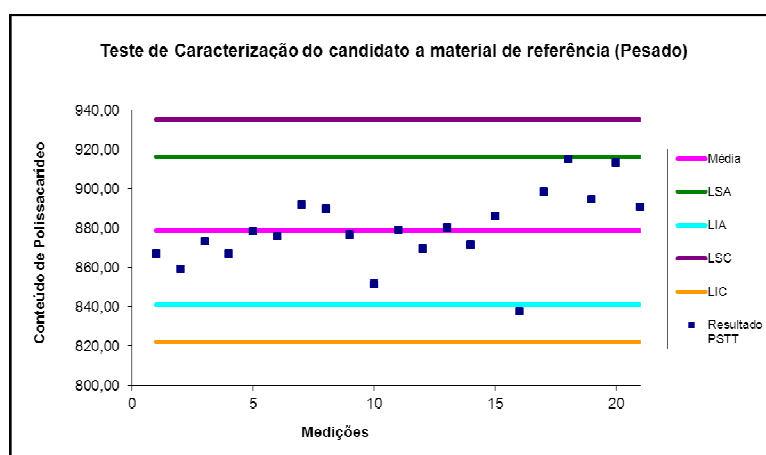


Gráfico 3 – Carta controle dos resultados obtidos de D'ribose no PSTT (pesado)..

Neste gráfico apenas um ponto encontra-se dentro dos limites de atenção, sendo este resultado o menor entre os demais, definido como amplitude inferior do conjunto de dados. Para avaliar se este resultado é aberrante, foi realizado o teste de Grubbs como mostrado abaixo:

Média	879,34
Desvio Padrão	18,53
$G_{(menor)}$	2,25
$G_{(tabelado)} n=21$	2,58

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor suspeito não é considerado aberrante. Logo, permanecendo nos cálculos.

6.1.1.2. Determinação de Proteína

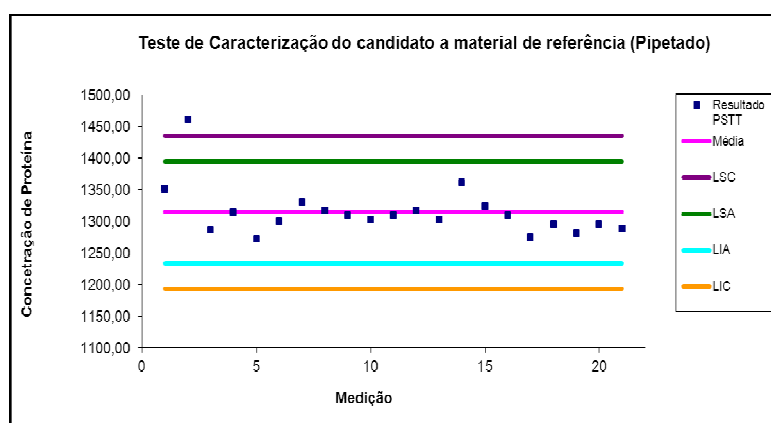


Gráfico 4 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no PSTT (pipetado).

Neste gráfico apenas um ponto está fora dos limites de atenção, sendo este resultado o maior entre os demais, definido como amplitude superior do conjunto de dados. Para avaliar se este resultado é aberrante, foi realizado o teste de Grubbs, como mostra abaixo:

Média	1314,54
Desvio Padrão	40,32
$G_{(maior)}$	3,63
$G_{(tabelado)} n=21$	2,58

De acordo com os resultados apresentados acima, este valor é considerado aberrante. Logo, deve-se ser rejeitado.

Desta forma, um novo o gráfico da dispersão dos resultados foi realizado de modo a retirar o valor aberrante. Conforme gráfico abaixo:

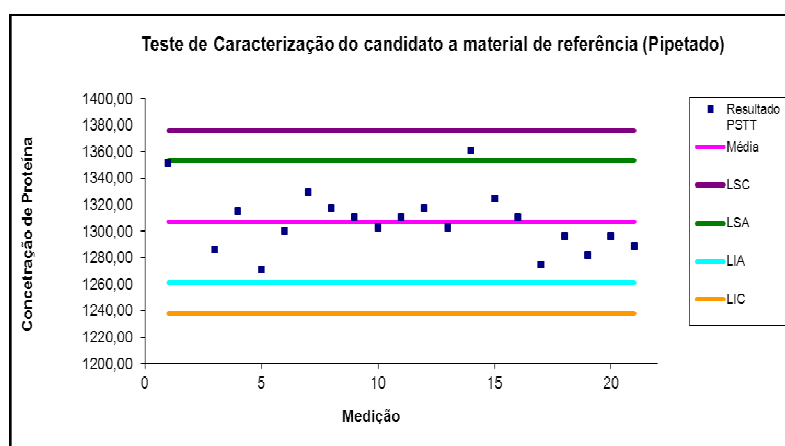


Gráfico 5 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de Proteína no PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs.

Porém, com os novos resultados apresentados outro ponto encontrou-se dentro dos limites de atenção. Tendo a necessidade de realizar novamente o teste de Grubbs, onde se obteve os seguintes resultados:

Média	1307,23
Desvio Padrão	23,03
$G_{(maior)}$	2,33
$G_{(tabelado) n=20}$	2,56

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor suspeito não é considerado aberrante. Logo, permanecendo nos cálculos.

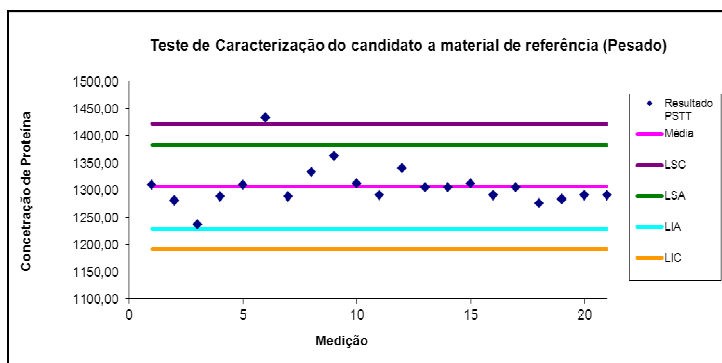


Gráfico 6 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no PSTT (pesado).

Neste gráfico apenas um ponto está fora dos limites de atenção, sendo este resultado o maior entre os demais, definido como amplitude superior do conjunto de dados. Para avaliar se este resultado é aberrante, foi realizado o teste de Grubbs, como mostra abaixo:

Média	1307,08
Desvio Padrão	38,63
$G_{(maior)}$	3,27
$G_{(tabelado)} n=21$	2,58

De acordo com os resultados apresentados acima, este valor é considerado aberrante. Logo, deve-se ser rejeitado.

Desta forma, um novo o gráfico da dispersão dos resultados foi realizado de modo a retirar o valor aberrante. Conforme gráfico abaixo:

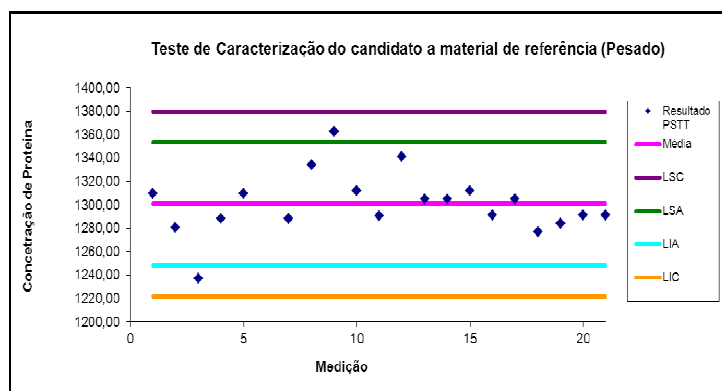


Gráfico 7 – Carta controle dos resultados obtidos da Determinação de Proteína no PSTT (pesado), após o teste de Grubbs;

Porém, com os novos resultados apresentados outro ponto encontrou-se dentro dos limites de atenção. Tendo a necessidade de realizar novamente o teste de Grubbs, onde se obteve os seguintes resultados:

Média	1300,77
Desvio Padrão	26,26
$G_{(menor)}$	2,42
$G_{(tabelado) n=21}$	2,56

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor suspeito não é considerado aberrante. Logo, permanecendo nos cálculos.

6.1.2. Resultados do coeficiente de variação

A tabela abaixo mostra os resultados de coeficiente de variação obtidos após a realização do teste de Grubbs.

Resultados Obtidos - Pipetado						
Lote: 103HPST007B						
n° de repetições	Concentração de Proteína (ug/mL)			Conteúdo de polissacarídeo (ug/mL)		
	1° Dia	2° Dia	3° Dia	1° Dia	2° Dia	3° Dia
1	1271,08	1302,72	1274,47	888,90	876,49	873,47
2	1285,66	1302,72	1281,61	866,83	892,07	885,81
3	1300,25	1309,99	1288,75	854,47	886,88	910,50
4	1314,84	1309,99	1295,89	894,20	870,44	897,27
5	1314,84	1317,25	1295,89	892,43		898,16
6	1329,42	1317,25	1310,17	889,78	870,44	886,69
7	1351,31		1324,46	899,49	885,15	891,98
Média	1309,63	1309,99	1295,89	883,73	880,25	891,98
Desvio Padrão	26,87	6,50	17,00	16,53	9,10	11,68
Coeficiente de variação	2,05	0,50	1,31	1,87	1,03	1,31
Média	1304,93			885,57		
Desvio Padrão	9,41			13,28		
Coeficiente de variação	1,49			1,50		

Tabela 4 – Resultados obtidos da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT (pipetado), após o teste de Grubbs.

Resultados Obtidos - Pesado						
Lote: 103HPST007B						
n° de repetições	Concentração de Proteína (ug/mL)			Conteúdo de polissacarídeo (ug/mL)		
	1° Dia	2° Dia	3° Dia	1° Dia	2° Dia	3° Dia
1	1309,83	1333,94	1312,30	867,05	889,54	885,95
2	1280,77	1362,89	1290,96	859,13	876,60	837,65
3	1237,17	1312,24	1305,19	873,20	851,61	898,25
4	1288,03	1290,53	1276,73	867,05	879,19	914,94
5	1309,83	1341,18	1283,85	878,48	869,71	894,74
6		1305,00	1290,96	875,84	880,05	913,18
7	1288,03	1305,00	1290,96	891,67	871,43	890,79
Média	1285,61	1321,54	1292,99	873,20	874,02	890,79
Desvio Padrão	26,66	25,31	12,12	10,41	11,82	25,83
Coefficiente de variação	2,07	1,92	0,94	1,19	1,35	2,90
Média	1300,77			879,34		
Desvio Padrão	26,26			18,53		
Coefficiente de variação	2,02			2,11		

Tabela 5 – Resultados obtidos da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT (pesado), após o teste de Grubbs.

De acordo com a resolução da ANVISA n°899, o coeficiente de variação para a repetibilidade deve ser menor que 5%, ou seja, todos os resultados obtidos encontram-se dentro dos critérios estabelecidos.

Portanto, a partir da avaliação dos resultados apresentados nas tabelas acima, pode-se concluir que estatisticamente, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos neste parâmetro, confirmando que os lotes são uniformes entre si.

Como os dois preparos obtiveram resultados dentro dos parâmetros estabelecidos, a escolha para dar o andamento do estudo foi feita a partir da forma de preparo. Logo, sendo escolhido o preparo pipetado pelos seguintes critério:

- Método do modo de preparo anteriormente utilizado (os métodos utilizados no laboratório são aceitáveis, onde o preparo era feito a partir da diluição da amostra – pipetagem);
- Modo de preparo com a utilização do menor números de instrumentos que possam aumentar a sua incerteza. No caso do preparo pesado utilizou instrumentos como balança e densímetro, além daqueles utilizados no preparo do pipetado;
- A partir dos gráficos da carta controle, pode-se observar que a distribuição dos resultados é mais homogênea;
- Devido ao teste estatístico de Grubbs, pois nas duas análises (D´ribose e Proteína) houve a necessidade de retirar um valor aberrante. O que não ocorreu no preparo pesado, já que neste somente a análise de proteína apresentou um valor aberrante. Sendo assim optou-se por aquele que passou pelos mesmos tratamentos estatísticos;
- A partir dos resultados de coeficiente de variação, pois este modo de preparo apresentou o menor coeficiente para ambos os testes (D´ribose e P.roteína).

6.2. Homogeneidade

A homogeneidade irá ser avaliada entre frascos e para cada frasco, de modo a comparar as médias pertencentes a diferentes frascos, como também em cada frasco, utilizando como ferramentas: o gráfico de carta controle, coeficiente de variação e a análise de variância (ANOVA). Pois será necessário demonstrar que as unidades do lote são suficientemente homogêneas entre elas.

6.2.1. Carta controle

Conforme mostrado na metodologia à aplicação do teste de Grubbs, será realizado para verificar a existência dos valores aberrantes obtidos na homogeneidade, a partir da análise dos gráficos apresentados a seguir.

6.2.1.1. Determinação de D´ribose

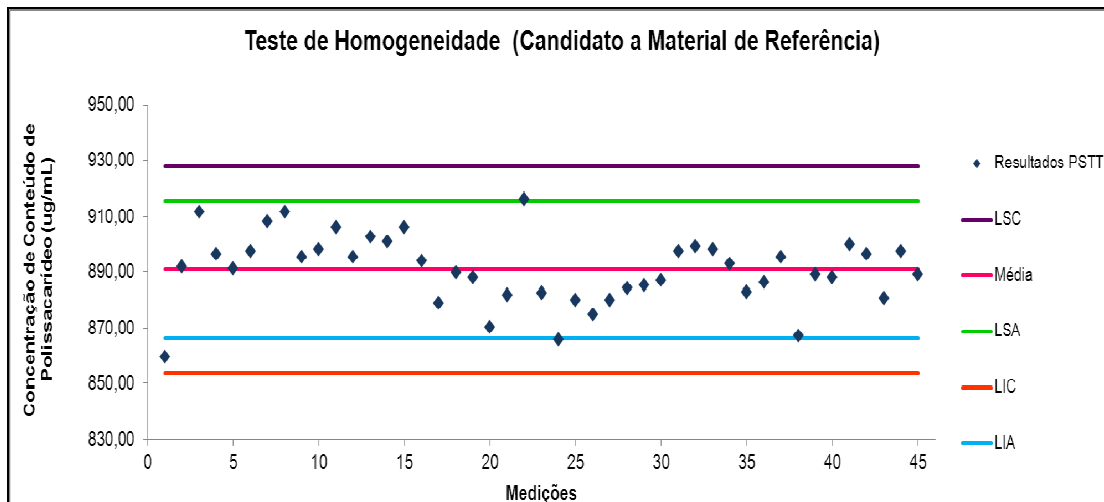


Gráfico 8 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no teste de homogeneidade do PSTT;

Este gráfico apresentou resultados fora dos limites de atenção, para avaliar se estes resultados são aberrantes, foi realizado o teste de Grubbs como mostrado abaixo:

Média	890,88
Desvio Padrão	12,35
$G_{(maior)}$	2,04
$G_{(menor)}$	2,54
$G_{(tabelado) n=45}$	2,92

De acordo com os resultados apresentados acima, tanto o valor encontrado para o $G_{(maior)}$ e $G_{(menor)}$ não são considerados aberrantes. Logo, permanecendo nos cálculos.

6.2.1.2. Determinação de Proteína

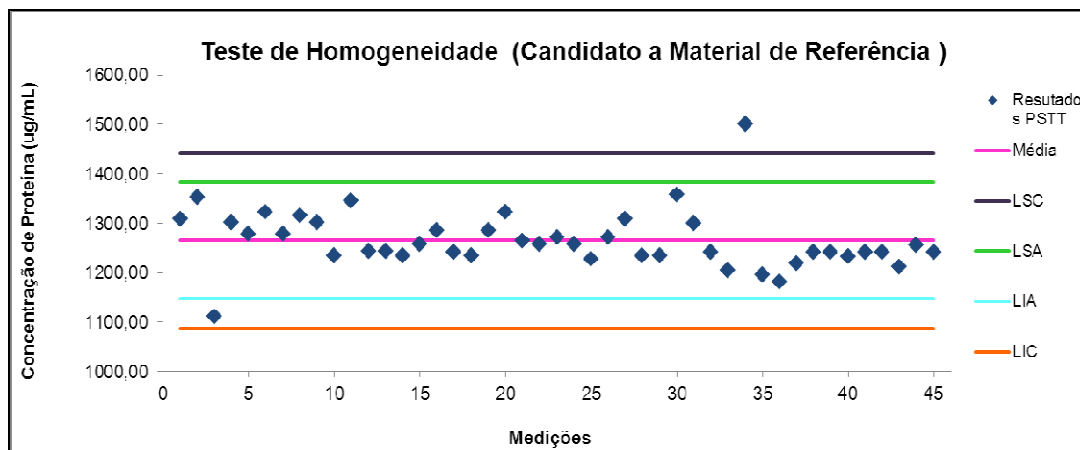


Gráfico 9 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no teste de homogeneidade do PSTT.

Este gráfico apresentou dois resultados fora dos limites de atenção, sendo um de amplitude superior e outro de amplitude inferior, para serem avaliados se estes resultados são aberrante, foi realizado o teste de Grubbs como mostrado abaixo:

Média	1265,31
Desvio Padrão	59,03
$G_{(maior)}$	4,00
$G_{(menor)}$	2,62
$G_{(tabelado) n=45}$	2,92

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor da amplitude superior é considerado aberrante. Logo, este ser deve rejeitado.

Desta forma, um novo o gráfico da dispersão dos resultados foi realizado de modo a retirar o valor aberrante. Conforme gráfico abaixo:

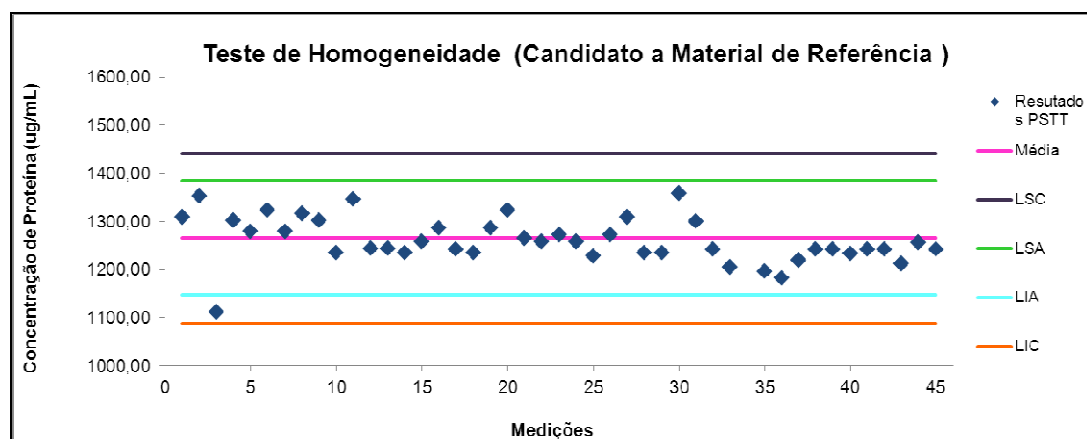


Gráfico 10 – Carta controle dos resultados obtidos de Proteína no teste de homogeneidade do PSTT, após o teste de Grubbs.

6.2.2. Resultados do coeficiente de variação

A tabela abaixo mostra os resultados de coeficiente de variação obtidos após a realização do teste de Grubbs.

Resultados obtidos - Homogeneidade						
n° de	Proteína			Conteúdo de polissacarídeo		
Repetições	1° dia	2° dia	3° dia	1° dia	2° dia	3° dia
1	1308,71	1352,75		859,53	891,86	911,62
2	1301,38	1279,36	1323,39	896,36	890,97	897,25
3	1279,36	1316,05	1301,38	908,03	911,62	895,46
4	1235,32	1345,41	1242,66	898,15	906,24	895,46
5	1242,66	1235,32	1257,34	902,64	900,85	906,24
6	1285,95	1242,41	1235,15	894,03	879,05	889,63
7	1285,95	1322,23	1264,18	887,86	870,23	881,69
8	1256,92	1271,44	1256,92	916,07	882,57	865,82
9	1227,90	1271,44	1307,72	879,93	874,64	879,93
10	1235,15	1235,15	1358,52	884,34	885,22	886,98
11	1300,60	1241,11	1203,93	897,24	899,06	898,15
12	1110,55	1196,49	1181,62	892,69	882,67	886,31
13	1218,80	1241,11	1241,11	895,42	867,19	889,04
14	1233,67	1241,11	1241,11	888,13	899,97	896,33
15	1211,37	1255,98	1241,11	880,85	897,24	889,04

Média	1248,95	1269,82	1261,15	892,08	889,29	891,26
Desvio Padrão	48,50	43,79	45,52	12,82	12,85	10,66
Coefficiente de variação	3,88	3,45	3,61	1,44	1,45	1,20
Média	1259,98			890,88		
Desvio Padrão	2,38			1,26		
Coefficiente de variação	0,19			0,14		

Tabela 6 – Resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de Proteína e do Conteúdo de polissacarídeo no PSTT;

De acordo com a resolução da ANVISA nº899, o coeficiente de variação para a repetibilidade deve ser menor que 5%, ou seja, todos os resultados obtidos encontram-se dentro dos critérios estabelecidos. Portanto, os resultados encontram-se homogêneos entre si.

6.2.3. Análise da variância

A partir da análise de variância (ANOVA) será realizada a comparação das médias pertencentes entre os frascos e para cada frasco.

6.2.3.1. Determinação de D´ribose

RESUMO					
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	
1	3	2663,02	887,67	691,59	
2	3	2684,58	894,86	11,56	
3	3	2715,11	905,04	72,06	
4	3	2699,84	899,95	31,46	
5	3	2709,72	903,24	7,53	
6	3	2662,71	887,57	59,33	
7	3	2639,79	879,93	80,05	
8	3	2664,47	888,16	654,65	
9	3	2634,50	878,17	9,33	

10	3	2656,54	885,51	1,81
11	3	2694,45	898,15	0,83
12	3	2661,67	887,22	25,70
13	3	2651,65	883,88	219,16
14	3	2684,43	894,81	36,76
15	3	2667,13	889,04	67,16

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2773,02	14	198,07	1,51	0,17	2,04
Dentro dos grupos	3937,96	30	131,27			
Total	6710,98	44				

Tabela 7 – Anova dos resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de D´ribose.

6.2.3.2. Determinação de Proteína

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
1	3	3772,02	1257,34	16645,11
2	3	3904,13	1301,38	484,81
3	3	3896,79	1298,93	341,16
4	3	3823,39	1274,46	3788,69
5	3	3735,32	1245,11	125,69
6	3	3763,51	1254,50	754,78
7	3	3872,36	1290,79	860,10
8	3	3785,28	1261,76	70,21
9	3	3807,05	1269,02	1597,33
10	3	3828,82	1276,27	5072,85
11	3	3745,64	1248,55	2377,77
12	2	2378,11	1189,06	110,59
13	3	3701,02	1233,67	165,89
14	3	3715,90	1238,63	18,43
15	3	3708,46	1236,15	516,11

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	30592,29	14	2185,16	0,96	0,51	2,05
Dentro dos grupos	65748,50	29	2267,19			
Total	96340,80	43				

Tabela 8 – Anova dos resultados obtidos no teste de homogeneidade da Determinação de Proteína.

Realizou-se o teste ANOVA para verificar a homogeneidade das variâncias. Esta análise é usada para testar a importância de cada parâmetro existente ao modelo proposto.

Com base nos resultados calculados observou-se que:

- $F_{\text{Calculado}} < F_{\text{Crítico}}$;
- Valor-P > 0,05;

Dessa forma, pode-se ser considerar o material homogêneo com 95% de significância, pois não há diferença significativa entre os resultados entre os frascos e dentro dos frascos. Logo, o lote produzido atende aos requisitos.

6.3. Estabilidade

Na análise de estabilidade para a determinação de D-ribose e Proteína somente serão utilizados os seguintes resultados:

- T₀ apresenta as médias dos resultados obtidos na caracterização;
- T₂, T₃, T₄, T₅ e T₆ - são os resultados obtidos do segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto mês de estabilidade.

6.3.1. Carta controle

Conforme mostrado na metodologia à aplicação do teste de Grubbs, será realizado para verificar a existência dos valores aberrantes obtidos na estabilidade, a partir da análise dos gráficos apresentados a seguir.

6.3.1.1. Determinação de D´ribose

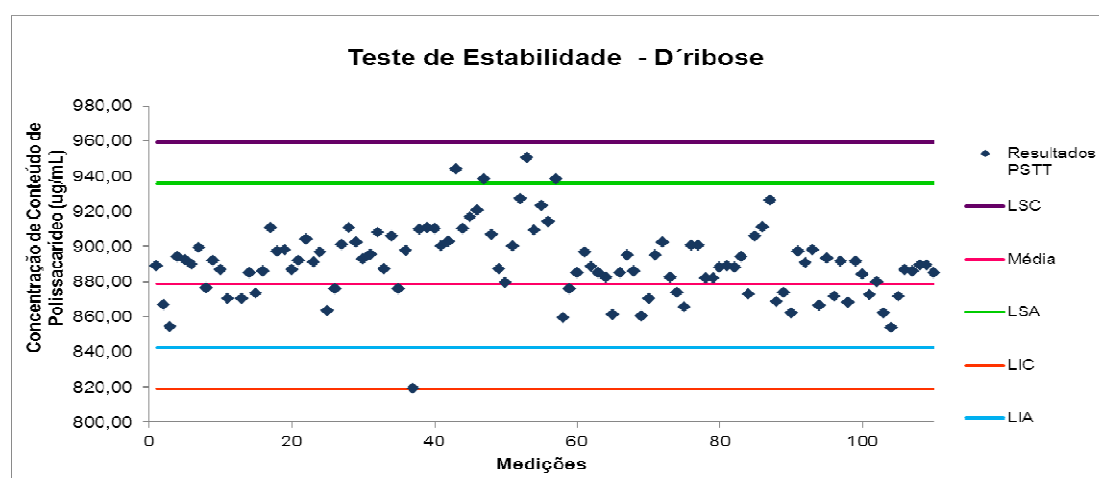


Gráfico 11 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;

Foi realizado o teste de Grubbs para a determinação de D´ribose, considerando os resultados para o T_0 os obtidos na caracterização, sem o valor aberrante.

De acordo com a carta controle alguns valores apresentados encontram-se entre o limite de atenção, obtendo os seguintes resultados para o teste de Grubbs:

Média	891,59
Desvio Padrão	20,68
G (maior)	2,84
G (menor)	3,02
G (tabelado) - n=90	3,18

De acordo com os resultados apresentados acima, nenhum dos valores obtidos (amplitude superior e inferior) são considerados aberrantes. Logo, esses resultados devem permanecer nos cálculos.

6.3.1.2. Determinação de Proteína

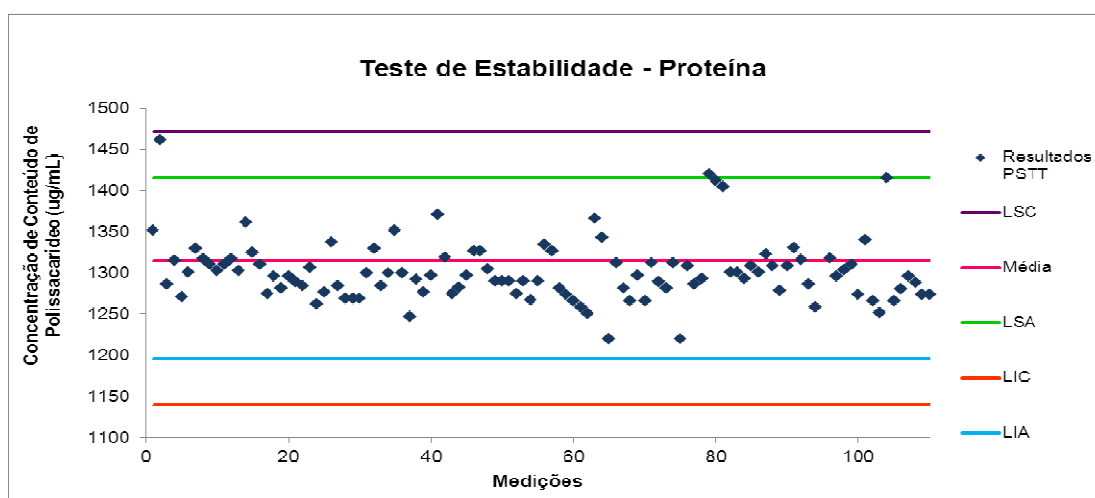


Gráfico 12 – Carta controle dos resultados obtidos de D-ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;

Foi realizado o teste de Grubbs para a determinação de Proteína, considerando os resultados para o T_0 os obtidos na caracterização, sem o valor aberrante.

De acordo com a carta controle alguns valores apresentados encontram-se entre o limite de atenção, obtendo os seguintes resultados para o teste de Grubbs

Média	1303,10
Desvio Padrão	58,22
$G_{(maior)}$	7,28
$G_{(menor)}$	1,43
$G_{(tabelado)} - n=90$	3,18

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor da amplitude superior é considerado aberrante. Logo, este ser deve rejeitado.

Desta forma, um novo o gráfico da dispersão dos resultados foi realizado de modo a retirar o valor aberrante. Conforme gráfico abaixo:

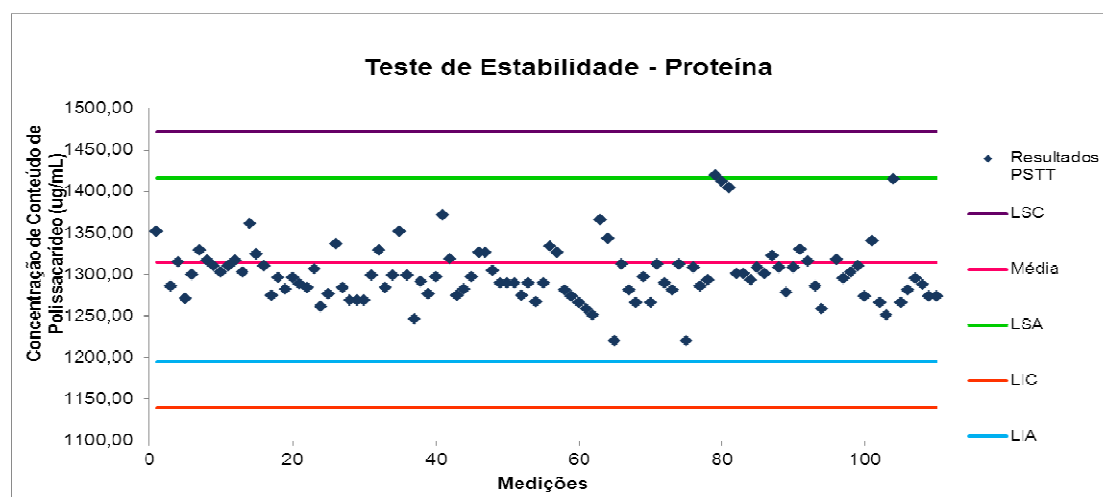


Gráfico 13 – Carta controle dos resultados obtidos de D´ribose no estudo de estabilidade do PSTT, após o teste de Grubbs;

Porém, com os novos resultados apresentados outro ponto encontrou-se dentro dos limites de atenção. Tendo a necessidade de realizar novamente o teste de Grubbs, onde se obteve os seguintes resultados:

Média	1298,34
Desvio Padrão	36,94
$G_{(maior)}$	2,00
$G_{(tabelado)} - n=89$	3,18

De acordo com os resultados apresentados acima, o valor da amplitude superior não é considerado aberrante. Logo, permanecendo nos cálculo.

6.3.2. Resultados do coeficiente de variação

As tabelas abaixo mostram os resultados de desvio padrão e de coeficiente de variação obtido necessário para a avaliação da estabilidade.

Tabela 9 – Resultados de D´ribose no estudo de estabilidade (2 - 8°C).

Resultados obtidos D´ribose- estabilidade (2 -8°C)						
repetições	1º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
1	854,47	819,18	910,29	859,31	900,50	871,48
2	866,83	863,52	879,54	860,22	862,29	872,67
3	870,44	875,79	887,00	861,14	868,51	879,78
4	870,44	875,79	900,04	865,72	872,96	883,33
5		887,11	900,04	870,31	873,85	884,22
6	873,47	890,88	902,84	873,97	881,84	885,10
7	876,49	892,77	906,57	875,80	881,84	897,24
8	885,15	895,60	909,36	882,22	888,06	886,88
9	885,81	896,54	910,29	882,22	888,06	889,54
10	886,69	897,48	914,02	884,97	888,95	889,54
11	886,88	901,26	916,82	884,97	890,73	891,35
12	888,90	902,20	920,54	884,97	894,28	891,32
13	889,78	904,09	923,34	885,89	896,95	895,42
14	891,98	905,97	927,07	888,64	897,84	900,85
15	892,07	907,86	938,25	895,05	900,50	902,64
16	892,43	909,75	938,25	895,05	905,84	906,24
17	894,20	910,69	943,84	896,89	911,17	908,03
18	897,27	910,69	950,36	902,39	926,28	911,62
19	898,16	---	---	---	---	---
20	899,49	---	---	---	---	---
21	910,50	---	---	---	---	---
Média	885,57	891,51	915,47	880,54	890,58	891,51
Desvio Padrão	12,95	22,39	19,09	13,18	15,87	11,47
Coefficiente de variação	1,46	2,51	2,09	1,50	1,78	1,29
Média	893,92					
Desvio Padrão	4,42					
Coefficiente de variação	0,49					

Tabela 10 – Resultados de Proteína no estudo de estabilidade (2 - 8°C);

Resultados obtidos Proteína- estabilidade (2 -8°C)						
Repetições	1º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês	7º mês
1	1271,08	1246,58	1296,94	1281,46	1308,06	1258,42
2		1261,61		1219,82	1278,31	
3	1274,47	1269,12	1267,28	1219,82	1285,75	1250,99
4	1281,61	1269,12	1274,69	1250,64	1285,75	1265,86
5	1285,66	1269,12	1274,69	1258,35	1293,18	1265,86
6	1288,75	1276,64	1282,11	1266,05	1293,18	1273,30
7	1295,89	1276,64	1289,52	1266,05	1300,62	1273,30
8	1295,89	1284,16	1289,52	1266,05	1300,62	1273,30
9	1300,25	1284,16	1289,52	1273,76	1300,62	1280,73
10	1302,72	1284,16	1289,52	1281,46	1308,06	1288,17
11	1302,72	1291,67	1289,52	1281,46	1308,06	1288,17
12	1309,99	1299,19	1296,94	1289,17	1308,06	1295,61
13	1309,99	1299,19	1304,35	1296,87	1315,50	1295,61
14	1310,17	1299,19	1319,18	1312,28	1322,94	1303,04
15	1314,84	1306,70	1326,59	1312,28	1330,37	1310,48
16	1317,25	1329,25	1326,59	1312,28	1404,75	1317,92
17	1317,25	1336,77	1326,59	1343,11	1412,19	1340,23
18	1324,46	1351,80	1334,01	1366,22	1419,63	1414,60
19	1329,42	---	---	---	---	---
20	1351,31	---	---	---	---	---
21	1360,83	---	---	---	---	---
Média	1307,23	1290,84	1298,68	1283,18	1320,87	1293,86
Desvio Padrão	23,03	27,15	20,73	37,52	44,02	38,60
Coefficiente de variação	1,76	2,10	1,60	2,92	3,33	2,98
Média	1299,11					
Desvio Padrão	9,48					
Coefficiente de variação	0,73					

De acordo com a Resolução nº 899 da ANVISA, para precisão, onde a reprodutibilidade interna está inclusa, o valor máximo aceitável de CV(%) deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

Nas tabelas acima, os coeficientes de variação encontrados foram menores que 5%. Portanto isto é um indicativo que o material possui uma estabilidade ideal para a temperatura de armazenamento (2 - 8°C).

6.3.3. Análise de Tendência

Na análise de tendência irá ser avaliado a estabilidade do material. De acordo com as tabelas e os gráficos apresentados a seguir.

Tabela 11 – Resultados de D´ribose para a análise de tendência.

	x	y
n	TEMPO	PROTEINA
1	0	885,57
3	2	891,51
4	3	915,47
5	4	880,54
6	5	890,58
7	6	891,51
média	3,3333	892,53
desv. Padr	2,16	12,04
b0		892,11
b1		0,127

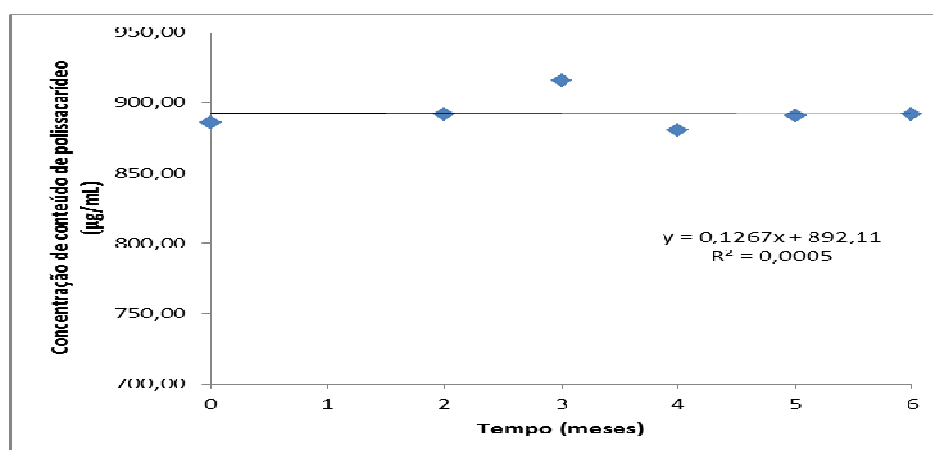
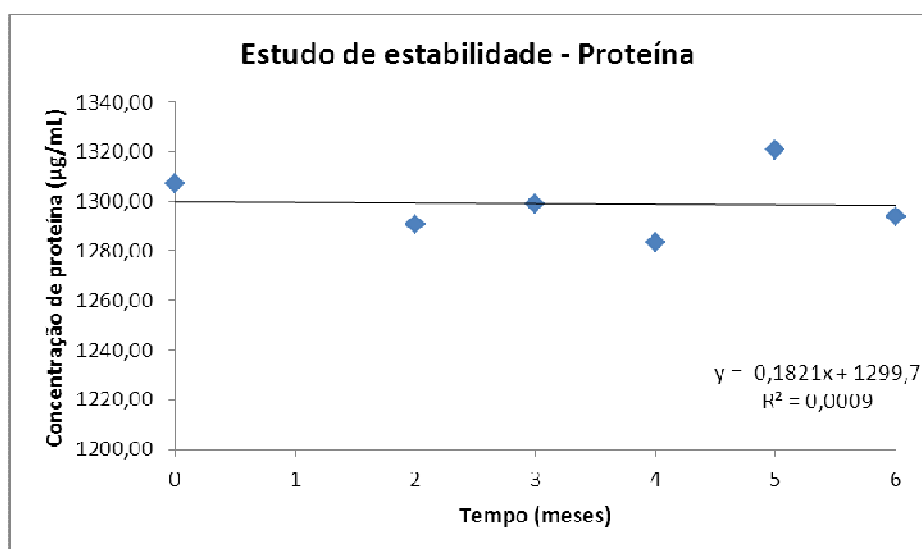


Gráfico 14 – Medidas dos resultados de D´ribose *versus* tempo (meses) – estudo de estabilidade (2 - 8°C);Tabela: resultados de proteína para a análise de tendência.

Tabela 12 – Resultados de proteína para a análise de tendência;

	x	y
n	TEMPO	PROTEINA
1	0	885,57
3	2	891,51
4	3	915,47
5	4	880,54
6	5	890,58
7	6	890,88
média	3,333	892,43
Desvio Padrão	2,16	12,05
b0		892,24
b1		0,054

Gráfico 15 – Medidas dos resultados de Proteína *versus* tempo (meses) – estudo de estabilidade (2 - 8°C);

Para a avaliação da sensibilidade foi aplicada a equação $|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ cuja o valor de *T-Student* (t) para n-2 (graus de liberdade) e P=0,95 (95% nível de confiança) é igual a 2,015. Onde:

- Para a determinação de D`ribose

$$\begin{array}{ccc} b_1 & < & t_{0,95,n-2} \cdot S(b_1) \\ 0,13 & & 1,35 \end{array}$$

- Para a determinação de proteína

$$\begin{array}{ccc} b_1 & < & t_{0,95,n-2} \cdot S(b_1) \\ 0,18 & & 1,21 \end{array}$$

Como a sensibilidade ou a inclinação foram insignificantes, ou seja as condições de expressão são obedecidas, não há instabilidade observada nos resultados dos estudos de conteúdo de D`ribose e proteína em tempo real, a 2 - 8°C, durante os setes meses de estudo.

6.4. Cálculos de incerteza do material de referência

6.4.1. Componente associada à caracterização

De acordo com a estimativa da incerteza de medição, os componentes para cálculo da incerteza associada à caracterização considerados na determinação deste componente de incerteza estão descritos abaixo.

6.4.1.1. Estimativa de Incerteza dos Resultados das medições de D`Ribose (Orcinol)

No quadro abaixo estão descritas as principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de D`ribose.

Quadro 2 – Principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de D-ribose.

Símbolo	Nome / Fonte de incerteza
u_{1A}	Incerteza devido à repetitividade das análises de caracterização = s/\sqrt{n} s = desvio padrão amostral entre 20 repetições em 3 dias: 7 no 1º, 6 no 2º e 7 no 3º; n = 20
u_{1B}	Incerteza do fator de correção de D-ribose para Polissacarídeo (2,488)
u_{2B}	Incerteza do espectrofotômetro (Absorbância medida) - Certificado
u_{3B}	Erro não corrigido do espectrofotômetro (Absorbância medida) - Certificado
u_{4B}	Dúvida na leitura do espectrofotômetro (absorbância) - Resolução
u_{5B}	Incerteza da micropipeta (alíquota de 0,4 mL para o tubo reacional) - Certificado
u_{6B}	Erro não corrigido da micropipeta (alíquota de 0,4 mL para o tubo reacional) - Certificado
u_{7B}	Dúvida na leitura da micropipeta (alíquota de 0,4 mL para o tubo reacional) - Resolução
u_{8B}	Incerteza do coeficiente linear da regressão linear (referente à solução padrão de D-Ribose)
u_{9B}	Incerteza do coeficiente angular da regressão linear (referente à solução padrão de D-Ribose)
u_{10B}	Incerteza da calibração do balão volumétrico de 2000 mL (Certificado)
u_{11B}	desvio não corrigido do balão volumétrico de 2000 mL (Certificado)
u_{12B}	erro de paralaxe para avolumar BV de 2000mL (assumido)
u_{13B}	Incerteza da calibração da pipeta volumétrica de 100 mL (Certificado)
u_{14B}	desvio não corrigido da pipeta volumétrica de 100 mL (Certificado)
u_{15B}	erro de paralaxeda pipeta volumétrica de 100 mL (assumido)
u_c	Incerteza padrão Combinada
U	Incerteza padrão Expandida

A tabela abaixo apresenta as incertezas associadas ao conteúdo de d-ribose de cada fonte.

Símbolo	Valor (±)	PA (%)	Distribuição de probabilidade divisor		C_i Coeficiente de Sensibilidade	Incerteza Padrão PA = 68% (mg/mL)	ν Graus de Liberdade
u_{1A}	0,84300 ug/mL	68	normal	1	1	± 0,84300	19
u_{17B}	0,0005 (adimensional)	68	padrão assumida	1	358,5148 µg/mL	± 0,17926	infinito
u_{17B}	0,004 Abs	95,45	normal	k = 2,00	881,6692 µL/mg.Abs	± 1,76334	infinito
u_{17B}	0,002 Abs	68	padrão assumida	1	881,6692 µL/mg.Abs	± 1,76334	infinito
u_{17B}	0,0005 Abs	100	retangular	raiz(3) = 1,73	881,6692 µL/mg.Abs	± 0,25452	infinito
u_{17B}	0,00059 mL	95,45	normal	k = 2,00	2229,96 µL . mL ⁻²	± 0,65784	infinito
u_{17B}	0,00050 mL	68	padrão assumida	1	2229,96 µL . mL ⁻²	± 1,11498	infinito
u_{17B}	0,00100 mL	100	retangular	raiz(3) = 1,73	2229,96 µL . mL ⁻²	± 1,28747	infinito
u_{17B}	0,0068 Abs	95	normal	k = 2,05	-44,08 Abs	± 0,14622	2,01
u_{18B}	0,00030 µg/mL.Abs	95	normal	k = 4,30	6321,83 µL/mg.Abs	± 0,44106	27,45
u_{2B}	1,00 mL	95,45	normal	k = 2,0	0,6478 µL . mL ⁻²	± 0,32390	infinito
u_{3B}	0,00 mL	68	padrão (assumido)	1	0,6478 µL . mL ⁻²		infinito
u_{4B}	0,4203 mL	100	retangular	$\frac{\sqrt{3}}{3} = 1,732$	0,6478 µL . mL ⁻²	± 0,15721	infinito
u_{5B}	0,04 mL	95,45	normal	k = 2,00	12,9560 µL . mL ⁻²	± 0,25912	infinito
u_{6B}	0,00 mL	68	padrão (assumido)	1	12,9560 µL . mL ⁻²		infinito
u_{7B}	0,0282 mL	100	retangular	$\frac{\sqrt{3}}{3} = 1,732$	12,9560 µL . mL ⁻²	± 0,21130	infinito
u_C	± 3,289 µg/mL	68	Normal				
U	± 6,58 µg/mL	95	Normal	k = 2,00			$V_{eff} = 4151,38$

Tabela 13 – Incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de D´ribose de cada fonte

O valor da incerteza combinada da caracterização para a análise de D´ribose é igual a 1,84µg/mL. Este resultado será utilizado na incerteza padrão combinada do material de referência.

6.4.1.2. Estimativa de Incerteza dos Resultados das medições de Proteína (Lorwy)

No quadro abaixo estão descritas as principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de Proteína.

Quadro 3 – Principais fontes de incerteza para a estimativa da incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de Proteína.

Símbolo	Nome / Fonte de incerteza
u_{1A}	Incerteza devido à repetitividade das análises de caracterização = $s/\text{raiz}(n)$ s = desvio padrão amostral entre 20 repetições em 3 dias: 6 no 1º, 7 no 2º e 7 no 3º; n = 20
u_{1B}	Incerteza da calibração do espectrofotômetro (Certificado)
u_{2B}	Erro não corrigido do Espectrofotômetro (Certificado)
u_{3B}	Dúvida na leitura da Espectrofotômetro ("resolução")
u_{4B}	Incerteza do coeficiente linear da regressão linear (calculada)
u_{5B}	Incerteza do coeficiente angular da regressão linear (calculada)
u_{6B}	Incerteza da calibração do balão volumétrico de 2000 mL (Certificado)
u_{7B}	desvio não corrigido do balão volumétrico de 2000 mL (Certificado)
u_{8B}	erro de paralaxe para avolumar BV de 2000mL (assumido)
u_{9B}	Incerteza da calibração da pipeta volumétrica de 100 mL (Certificado)
u_{10B}	desvio não corrigido da pipeta volumétrica de 100 mL (Certificado)
u_{11B}	erro de paralaxeda pipeta volumétrica de 100 mL (assumido)
u_c	Incerteza padrão Combinada
U	Incerteza padrão Expandida

A tabela abaixo apresenta as incertezas associadas ao conteúdo de Proteína de cada fonte.

Tabela 14 – Incerteza de medição (caracterização), associada ao conteúdo de Proteína de cada fonte.

Símbolo	Valor (±)	PA (%)	Distribuição de probabilidade		C_i Coeficiente de Sensibilidade		Incerteza Padrão PA = 68% ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	ν Graus de Liberdade
				divisor				
u_{1B}	2,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	95,00	normal	$k = 1,7$	20	(adimensional)	$\pm 24,755$	218
u_{2B}	0,003 unidade de abs	95	normal	$k = 2,0$	357,1429	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{abs}^{-1}$	$\pm 0,53571$	infinito
u_{3B}	0,006 unidade de abs	68	padrão (assumida)	1	357,1429	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{abs}^{-1}$	$\pm 2,14286$	infinito
u_{4B}	0,001 unidade de abs	100	retangular	$\frac{\sqrt{3}}{3} = 1,732$	357,1429	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{abs}^{-1}$	$\pm 0,10310$	infinito
u_{5B}	0,098 Abs	95	Normal	$k = 1,96$	357,1429	$\mu\text{L}/\text{mL} \cdot \text{Abs}$	$\pm 17,89981$	infinito
u_{6B}	0,00047 $\mu\text{L}/\text{mL} \cdot \text{Abs}$	95	Normal	$k = 1,96$	0,0073	Abs	$\pm 0,00000$	infinito
u_{2B}	1,00 mL	95,45	normal	$k = 2,0$	0,6478	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$	$\pm 0,32390$	infinito
u_{3B}	0,00 mL	68	padrão (assumido)	1	0,6478	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$		infinito
u_{4B}	0,4203 mL	100	retangular	$\frac{\sqrt{3}}{3} = 1,732$	0,6478	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$	$\pm 0,15721$	infinito
u_{5B}	0,04 mL	95,45	normal	$k = 2,00$	12,9560	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$	$\pm 0,25912$	infinito
u_{6B}	0,00 mL	68	padrão (assumido)	1	12,9560	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$		infinito
u_{7B}	0,0282 mL	100	retangular	$\frac{\sqrt{3}}{3} = 1,732$	12,9560	$\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-2}$	$\pm 0,21130$	infinito
u_C	30,63 $\mu\text{L}/\text{mL}$	68	Normal					
U	60,18 $\mu\text{L}/\text{mL}$	95	Normal	$k = 1,96$			$V_{eff} = 511$	

Onde: u_C = Incerteza Padrão Combinada; U = Incerteza Expandida; k = fator de abrangência; PA = Nível da Confiança (Probabilidade de Abrangência); V_{eff} = Graus de liberdade efetivos.

O valor da incerteza combinada da caracterização para a análise de Proteína é igual a 3,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este resultado será utilizado na incerteza padrão combinada do material de referência.

6.4.2. Componente associada à homogeneidade

Para os cálculos da componente da incerteza da homogeneidade, será utilizados os valores obtidos na tabela do teste de variância (ANOVA) obtido no estudo de homogeneidade.

Na determinação de D-ribose, o valor da média quadrática entre os frascos foi maior que o valor da média quadrática dentro dos frascos. Logo, para calcular a incerteza associada à homogeneidade utiliza-se a expressão abaixo:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{(M_{\text{quadrática entre frascos}} - M_{\text{quadrática dentro dos frascos}})/n} = \\ \sqrt{(198,07 - 131,27)/3} = 2,72 \mu\text{g/mL}$$

Na determinação de Proteína, o valor da média quadrática entre os frascos foi menor que o valor da média quadrática dentro dos frascos. Logo, para calcular a incerteza associada à homogeneidade utiliza-se a expressão abaixo:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt[4]{\frac{M_{\text{Dentro dos frascos}}}{n} * \frac{2}{(n-1)}} = \\ \sqrt[4]{((2267,19/44) \times (2/43))} = 1,24 \mu\text{g/mL}$$

6.4.3. Componente associada à estabilidade

Para determinação deste componente, utilizou-se o desvio padrão da sensibilidade denominado em $s(b_1)$ que é a incerteza associada à sensibilidade e o tempo utilizado.

$$u_{\text{estabilidade}} = S_{b1}(\text{desvio padrão calculado em análise de tendência}) \times \text{tempo}$$

Para D-ribose:

$$u_{\text{estabilidade}} = 0,63 \times 6 = 3,78 \mu\text{g/mL}$$

Para Proteína:

$$u_{\text{estabilidade}} = 0,57 \times 6 = 3,42 \mu\text{g/mL}$$

6.4.4. Incerteza Combinada

Calculada todas as fontes de incerteza do material, utiliza-se a equação abaixo para o cálculo da incerteza padrão combinada para os ensaios de D-ribose e Proteína.

Valor da incerteza combinada expandida para D-ribose

$$u_{\text{MRC}} = 2 \sqrt{(4,32)^2 + (2,72)^2 + (3,78)^2} = 12,70 \mu\text{g/mL}$$

Valor da incerteza combinada expandida para Proteína

$$u_{\text{MRC}} = 2 \sqrt{(30,63)^2 + (1,24)^2 + (3,24)^2} = 61,65 \mu\text{g/mL}$$

O gráfico abaixo foi formulado para verificar a contribuição de cada componente no cálculo da incerteza combinada para D´ribose e Proteína.

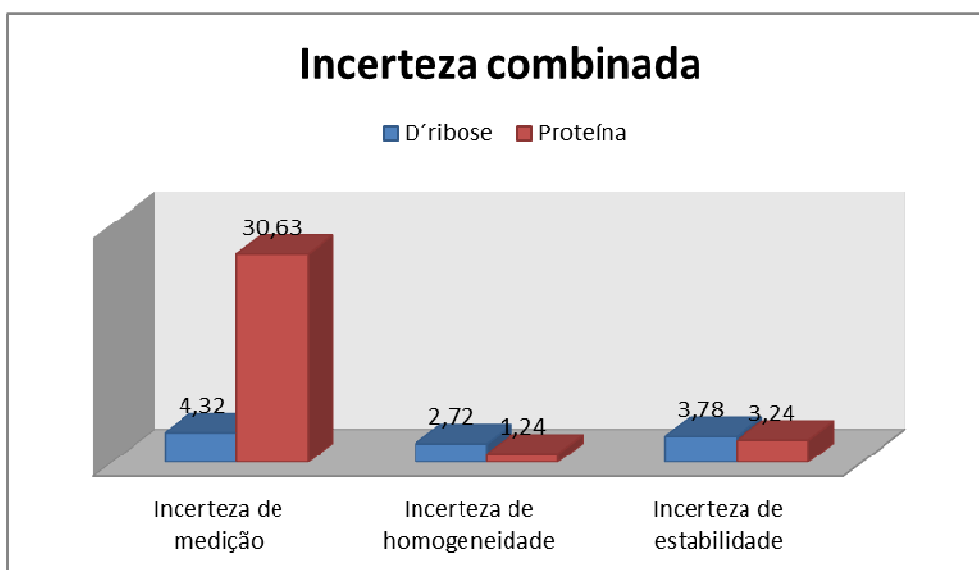


Gráfico 16 – Contribuição de cada componente na incerteza do material de referência;

Pode-se verificar que as maiores fontes de incerteza para D´ribose e Proteína é o componente de estabilidade (armazenamento), sendo este componente de

incerteza do tipo B dominante. Logo, o valor do fator de abrangência é equivalente a 2, como utilizado na equação de incerteza combinada padrão.

Com os valores obtidos acima, pode-se verificar que o percentual da incerteza combinada expandida em relação ao total para cada metodologia é menor que 5%, o que se encontra dentro do critério de avaliação de acordo com a RDC nº 899 da ANVISA.

Resultado:

D´ribose	878,75 µg/mL	± 12,70 µg/mL	± 1,49%
Proteína	1314,54 µg/mL	± 61,65 µg/mL	± 4,69%

7. CONCLUSÃO

De acordo com as etapas realizadas na elaboração do material de referência para os métodos de D´ribose e proteína, foram avaliados a caracterização, homogeneidade e estabilidade, podendo verificar que:

A partir da análise de caracterização, pode-se verificar que o método utilizado no laboratório é o mais indicado para realizar os ensaios e no preparo do material de referência. Neste caso, os resultados médios encontrados foram:

-D´ribose: 878,75 µg/mL;

- Proteína: 1314,54 µg/mL;

Os resultados obtidos em todas as etapas avaliadas do coeficiente de variação para a repetibilidade encontra-se dentro do critério aceitável pela Resolução 899 da Anvisa de $\leq 5\%$, podendo considerar os resultados uniformes entre si.

Para a avaliação da homogeneidade, foi realizado a análise de variância (ANOVA), através dos seguintes critérios:

- D´ribose: $F_{\text{Calculado}} (1,51) < F_{\text{Crítico}} (2,04)$;

- Proteína: $F_{\text{Calculado}} (0,96) < F_{\text{Crítico}} (2,05)$;

-D´ribose: Valor-P (0,17) $> 0,05$;

- Proteína: Valor-P (0,51) $> 0,05$;

Indicando que não há diferença significativa entre os resultados e confirmando a homogeneidade dos resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância mostrando que o lote é homogêneo.

A partir da análise de tendência, para a avaliação da sensibilidade do material, onde deve seguir o seguinte critério:

D´ribose: $I b_1 I (0,13) < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1) (1,35)$;

Proteína: $I b_1 I (0,18) < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1) (1,21)$;

Assim, mostrando que o lote é estável na temperatura real de armazenamento (2 – 8°C). conforme citado anteriormente o estudo de estabilidade será mantido por 5 anos.

De acordo com a ISO GUIDE 35, todos os requisitos de planejamento e produção necessários para a elaboração do material de referência *in house* foram atendidos. Com isso, será elaborado um certificado do material de incerteza do PSTT que poderá ser utilizado pelos laboratórios de controle de qualidade.

Os valores estabelecidos para o material de referência *in house* são:

D´ribose: $878,75 \pm 40,80 \mu\text{g/mL}$;

Proteína: $1314,54 \pm 45,48 \mu\text{g/mL}$;

Em conformidade com as normas vigentes, conclui-se que o material de referência *in house* produzido atende ao critérios estabelecidos. Devido a sua abrangência, este material atenderá ao controle de qualidade do PRRP, PSTT e vacina Hib e poderá ser utilizado no controle físico-químico de Biomanguinhos e por outros laboratórios.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.** 2ª edição. 2005.

ABNT ISO GUIA 30, **Termos e Definições Relacionados com Materiais de Referência.** 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 31, **Conteúdo de Certificados de Materiais de Referência.** 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 32, **Calibração em química analítica e uso de materiais de referência.** 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 33, **Utilização de materiais de referência certificados.** 1ª edição. 2002.

ABNT ISO GUIA 34, **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência,** 1ª edição. 2004.

ABNT ISO GUIDE 35, **Certification of reference materials – General and Statistical Principles,** Revision of 2ª edition; 2003.

ALMEIDA, A. E. C. C.: **Cepas de *Haemophilus influenzae* circulantes**. 2005. Tese de Doutorado submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Vigilância Sanitária. INCQS/FIOCRUZ, 2005.

ALONSO, IMT. **Controle Estatístico de Processo: O Caso da Produção da Vacina Contra *Haemophilus influenzae* Tipo b – HIB**. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz – IOC. 2005. 102 p. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

AYUB, M. A.; PINTO, P. R. P.: **Doença invasiva por *Haemophilus influenzae* b. Perspectiva em vacinação**. *Arq. Med. ABC*, vol. 17 (1 e 2): 38-43, 1994.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BARETA GMS. **Garantia de qualidade em farmácia hospitalar**. Belo Horizonte, FHEMIG, 47p, 1994.

BIO-MANGUINHOS. **Bio-Manguinhos/FIOCRUZ nacionaliza a vacina conjugada Hib e passa a produzir mais um imunobiológico 100% brasileiro**. Assessoria de Comunicação de Bio-Manguinhos. 2007. [on-line] [consultado em 22 jan. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/releases/2007-nacionalizacao-hib.pdf>.

..... **Histórico da parceria tecnológica entre Bio-Manguinhos e GSK**. Assessoria de Comunicação de Bio-Manguinhos. 2009. [on-line] [consultado em 22 jan. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/releases/2009-historico-bio-gsk-release-final.pdf>

[on-line] [consultado em 17 mar. 2012]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas>.

Bula da Vacina Conjugada contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib), disponível em www.bio.fiocruz.br, acessado em 05/07/2010.

BOUSKELA, MAL; Grisi, S; Escobar, AMU. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo B**. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 7(5), 2000.

CAMPOS, J M. ***Haemophilus***. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999. p.604-613.

CARVALHO, C. M. N.; ANDRADE, A. S. S.: **Vacinação contra *Haemophilus influenzae* tipo b: proteção a longo prazo**. *Jornal de Pediatria*, vol. 82(suplemento 3):109-14, 2006.

CDC - Centers For Disease Control. ***Haemophilus influenzae* type b**. [S.l.], [2006].p.14. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hib.pdf> . Acesso em: 11 dezembro 2011.

COMITÊ BRASILEIRO DE METROLOGIA (CBM), **Diretrizes Estratégicas para a Metrologia Brasileira. 2008**. Conselho nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. CONMETRO, 2008.

EURACHEM/CITAC Guide. **Traceability in Chemical Measurement**. 2003.

EUZÉBY JP. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature - Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire** - France. [2010]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr>. Acesso em 11 maio 2010.

European Pharmacopoeia. 5th edition. January 2005; vol 1; p.662.

GADELHA C, Azevedo N. **Vaccine innovations in Brazil: recent experiences and structural constraints.** História, Ciências, Saúde-Manguinhos. Janeiro de 2003;10:697-724.

GUIA EURACHEM/CITAC. **Determinando a incerteza na medição analítica.** 2ª edição. QUAM:2002.

GUIA EURACHEM/RELACRE 1. **Exemplos de cálculo de incerteza.** GT01; Edição 1. Setembro 2002.

GOMES, M. J. V. M.; REIS, A. M. M.; NUNAM, E. A.; **Ciências farmacêuticas: uma abordagem em farmácia hospitalar.** 1ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

GÓMESZ, LA. **Instrumentação de Ensino – Incerteza de medição (ECV 5240).** Disponível em: labeee.ufsc.br/~luis/ecv4211/Apostilas/incerteza1p.pdf, acessado em 19/02/2013.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products.** Q5C. 4 version. 30 Nov. 1995.

GUIA Inmetro/GUM . **Avaliação de dados de medição — Guia para a expressão de incerteza de medição.** 1ª edição, 2008; JCGM 100:2008.

INMETRO. **Orientações para seleção e uso de materiais de referência.** DOQ-CGCRE-016; 2005.

ISO 8402. **Quality management and quality assurance – Vocabulary.** 1^a edition.1994.

KING B. **The selection and use of reference materials – A basic guide for laboratories and accreditation bodies.** Accred. Qual. Assur. 2003; 8:429-433.

KMETZCH C I et al. **Occurrence of *Haemophilus influenzae B* meningitis after the implementation of a mass vaccination program.** Jornal de Pediatria 2003; Vol. 79-6:530-536.

JORDENS R.N.; SLACK M.P.E. ***Haemophilus influenzae: then and now.*** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. v.14, n.11, p.935-948, 1995.

MARRS C.F. *et al.* ***Haemophilus influenzae – Human Specific Bacteria.*** Frontiers in Bioscience. v.6, p.41-60, 2001.

MARTINS, FO. **Avaliação da resposta imunológica humoral, em animais de experimentação, induzida pela combinação da vacina DTP-Hib com as vacinas meningocócicas B e C conjugada, desenvolvidas em Bio-Manguinhos.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 2011. 125 p. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos.

MAWAS F et al. **Evaluation of the saccharide content and stability of de first WHO International Standard for *Haemophilus influenzae b* capsular polysaccharide.** J.biologicals 2007; 35:235-245

MIRANZI SSC, Moraes SA, Freitas ICM. **Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on HIB meningitis in Brazil.** Saúde Pública 2007; 23(7):1689-1695.

MORRIS SK, Moss WJ, Halsey N. Review :*Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. [on line] 8 July 2008 [consultado em 05 de dezembro de 2010]. Disponível: <http://infection.thelancet.com>

MURPHU T. *et al.* **Declining incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination.** Journal of American Medicine Association. v.269, n.2, p. 246-248, 1993.

NATURE. **Remembering things past.** Nature Immunology. 2011; 12(6):461-461.

NUNES, DK. **Fortalecimento das vantagens competitivas de Bio-Manguinhos no âmbito da inovação tecnológica de vacinas decorrentes da exposição à competição internacional.** [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. 2009. 94 p. Programa de Pós-Graduação Profissional em Saúde Pública.

PIC/S - Pharmaceutical inspection convention. **Guide to good manufacturing practice for medicinal products.** PE 009-8 (Part I).15 January 2009.

RIBEIRO GS, *et al.* ***Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil.** Vaccine 2007;25:4420–8.

RODRIGUES, E O. **Elaboração de Material de Referência *in house* para vacina contra Hib e produtos intermediários. Uma proposta para normalização de testes físico-químicos do controle de qualidade.** [dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto de Tecnologia de Imunobiológico, 2009. 126p.

SUKUPOLVI-PETTY S. *et al.* **The *Haemophilus influenzae* Type b hcsA and hcsB Gene Products Facilitate Transport of Capsular Polysaccharide across the Outer**

Membrane and Are Essential for Virulence. Journal of Bacteriology. v.188, n.11, p.3870-3877, 2006.

TRABULSI, L.R.; MARTINEZ M.B. *Haemophilus influenzae e Outras Espécies do Gênero* In: Microbiologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p.247-253.

Verez-Bencomo V, et al. **A Synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* Type b.** *Science* 2004; 305: 522-525.

WHO - World Health Organization. **Global program for vaccines and immunization (GPV).** Wkly Epidemiol Rec 1998.

WHO - World Health Organization. *Haemophilus influenzae* .**Core information for the development of immunization policy.** WHO/V&B/02.28. 2002

WHO - World Health Organization. *Haemophilus influenzae* type b Hib meningitis **in the pré-vaccine era: a global review of incidence, age distributions, and case fatality rates.** WHO/V& B/02.18; 2002.