UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Incerteza de medição na avaliação de desempenho de métodos
analíticos e estratégias de melhoria com a aplicação do *Analytical*
Quality by Design

Luciana Separovic

Tese para obtenção do Título de Doutora
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Incerteza de medição na avaliação de desempenho de métodos
analíticos e estratégias de melhoria com a aplicação do *Analytical*
Quality by Design

Luciana Separovic

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de Doutora
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S479i	<p>Separovic, Luciana</p> <p>Incerteza de medição na avaliação de desempenho de métodos analíticos e estratégias de melhoria com a aplicação do Analytical Quality by Design / Luciana Separovic. - São Paulo, 2021.</p> <p>104 p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.</p> <p>Orientador: Lourenço, Felipe Rebello</p> <p>1. Incerteza de medição. 2. Riscos de decisão falsa. 3. Avaliação da conformidade. 4. Otimização de método analítico. 5. Cromatografia líquida. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.</p>
-------	---

Luciana Separovic

Incerteza de medição na avaliação de desempenho de métodos analíticos e
estratégias de melhoria com a aplicação do *Analytical Quality by Design*

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do Título de Doutora

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

À minha mãe Elena, com muito amor e gratidão pela base, amor, paciência e apoio, tão necessários durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha melhor amiga Talita, por estar presente nos momentos bons e ruins, pela amizade, companheirismo, apoio e por sempre torcer e acreditar em mim.

À minha quase irmã Paula, por toda amizade, colaboração e apoio não somente ao longo da realização deste trabalho, mas na vida.

Aos meus amigos e familiares, pela amizade, por toda ajuda e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe, por todo ensinamento, atenção e por acreditar em meu potencial e sempre apoiar meu progresso.

À Claudineia, Edgar, Elisabete e Rogério, pelos ensinamentos e assistência na realização prática deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André, por ser o primeiro a sugerir a mudança de nível do meu projeto, acreditando em seu potencial.

Ao Prof. Dr. Ricardo da Universidade de Lisboa, pelas oportunidades de colaboração, ensinamentos e credibilidade.

Ao secretário do programa, David, por toda assistência ao longo desses anos.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fapesp, pelo apoio financeiro concedido através do processo no 2018/25734-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Finalmente, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial ao Departamento de Farmácia, pela oportunidade de realização deste trabalho!

"Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio."

Paracelso (1493-1541)

RESUMO

SEPAROVIC, L. **Incerteza de medição na avaliação de desempenho de métodos analíticos e estratégias de melhoria com a aplicação do *Analytical Quality by Design***. 2021. 104p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os resultados analíticos são utilizados como base para tomadas de decisão da conformidade. Porém, devido à incerteza de medição (IM), é possível que um método analítico não apresente desempenho adequado para sua aplicação na avaliação da conformidade, afetando a confiabilidade de seus resultados. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram estabelecer procedimentos para a avaliação de desempenho de métodos analíticos com base na IM e utilizar os conceitos de *Analytical Quality by Design* (AQbD) para propor estratégias de melhoria. Inicialmente, os valores de IM dos métodos foram estimados pela abordagem *top-down*, com base na exatidão e precisão. Os riscos do consumidor e do produtor foram estimados pelas abordagens Bayesiana e frequentista. A maioria dos métodos avaliados apresentou IM acima do recomendado, refletindo nos riscos de tomada de decisão. Um dos métodos avaliados foi utilizado como base para otimização com a aplicação do AQbD. Para tal, a IM foi estimada pela abordagem *bottom-up*, permitindo a identificação e quantificação das fontes de incerteza, o que foi utilizado como base para o planejamento de experimentos, juntamente com fatores que influenciam as respostas cromatográficas. Os modelos de regressão obtidos foram considerados adequados e então foram utilizados para definição da região operável do método pelo Método de Monte Carlo. O método otimizado foi verificado quanto ao desempenho, apresentando redução expressiva na incerteza de medição, nos riscos de decisão falsa e nos custos relativos de tomada de decisão na conformidade. Este trabalho constatou a importância da IM na avaliação de desempenho de métodos analíticos e seu impacto nos riscos de tomada de decisão na avaliação de conformidade de medicamentos. Adicionalmente, as estratégias propostas para melhoria de desempenho se mostraram eficazes, com obtenção de um método robusto com IM reduzida, garantindo maior confiabilidade em seus resultados.

Palavras-chave: Incerteza de medição, riscos de decisão falsa, avaliação da conformidade, otimização de método analítico, cromatografia líquida.

ABSTRACT

SEPAROVIC, L. **Measurement uncertainty in the performance evaluation of analytical procedures and optimization strategies using Analytical Quality by Design**. 2021. 104p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The analytical results are the basis for decision-making in conformity assessment. However, due to the measurement uncertainty (MU), it is possible that analytical procedures do not present adequate performance for its application in conformity assessment, affecting the reliability of its results. Thus, the aim of this work was to establish procedures for performance evaluation of analytical procedures based on the MU and to use the concepts of Analytical Quality by Design (AQbD) to propose optimization strategies. Initially, the MU values of the procedures were estimated by top-down approach, based on trueness and precision data. The consumer's and producer's risks were estimated by Bayesian and frequentist approaches. Most of the evaluated procedures presented MU value above the recommended, reflecting on the risks of false decision. One of the evaluated procedures was the basis for optimization using AQbD. To this end, the MU was estimated by bottom-up approach, allowing the identification and quantification of the sources of uncertainty, which was used as a basis for the design of experiments, along with factors that influence the chromatographic responses. The regression models obtained were considered adequate and then were used to define the method operable design region by Monte Carlo method. The optimized procedure was verified for performance, showing a significant reduction in MU, risks of false decision, and relative costs of decision-making in conformity assessment. This work showed the importance of MU in the performance evaluation of analytical procedures and its impact on the risks of false decision in conformity assessment of medicines. Additionally, the proposed strategies to improve performance proved to be effective, obtaining a robust procedure with reduced MU, ensuring results with greater reliability.

Keywords: Measurement uncertainty, risks of false decision, conformity assessment, analytical procedure optimization, liquid chromatography

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Contribuição da precisão e exatidão na incerteza expandida dos métodos analíticos aplicados às seguintes formas farmacêuticas: (A) pós para suspensão oral ou injetáveis; (B) cápsulas e comprimidos; (C) soluções, suspensões e outros, e (D) creme, gel e pomada. O tracejado (2,5%) representa a incerteza alvo de acordo com guia da Eurachem/Citac ⁶⁴.----- 31
- Figura 2** – Incertezas de medição estimadas por outros métodos. O tracejado (2,5%) representa a incerteza alvo de acordo com guia da Eurachem/Citac ⁶⁴.----- 31
- Figura 3** – Histogramas das simulações de Monte Carlo para distribuição prévia. Os tracejados delimitam as faixas de especificação para os cenários 1, 3, 5 e 7 (90-110%) e para os cenários 2, 4, 6 e 8 (95-105%). (A) cenários 1 (Cpk 1,67) e 2 (Cpk 0,83), média = 100% e DP = 2%; (B) cenários 3 (Cpk 1,11) e 4 (Cpk 0,56), média = 100% e DP = 3%; (C) cenários 5 (Cpk 1,33) e 6 (Cpk 0,50), média = 98% e DP = 2%; (D) cenários 7 (Cpk 0,89) e 8 (Cpk 0,33), média = 98% e DP = 3%. Onde: Cpk = índice de capacidade de processo e DP = desvio padrão. ----- 34
- Figura 4** – Riscos globais do consumidor (R_c) e do produtor (R_p) de acordo com a razão entre incerteza de medição e faixa de especificação (U/T%) para diferentes índices de capacidade de processo (Cpk). ----- 36
- Figura 5** – Riscos condicionais do consumidor (R'_c) e do produtor (R'_p) de acordo com a razão entre incerteza de medição e faixa de especificação (U/T%) para diferentes índices de capacidade de processo (Cpk). ----- 37
- Figura 6** – Riscos específicos de acordo com o U/T% (razão entre incerteza de medição e faixa de especificação) dos métodos analíticos avaliados (pontos no gráfico), para cada delta (distância entre possíveis resultados analíticos e faixa de especificação).--- 45
- Figura 7** – Riscos específicos para uma incerteza de medição 2,50%, considerando faixa de especificação de 90-110%, *guard band* com intervalo de aceitação de 92.1-107.9% e resultados analíticos de 80-120%. ----- 47
- Figura 8** – Influência da incerteza de medição para um mesmo resultado analítico (93%), considerando faixa de especificação de 90-110%. (A) incerteza de medição 0,44% e *guard band* com intervalo de aceitação de 90,4-109,6%; (B) incerteza de medição 2,50% e *guard band* com intervalo de aceitação de 92,1-107,9%; (C) incerteza de medição 5,28% e *guard band* com intervalo de aceitação de 94,3-105,7%.----- 48

Figura 9 – Riscos globais do consumidor e do produtor obtidos pela abordagem Bayesiana a partir de cenário de processo produtivo uniforme, de acordo com a incerteza expandida (%) dos métodos analíticos avaliados neste estudo.-----	50
Figura 10 – Comparação entre riscos específicos Bayesianos e frequentistas. As curvas em azul representam a abordagem frequentista, e as verdes representam a curva posterior obtida pela abordagem Bayesiana; as partes preenchidas representam os riscos por cada abordagem, sendo (A) riscos do consumidor (R = 93%) e (B) riscos do produtor (R = 87%). -----	52
Figura 11 – Estrutura molecular do cloridrato de terbinafina ¹²⁹ . -----	55
Figura 12 – Linearidade do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC. -----	64
Figura 13 – Diagrama de Ishikawa com as principais fontes de incerteza do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC. -----	66
Figura 14 – Incerteza de medição estimada pelo método da planilha de Kragten. -----	67
Figura 15 – Distribuição das respostas obtidas pelo método de Monte Carlo. As linhas tracejadas mostram o valor medido e sua incerteza de medição. -----	68
Figura 16 – Contribuição individual das fontes de incerteza para o valor de incerteza total.-----	69
Figura 17 – Parâmetros que podem influenciar os atributos e objetivos do método.---	70
Figura 18 – Importância dos parâmetros do modelo (X) de cada resposta cromatográfica (Y). O tracejado corresponde ao valor crítico considerando significância de 5%.-----	75
Figura 19 – Cromatograma obtido pelo método em suas condições ótimas. -----	77
Figura 20 – Regiões operáveis do método com probabilidade de falha de até 5% quanto ao atendimento a todos os atributos desejados simultaneamente.-----	79
Figura 21 – Riscos específicos de acordo com resultados analíticos para o método original (A) e método otimizado (B). -----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros das simulações dos cenários de processo produtivo.	24
Tabela 2 – Frequência dos teores dos lotes (fora vs. dentro de especificação) e resultados analíticos dos métodos (reprovado vs. aprovado).	25
Tabela 3 – Resumo dos métodos analíticos avaliados e suas incertezas padrão.	27
Tabela 4 – Métodos analíticos de acordo com seus valores de U/T% para faixas de especificação de 90-110% e 95-105%.	33
Tabela 5 – Valores de risco específicos obtidos na planilha e nas simulações de Monte Carlo para diferentes cenários.	49
Tabela 6 – Descrição das fontes individuais de incerteza associadas ao método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC.	66
Tabela 7 – Fatores e seus níveis utilizados no planejamento fatorial com ponto central.	72
Tabela 8 – Equações de regressão das respostas cromatográficas (Y) em função dos fatores do método (X).	73
Tabela 9 – Análise de variância dos termos dos modelos de regressão das respostas cromatográficas (Y) em função dos fatores do método (X).	74
Tabela 10 – Limites das respostas ótimas do método.	76
Tabela 11 – Respostas obtidas com as condições ótimas do método.	77
Tabela 12 – Descrição das fontes individuais de incerteza associadas ao método otimizado.	81
Tabela 13 – Matriz de custo do método original e otimizado.	84

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Incerteza padrão combinada.-----	23
Equação 2 – Incerteza expandida. -----	23
Equação 3 – Razão entre incerteza de medição e faixa de especificação. -----	24
Equação 4 – Índice de capacidade de processo. -----	24
Equação 5 – Risco global do consumidor.-----	25
Equação 6 – Risco global do produtor. -----	25
Equação 7 – Risco condicional do consumidor. -----	26
Equação 8 – Risco condicional do produtor. -----	26
Equação 9 – Teor (%) de cloridrato de terbinafina. -----	61
Equação 10 – Expressão matemática para cálculo da incerteza combinada. -----	62
Equação 11 – Teste de compatibilidade metrológica de acordo com valor z. -----	81

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
OBJETIVOS	19
PARTE 1: Incerteza de medição e risco de decisão de conformidade na avaliação de desempenho de métodos analíticos de cromatografia líquida	20
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Estratégias de busca	22
2.2. Estimativa da incerteza de medição	23
2.3. Simulações de Monte Carlo	24
2.4. Estimativa dos riscos do consumidor e do produtor	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4. CONCLUSÃO	39
PARTE 2: Abordagem frequentista para estimativa de riscos de decisão de conformidade com base na incerteza de medição de métodos de cromatografia líquida	40
5. INTRODUÇÃO	40
6. MATERIAL E MÉTODOS	41
6.1. Estimativa dos riscos específicos pela abordagem frequentista	41
6.2. Planilha para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista	41
6.2.1. Validação da planilha de riscos específicos pela abordagem frequentista	42
6.3. Estimativa dos riscos globais pela abordagem Bayesiana	43
6.4. Comparação dos riscos específicos estimados pelas abordagens Bayesiana e frequentista	43
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7.1. Estimativa dos riscos específicos pela abordagem frequentista	44
7.2. Planilha para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista	46
7.2.1. Validação da planilha de riscos específicos pela abordagem frequentista	49
7.3. Estimativa dos riscos globais pela abordagem Bayesiana	49
7.4. Comparação dos riscos específicos estimados pelas abordagens Bayesiana e frequentista	51
8. CONCLUSÃO	53
PARTE 3: Identificação e quantificação das fontes de incerteza do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC e otimização com aplicação do <i>Analytical Quality by Design</i>	55
9. INTRODUÇÃO	55
10. MATERIAL E MÉTODOS	60
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
11.1. Verificação do método e estimativa da incerteza pela abordagem <i>top-down</i>	64
11.2. Estimativa da incerteza pela abordagem <i>bottom-up</i>	65
11.3. Estratégias de melhoria do método	69

11.3.1. Contribuição das fontes de incerteza e aplicação do AQbD para otimização do método.....	69
11.3.2. Avaliação da incerteza de medição, dos riscos de decisão falsa e seus custos relativos.....	80
12. CONCLUSÃO.....	85
CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS.....	100

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os resultados analíticos, sejam eles qualitativos ou quantitativos, são bases fundamentais para o desenvolvimento da indústria e da ciência na sociedade moderna. Na pesquisa científica, são usados para comparar grupos controle e experimentais, testar hipóteses, expressar relações entre variáveis, entre outros usos, de tal modo que constituem o alicerce para a discussão e conclusão de estudos científicos. Na área clínica farmacêutica, refletem características fisiopatológicas, tais como a dosagem de hormônios, xenobióticos, toxinas, biomarcadores e outros; contagem de células; curvas de biodisponibilidade absoluta e relativa, entre outras situações. Na indústria, os resultados são usados para estimar rendimentos, atribuir determinada qualidade a materiais, produtos ou sistemas e compará-los contra as especificações internas ou determinadas legalmente, entre outras aplicações ¹.

O papel fundamental dos resultados analíticos na transmissão de conhecimento e na avaliação da conformidade levou à identificação da importância de que estes sejam obtidos pelo emprego de métodos analíticos com características de desempenho que garantam resultados precisos e exatos ². Em diversas áreas, atualmente existe um requisito, frequentemente regulatório, para que os laboratórios possuam algum tipo de sistema de garantia da qualidade que permita que os resultados emitidos apresentem a confiabilidade requerida. Usualmente, as medidas adotadas são a validação de método, protocolos de controle de qualidade internos, participação em ensaios de proficiência, e acreditação baseada na ISO/IEC 17025 ^{1,3,4}.

Apesar dessas ações, um resultado analítico jamais será capaz de ser uma representação absoluta e perfeita do parâmetro medido. Sempre haverá uma incerteza associada a um resultado analítico, mesmo que todas as fontes de incerteza tenham sido avaliadas ^{1,5}. A incerteza de medição é um parâmetro que reflete o intervalo de valores que podem ser atribuídos ao que está sendo medido (mensurando), como por exemplo o teor de um ingrediente farmacêutico ativo. A necessidade de mensurar e expressar a qualidade de um resultado analítico deu início à busca por uma forma de medição de incerteza que pudesse estabelecer a confiança sobre determinado resultado, independentemente do tipo de análise, e que pudesse atribuir comparabilidade entre resultados analíticos obtidos para diferentes produtos ou lotes (rastreadáveis metrologicamente ao mesmo padrão), entre um resultado e sua especificação, ou entre diferentes métodos analíticos ⁶⁻⁸.

A medição de incerteza proposta no guia da Eurachem/Citac ¹ incorpora tanto incertezas oriundas de efeitos sistemáticos como de efeitos aleatórios, por meio da avaliação da magnitude da influência de certos parâmetros sobre a medição, e da determinação do impacto de suas respectivas incertezas sobre o resultado final. Este procedimento é usualmente denominado de propagação de incerteza ^{5,6,9}.

No contexto da química analítica, a determinação de confiança e comparabilidade do resultado é usualmente realizada pela avaliação de parâmetros gerais de desempenho do método analítico, tais como seletividade/especificidade, linearidade e faixa linear, precisão, exatidão, limite de detecção/quantificação e robustez ^{1,4}. Embora a abordagem proposta no guia da Eurachem/Citac ¹ seja diferente da usualmente utilizada em química analítica, sua aplicação foi demonstrada na literatura científica em diferentes áreas como: análises toxicológicas ¹⁰, análises físico-químicas ¹¹⁻¹⁴, análises biológicas e microbiológicas ¹⁵⁻¹⁹, análises quantitativas de fármacos por métodos microbiológicos ²⁰⁻²³, espectrofotométricos ²⁴⁻²⁷, cromatográficos ²⁸⁻³³ e eletroforéticos ³⁴. Traple e colaboradores ³⁵ publicaram em 2013 uma revisão considerando as etapas envolvidas na estimativa da incerteza de medição, as principais fontes de incerteza e sua aplicação na área de análises farmacêuticas.

Os métodos cromatográficos são frequentemente utilizados para avaliar as características relacionadas à qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. A cromatografia é uma técnica de separação em que os componentes de uma amostra são distribuídos entre uma fase estacionária (sólido ou líquido sustentado em um sólido ou gel) e uma fase móvel (na forma gasosa ou líquida) ³⁶. Dentre os tipos de técnicas cromatográficas utilizadas em análises farmacêuticas, a cromatografia líquida se destaca, com abrangente aplicação, devido sua versatilidade e alta reprodutibilidade ³⁶⁻³⁸. As aplicações quantitativas de cromatografia líquida dependem do tipo de detecção usado após a separação. Os instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são comumente equipados com detector ultravioleta (UV) ou com detector de arranjo de diodos (DAD) ³⁶. No contexto de estimativa da incerteza de medição, diversas fontes de incerteza relacionadas à determinação do teor de princípios ativos (como amoxicilina, caspofungina, cefazolina, metronidazol e linezolida, por exemplo) por cromatografia líquida podem ser citadas, como as incertezas da balança analítica, dos balões volumétricos e das pipetas, da variabilidade das áreas dos picos cromatográficos (repetibilidade das medidas instrumentais), entre outras ³⁸.

Alternativamente a abordagem de propagação de incerteza proposta no guia da Eurachem/Citac ¹, a incerteza de medição pode ser estimada com base em resultados de ensaios de proficiência, de estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (RR), por dados de validação de métodos analíticos, pelo método da planilha de Kragten e por simulações de Monte Carlo ^{5,9,12,39,40}. De acordo com a experiência do Laboratório de Metrologia, Examinologia e Qualidade por Design Analítico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), as diferentes abordagens para estimativa da incerteza de medição podem ser utilizadas em análises de rotina, com algumas vantagens e/ou limitações ⁴¹.

A incerteza de medição pode ser estimada a partir de um estudo de repetibilidade e reprodutibilidade (estudo RR) ou durante a etapa de validação do método analítico. Estas são maneiras simples para estimar a incerteza de medição, no entanto não fornecem informações sobre as contribuições individuais de cada fonte de incerteza. Por outro lado, o procedimento de propagação de incerteza proposto pelo guia da Eurachem/Citac e o método da planilha são recomendados para estudos mais aprofundados em que se faz necessário conhecer a contribuição individual de cada fonte de incerteza. Essas abordagens são convenientes para a identificação das principais fontes de incerteza, com a finalidade de simplificar procedimento de cálculo e/ou reduzir a incerteza final ^{27,41}.

O uso do método de propagação de incerteza ou da planilha de Kragten depende do conhecimento de como os resultados (*outputs*) são afetados pelas fontes de incerteza (*inputs*). Mesmo quando uma função matemática seja conhecida e bem estabelecida, pode ser difícil e/ou dispendioso realizar os experimentos necessários para estimar a incerteza de medição de ensaios complexos. Nesses casos, a incerteza de medição pode ser estimada por métodos *in silico*, usando simulações de Monte Carlo, com base na geração de números aleatórios ⁴⁰. Além disso, as simulações de Monte Carlo podem ser utilizadas em conjunto com ferramentas de planejamento de experimentos (*Design of Experiments – DoE*) e metodologia de superfície de resposta, a fim de estabelecer equação de regressão múltipla que explica os resultados (*outputs*) em função dos dados de entrada (*inputs*) ¹⁹.

As diferentes abordagens de estimativa de incerteza de medição serão utilizadas e discutidas ao longo da Parte 1 (*top-down*) e Parte 3 (*top-down* e *bottom-up*) deste trabalho.

Usualmente, os métodos analíticos empregados no controle de qualidade de medicamentos e cosméticos tem seu desempenho avaliado com base nos parâmetros de validação estabelecidos em guias nacionais e internacionais, muitas vezes sem considerar a incerteza de medição⁴²⁻⁴⁶. Portanto, mesmo que um método analítico atenda aos critérios exigidos, é possível que seu desempenho não seja adequado para sua aplicação na avaliação da conformidade^{7,47-49}. Em outras palavras, o método pode apresentar limitações de desempenho que podem levar à aprovação de um lote fora de especificação (risco do consumidor) ou à reprovação de um lote dentro de especificação (risco do produtor). Sendo assim, a incerteza de medição é ferramenta fundamental para a avaliação da conformidade, pois permite que esses riscos sejam estimados, auxiliando na tomada de decisão com base na probabilidade de decisões falsas^{8,50,51}. Maiores detalhes e as aplicações dos diferentes tipos de risco (globais, condicionais e específicos) são abordados nas Partes 1, 2 e 3 deste trabalho.

A razão entre a incerteza de medição associada a um método analítico e a faixa de especificação do produto pode ser utilizada na avaliação de desempenho do método analítico⁴⁷. Valores elevados de incerteza de medição evidenciam limitações de desempenho do método, que levam ao aumento dos riscos do consumidor e do produtor^{50,51}. Desta forma, a avaliação da incerteza constitui etapa importante na busca por estratégias de melhoria do desempenho de métodos analíticos, uma vez que permite identificar e quantificar as principais fontes de incerteza e, consequentemente, a origem de limitações de desempenho, importantes para aplicação do *Analytical Quality by Design* (AQbD).

A abordagem AQbD difere da abordagem tradicional de desenvolvimento de métodos, conhecida como “*one factor at a time*” (OFAT), cujo processo se baseia na variação de um fator de estudo por vez (enquanto os outros permanecem constantes), até se obter um desempenho analítico dentro do esperado. Esta abordagem é característica por ser demorada, custosa e por frequentemente resultar em métodos com baixa robustez e sem entendimento adequado sobre como os fatores e suas interações afetam seu desempenho, não permitindo alterações ou melhorias na rotina de análises⁵²⁻⁵⁴.

Os benefícios da aplicação dos princípios do AQbD incluem o desenvolvimento ou otimização de métodos analíticos com menor número de experimentos, melhor custo-benefício, a identificação e minimização de fontes de variabilidade que podem afetar o desempenho do método, maior robustez e flexibilidade regulatória, e a garantia

de que o método atenda aos requisitos de desempenho pretendidos em todo seu ciclo de vida ^{53,55,56}.

A aplicação do AQbD é dividida nas seguintes etapas: 1) definição do perfil analítico alvo (*Analytical Target Profile – ATP*), incluindo a definição da incerteza total alvo ^{8 50}; 2) definição das características de desempenho necessárias ⁵¹; 3) seleção da técnica analítica; 4) análise de risco, utilizando ferramentas de qualidade tais como diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa) e *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA); 5) realização do DoE (como planejamento fatorial incompleto e/ou completo e planejamento de compósito central), e análise de superfície resposta, com finalidade de obter os modelos de regressão das respostas e identificar os parâmetros analíticos críticos e definir a região de operação do método (*Method Operable Design Region – MODR*) ^{57–59}; 6) validação/verificação do novo método, incluindo estimativa da incerteza de medição e 7) definição de estratégias de controle (dos parâmetros analíticos críticos) com a finalidade de garantir atendimento ao ATP ⁶⁰. A abordagem AQbD e sua aplicação é mais explorada na Parte 3 deste trabalho.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estabelecer procedimentos para a avaliação de desempenho de métodos analíticos usualmente empregados no controle de qualidade de medicamentos com base na incerteza de medição estimada. Dentre os objetivos específicos do projeto se destacam:

- Estimar a incerteza de medição de métodos de cromatografia líquida usualmente empregados no controle de qualidade de medicamentos para a quantificação de antibióticos ou antifúngicos;
- Estimar os riscos do consumidor (probabilidade de aprovar um lote fora de especificação) e do produtor (probabilidade de reprovar um lote dentro de especificação) com base na incerteza de medição estimada;
- Definir estratégias de melhoria de desempenho para um dos métodos analíticos avaliados, com base na identificação e quantificação das principais fontes de incerteza que originam as limitações do método, empregando conceitos e ferramentas do *Analytical Quality by Design*.

PARTE 1: Incerteza de medição e risco de decisão de conformidade na avaliação de desempenho de métodos analíticos de cromatografia líquida

1. INTRODUÇÃO

Os métodos analíticos são empregados no controle de qualidade da indústria farmacêutica para, a partir de seus resultados, avaliar a qualidade dos medicamentos, definindo se seus parâmetros estão em conformidade com suas especificações. Porém o valor real do parâmetro analisado do produto não pode ser representado de forma absoluta pelo resultado adquirido. Esse parâmetro de interesse pode ser estimado com uma incerteza de medição (IM) associada, sendo que o valor real está entre o intervalo do resultado $\pm$ sua incerteza de medição, considerando-se um determinado nível de confiança. Essa é a chamada incerteza expandida (U), definida como o intervalo de valores que podem ser atribuídos a um resultado analítico, e estimada pelo produto entre incerteza padrão combinada (u_c), calculada por diferentes métodos, e fator de abrangência k ^{1,61}.

Portanto, a IM é necessária ao se comparar o resultado obtido com a faixa de especificação do produto, para então, decidir se este encontra-se conforme ou não conforme. Além disso, quando o procedimento para estimativa da incerteza é definido para um determinado método, este procedimento pode ser adotado para os resultados obtidos por este método, desde que não haja mudanças relevantes no método analítico. Sendo assim, se a IM não for adequada, existirá a possibilidade do valor real do parâmetro analisado encontrar-se fora dos limites de especificação, o que diminui a confiabilidade do resultado ^{1,62}.

A razão entre a IM associada a um método analítico e a faixa de especificação do produto pode ser utilizada na avaliação de desempenho de métodos analíticos ⁴⁷. Razões iguais ou menores que 10% indicam adequada capacidade de medição, portanto, que o método é aplicável ao seu propósito ^{47,63}. Um dos guias da Eurachem/Citac ⁶⁴ recomenda razão de 25%, ou U alvo de 2,5% para uma especificação de 90 a 110%, reconhecendo que valores mais baixos ou mais altos podem ser muito restritos ou flexíveis.

Todas as medições são afetadas por algum erro. É importante ressaltar que erro é a diferença entre o resultado e o valor real do parâmetro, e como o valor real é desconhecido, logo o erro também é. Um erro pode ser chamado aleatório ou

sistemático. O erro aleatório está relacionado a variações de medida imprevisíveis, enquanto o erro sistemático varia de modo previsível ou se mantém constante nas mesmas análises. Além disso, os erros humanos, bem como o mal funcionamento de um instrumento, levam a erros grosseiros, que podem invalidar a medição ¹.

A qualidade dos resultados analíticos é muitas vezes garantida por meio da acreditação ISO 17025, ou controle de qualidade interno, validação de métodos analíticos e/ou testes de proficiência ¹. O teste de proficiência (TP) é uma ferramenta útil para avaliar o desempenho de métodos analíticos, quando os itens de teste no TP são razoavelmente semelhantes aos da rotina e o número de rodadas e de laboratórios participantes são grandes o suficiente. O TP pode ser usado para avaliar a IM de um método analítico bem estabelecido, no entanto, é mais acessível avaliar a IM a partir de dados da validação quando um método analítico desenvolvido internamente é utilizado [1].

Os métodos analíticos empregados no controle de qualidade de medicamentos devem ser validados de acordo com guias nacionais e internacionais ⁴³⁻⁴⁵. Porém, a IM não é um parâmetro obrigatório nesses guias, mesmo podendo ser estimada facilmente a partir dos dados de validação, representando uma combinação de erro sistemático (exatidão) e aleatório (precisão) ^{62,65}. Mesmo que um método analítico atenda aos critérios exigidos, ele pode apresentar limitações de desempenho que podem levar a aprovação de um lote fora de especificação (risco do consumidor) ou a reprovação de um lote dentro de especificação (risco do produtor) ^{7,51}.

As consequências desses riscos na área farmacêutica podem afetar negativamente diversos aspectos importantes. O risco do consumidor pode levar a pacientes receberem medicamentos, como antibióticos e antifúngicos, com concentrações erradas, então além de não tratar a infecção que os aflige, pode causar resistência microbiana, um problema mundial de saúde pública ⁶⁶. Por outro lado, o risco do produtor culmina em perda de tempo na indústria, custos desnecessários, e até mesmo descartes desnecessários, gerando um impacto ambiental que poderia ser evitado ⁶⁷.

Tais riscos podem ser estimados com base na IM do método, sendo assim, essa abordagem ajuda na tomada de decisão baseada em análise de riscos, a fim de garantir métodos e resultados confiáveis ⁵¹. O método de Monte Carlo (MCM) é uma ferramenta útil capaz de gerar processos aleatórios com todas as propriedades necessárias para

estimar os riscos, que também estão relacionados com a capacidade do processo (de produzir lotes conforme) e com a faixa de especificação do produto ^{68,69}.

A cromatografia líquida é uma das principais técnicas utilizadas em métodos de controle de qualidade na área farmacêutica, e apesar de ser uma técnica de separação versátil, possui um número considerável de variáveis, na separação, detecção, integração, etc. (como fases móvel e estacionária, comprimento de onda, parâmetros de integração, entre outras), que podem contribuir no valor de incerteza final ⁷⁰.

Dentre os métodos de quantificação de medicamentos, se destacam os destinados às classes de antibióticos e antifúngicos, que representam uma parte considerável da indústria e comércio de medicamentos, combatendo inúmeras bactérias e fungos causadores de doenças infecciosas. Portanto, é de extrema importância a garantia de um tratamento com dosagem correta, caso contrário é possível selecionar e favorecer linhagens de bactérias e fungos resistentes, dificultando a cura de diversas infecções ⁷¹.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de métodos analíticos de cromatografia líquida utilizados para a quantificação de antibióticos ou antifúngicos em preparações farmacêuticas. Para tal, os valores de IM foram avaliados utilizando uma abordagem *top-down* (a partir dos dados de validação), e o MCM foi utilizado para estimar os riscos do consumidor e do produtor considerando diferentes cenários de capacidade de processo produtivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estratégias de busca

Foi realizada busca de artigos científicos que tratavam do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de princípios ativos (particularmente antibacterianos e antifúngicos) em diversas formas farmacêuticas (tais como comprimidos, cápsulas, soluções injetáveis, pós para injetáveis, cremes, dentre outras), utilizando como técnica analítica a cromatografia líquida.

As estratégias de busca incluíram os seguintes descritores principais: *antibiotic OR antibacterial OR antifungal AND liquid chromatography AND method validation*. Quando necessário, outros descritores foram adicionados para facilitar a busca, como:

AND *pharmaceutical formulation*, NOT *milk*, NOT *food*, NOT *blood*, NOT *urine*, NOT *manure*, NOT *water*, NOT *muscle*, NOT *egg*.

A busca teve como foco publicações de 2012 a 2016 em periódicos indexados em diferentes bases de dados, principalmente *Web of Science*, *Scopus* e *Science Direct*. Alguns artigos foram obtidos pelas referências dos encontrados e outros já haviam sido separados pelo grupo de pesquisa. Os artigos incluídos no presente estudo deveriam possuir pelo menos os dados de exatidão e precisão ou IM estimada e estarem publicados em português ou em inglês.

2.2. Estimativa da incerteza de medição

As estimativas de IM foram realizadas utilizando abordagem *top-down*. Os valores encontrados para exatidão e precisão nos dados de validação foram utilizados para calcular a IM dos métodos, conforme Equações 1 e 2 ⁶⁵.

Equação 1 – Incerteza padrão combinada.

$$u_c = \sqrt{u_e^2 + u_p^2} \quad (1)$$

Equação 2 – Incerteza expandida.

$$U = u_c \cdot k \quad (2)$$

Onde: u_c = incerteza padrão combinada; u_e = exatidão (%), calculada como $|100 - \text{Recuperação}|$; u_p = precisão (%), calculada como o desvio padrão; U = incerteza expandida e k = fator de abrangência (usualmente 2, para um nível de confiança de 95%) ¹.

A contribuição individual dos parâmetros exatidão e precisão para o valor de incerteza final também foi estimada. Além disso, possíveis relações entre valores de IM e formas farmacêuticas foram observadas.

Adicionalmente, foi calculada a razão entre a incerteza de medição e faixa de especificação (U/T%), conforme Equação 3 ⁴⁷.

Equação 3 – Razão entre incerteza de medição e faixa de especificação.

$$U/T \% = \frac{2.U}{(UL-LL)} \quad (3)$$

Onde: U = incerteza expandida; UL = limite de especificação superior e LL = limite de especificação inferior. Neste trabalho, foram consideradas faixas de 90 a 110% e de 95 a 105% ⁷².

2.3. Simulações de Monte Carlo

Foram simulados quatro cenários de processo produtivo, cada um para duas faixas de especificação, uma mais ampla (90-110%) e outra mais restritiva (95-105%), tendo-se ao final, oito cenários. Os parâmetros selecionados para as simulações dos processos produtivos foram tais para que diferentes valores de índice de capacidade de processo (Cpk – Equação 4) fossem obtidos (Tabela 1) ⁷³.

Equação 4 – Índice de capacidade de processo.

$$Cpk = \min \left[\frac{UL-\mu}{3.\sigma}; \frac{\mu-LL}{3.\sigma} \right] \quad (4)$$

Onde: Cpk = índice de capacidade de processo; UL = limite de especificação superior; LL = limite de especificação inferior; μ = média (%) e σ = desvio padrão (%) do processo.

Tabela 1 – Parâmetros das simulações dos cenários de processo produtivo.

Cenários	Média (%)	Desvio padrão (%)	Faixa de especificação (%)	Cpk
1	100	2	90-110	1,67
2	100	2	95-105	0,83
3	100	3	90-110	1,11
4	100	3	95-105	0,56
5	98	2	90-110	1,33
6	98	2	95-105	0,50
7	98	3	90-110	0,89
8	98	3	95-105	0,33

Cpk = índice de capacidade de processo.

As simulações foram realizadas no software estatístico Minitab® versão 18 (State College, Pennsylvania). Foram geradas simulações de 100.000 lotes por processo (distribuição prévia), assumindo uma distribuição normal, com média e desvio padrão conforme a Tabela 1. Então, foram geradas simulações de 100.000 valores com uma distribuição normal, média 0 e desvio padrão igual à incerteza padrão combinada de cada método analítico (simulação intermediária). Os resultados simulados das medições foram obtidos somando os valores gerados para a distribuição prévia com os valores gerados na simulação intermediária. Este procedimento foi repetido para cada incerteza padrão combinada dos métodos analíticos (64 ao total), considerando os valores obtidos para os lotes de cada processo.

A partir disso, pode-se confrontar os valores obtidos pelas simulações dos lotes com as dos resultados dos métodos, obtendo-se tabelas descritivas com as frequências de cada caso (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência dos teores dos lotes (fora vs. dentro de especificação) e resultados analíticos dos métodos (reprovado vs. aprovado).

Teor do lote simulado	Resultado analítico simulado		
	Reprovado	Aprovado	Total
Fora de especificação	d	c	d+c
Dentro de especificação	b	a	b+a
Total	d+b	c+a	d+c+b+a

a = lotes corretamente aprovados; b = lotes erroneamente reprovados; c = lotes erroneamente aprovados; d = lotes corretamente reprovados; c+a = total de lotes aprovados; d+b = total de lotes reprovados; d+c = total de lotes fora de especificação; b+a = total de lotes dentro de especificação e d+c+b+a = total de lotes simulados.

2.4. Estimativa dos riscos do consumidor e do produtor

Os riscos globais (Equações 5 e 6) e condicionais (Equações 7 e 8) do consumidor e do produtor foram estimados a partir dos resultados obtidos com as simulações de Monte Carlo, empregando-se a abordagem Bayesiana ³⁶.

Equação 5 – Risco global do consumidor.

$$R_c(\%) = \frac{c}{(d+c+b+a)} \quad (5)$$

Equação 6 – Risco global do produtor.

$$R_p(\%) = \frac{b}{(d+c+b+a)} \quad (6)$$

Onde: R_c = risco global do consumidor; c = lotes erroneamente aprovados; $d+c+b+a$ = total de lotes simulados; R_p = risco global do produtor e b = lotes erroneamente reprovados.

Equação 7 – Risco condicional do consumidor.

$$R'_c(\%) = \frac{c}{(a+c)} \quad (7)$$

Equação 8 – Risco condicional do produtor.

$$R'_p(\%) = \frac{b}{(d+b)} \quad (8)$$

Onde: R'_c = risco condicional do consumidor; c = lotes erroneamente aprovados; $a+c$ = total de lotes aprovados; R'_p = risco condicional do produtor; b = lotes erroneamente reprovados e $d+b$ = total de lotes reprovados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 42 artigos científicos dentro dos parâmetros estabelecidos, dos quais foram obtidos 64 valores de IM (Tabela 3). A maior parte desses valores (56) foram estimados no presente estudo utilizando abordagem *top-down*, baseada na precisão e exatidão dos métodos analíticos (Figura 1). Apenas 8 métodos analíticos apresentavam valores de IM estimados pela abordagem *bottom-up*, como método da planilha de Kragten, simulações de Monte Carlo ou pelo procedimento de propagação de incerteza do guia Eurachem/Citac (Figura 2).

Comparado a esses outros métodos de estimativa da IM, o método empregado neste trabalho é simples e rápido, porém não permite a identificação e quantificação das fontes de incertezas individuais que contribuem para a IM total, o que seria útil para estabelecer estratégias para reduzir a IM. Estudos anteriores demonstraram que valores de IM obtidos por diferentes abordagens são comparáveis entre si ^{27,41}, porém em dois casos em que foi possível comparar as incertezas estimadas pelos dados de validação com as por outros métodos, as primeiras se apresentaram maiores.

Tabela 3 – Resumo dos métodos analíticos avaliados e suas incertezas padrão.

Continua					
Substância / Classe terapêutica	Forma farmacêutica / ID	Faixa de trabalho	Rec. / Precisão	Incerteza padrão combinada ^a	Ref.
Cloridrato de Besifloxacino / Antibacteriano	Suspensão oftálmica / 1.1	1-6 µg.mL ⁻¹	100,4% / 4,3%	4,32%	74
Tigeciclina / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 2.1	40-100 µg.mL ⁻¹	99,01% / 1,48%	1,78%	75
Doripenem / Antibacteriano	Pó para injetável / 3.1	5-50 µg.mL ⁻¹	100,43% / 1,19%	1,27%	76
Cefazolina / Antibacteriano	Pó para injetável / 4.1	35-67 µg.mL ⁻¹	N.D.	2,7% ^c	77
Fluconazol / Antifúngico	Cápsula / 5.1	240-1200 µg.mL ⁻¹	101,1% / 1.96%	2,25%	78
Moxifloxacino / Antibacteriano	Comprimido e solução oftálmica / 6.1; 6.2	0.125-16 µg.mL ⁻¹	102,8% / 1,83%; 100,66% / 0,66%	3,34%; 0,93%	79
Cefditoreno / Antibacteriano	Comprimido / 7.1	1-250 µg.mL ⁻¹	99,51% / 0,51%	0,71%	80
Plazomicina / Antibacteriano	Pó para injetável / 8.1	2.5–3000 µg.mL ⁻¹	100,4% / 0,83%	0,92%	81
Ampicilina / Antibacteriano	Pó para injetável e para suspensão oral / 9.1; 9.2	20-30 µg.mL ⁻¹	1,43% / 1,43%; 3,74% / 4,71%	2,02%; 6,01%	82
Amoxicilina / Antibacteriano	Solução oleosa para injetável / 9.3	20-30 µg.mL ⁻¹	1,72% / 2,72%	3,22%	82
Metronidazol / Antibacteriano	Solução para injetável / 10.1	100-310 µg.mL ⁻¹	N.D.	1,75% ^b	25
Hiclato de Doxiciclina / Antibacteriano	Comprimido / 11.1	50-100 µg.mL ⁻¹	100,33% / 1,10%	1,15%	83
Tobramicina / Antibacteriano	Solução oftálmica / 12.1	0.5-60 µg.mL ⁻¹	99,7% / 0,6%	0,67%	84
Ceftibuteno / Antibacteriano	Cápsula / 13.1	50-150 µg.mL ⁻¹	99,94% / 0,2114%	0,22%	85
Cloridrato de Ceftiofur / Antibacteriano	Bulk / 14.1	50-150 µg.mL ⁻¹	100,02% / 0,32%	0,32%	86
Ceftriaxona / Antibacteriano	Pó para injetável / 15.1	160-480 µg.mL ⁻¹	99,8% / 0,69%	0,72%	87
Sulbactam / Antibacteriano	Pó para injetável / 15.2	80-240 µg.mL ⁻¹	101,0% / 0,40%	1,08%	87
Griseofulvina / Antifúngico	Comprimido / 16.1	125-750 µg.mL ⁻¹	100,4% / 0,1%	0,41%	88
Itraconazol / Antifúngico	Cápsula / 17.1	20-500 µg.mL ⁻¹	103,5% / 0,2%	3,51%	89

Continuação da Tabela 3

Substância / Classe terapêutica	Forma farmacêutica / ID	Faixa de trabalho	Rec. / Precisão	Incerteza padrão combinada ^a	Ref.
Cloridrato de Terbinafina / Antifúngico	Creme / 18.1	5-15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,43% / 2,6%	2,64%	90
Geraniol / Antifúngico	Gel / 19.1	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,4% / 1,01%	1,17%	91
Neral / Antifúngico	Gel / 19.2	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	91,1% / 10,12%	13,48%	91
Geraniol / Antifúngico	Gel / 19.3	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	90,2% / 11,24%	14,91%	91
Fluconazol / Antifúngico	Gel / 19.4	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,8% / 2,10%	2,11%	91
Miconazol / Antifúngico	Gel / 19.5	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	98,9% / 1,09%	1,55%	91
Terbinafina / Antifúngico	Gel / 19.6	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	101,6% / 1,57%	2,24%	91
Butenafina / Antifúngico	Gel / 19.7	1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,2% / 0,84%	0,86%	91
Caspofungina / Antifúngico	Pó liofilizado para injetável / 20.1; 20.2	20-80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	98,74% / 1,79%	2,19%; 1,44% ^b ; 1,45% ^d	30
Ciprofloxacino / Antibacteriano	Solução oftálmica / 21.1; 21.2	N.D.	N.D.	1,3% ^b (genérico) 1,5% ^b (marca)	92
Metronidazol / Antibacteriano	Solução para injetável / 22.1	N.D.	N.D.	1,75%	93
Meropenem / Antibacteriano	Pó para injetável / 22.2	N.D.	N.D.	1,85%	93
Besifloxacino / Antibacteriano	Suspensão oftálmica / 23.1	20-80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	101,0% / 1,41%	1,73%	94
Azitromicina / Antibacteriano	Matéria-prima e cápsula / 24.1; 24.2	50,93-509,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,6% / 0,9%; 100,5% / 1,4%	1,08%; 1,49%	95
Azitromicina / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável e comprimido / 24.3; 24.4	50,93-509,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,4% / 0,9%; 101,3% / 1,2%	0,98%; 1,77%	95
Meropenem / Antibacteriano	Pó para injetável / 25.1	50-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	98,85% / 1,07%	1,57%	96
Sulbactam sódico / Antibacteriano	Pó para injetável / 25.2	25-125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	98,63% / 0,74%	1,56%	96
Cefazolina sódica / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 26.1	30-80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,37% / 1,17%	1,23%	97

Continuação da Tabela 3

Substância / Classe terapêutica	Forma farmacêutica / ID	Faixa de trabalho	Rec. / Precisão	Incerteza padrão combinada ^a	Ref.
Cefalotina / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 27.1	250-750 µg.mL ⁻¹	99,41% / 0,547%	0,80%	98
Daptomicina / Antibacteriano	Pó para injetável / 28.1	10-50 µg.mL ⁻¹	99,17% / 0,59%	1,02%	99
Cloridrato de Terbinafina / Antifúngico	Comprimido / 29.1	1-80 µg.mL ⁻¹	0,30% / 0,33%	0,45%	100
Cloridrato de Terbinafina / Antifúngico	Creme / 30.1	20-200 µg.mL ⁻¹	101,18% / 1,31%	1,76%	101
Cetoconazol / Antifúngico	Comprimido / 31.1	10-60 µg.mL ⁻¹	99,8% / 0,46%	0,50%	102
Beauvericina / Antifúngico	Comprimido / 31.2	10-60 µg.mL ⁻¹	99,7% / 0,70%	0,76%	102
Linezolida / Antibacteriano	Solução para injetável / 32.1; 32.2	8-12 µg.mL ⁻¹	98,61% / 0,66%	1,54%; 1,25% ^b ; 1,23% ^d	32
Gatifloxacino / Antibacteriano	Comprimido, solução oftálmica e nanopartícula lipídica sólida / 33.1	4-40 µg.mL ⁻¹	100,11% / 1,242%	1,25%	103
Daptomicina / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 34.1	20-70 µg.mL ⁻¹	99,98% / 1,44%	1,44%	104
Ácido Fusídico / Antibacteriano	Creme / 35.1	5-95 µg.mL ⁻¹	101,22% / 0,98%	1,56%	105
Griseofulvina / Antifúngico	Comprimido / 36.1	0,1-1,2 µg.mL ⁻¹	99,81% / 1,6%	1,61%	106
Amoxicilina / Antibacteriano	Cápsula, comprimido e pó para injetável / 37.1	0,0002-0,01 µg.mL ⁻¹	99,62% / 2,17%	2,20%	107
Cloranfenicol / Antibacteriano	Solução oftálmica, pomada e pó para injetável / 37.2	0,0002-0,01 µg.mL ⁻¹	99,05% / 2,14%	2,34%	107
Ofloxacino ((R) e (S)-enantiômeros) / Antibacteriano	N.D. / 38.1; 38.2	0,005-0,35 µg.mL ⁻¹	98,02% / 3,05%; 97,78% / 3,34%	3,64%; 4,01%	108
Cloridrato de Cefepima / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 39.1	10-70 µg.mL ⁻¹	100,08% / 0,43%	0,44%	109

Conclusão da Tabela 3

Substância / Classe terapêutica	Forma farmacêutica / ID	Faixa de trabalho	Rec. / Precisão	Incerteza padrão combinada^a	Ref.
Ertapenem sódico / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 40.1	40-140 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,81% / 2,04%	2,05%	¹¹⁰
Ertapenem sódico / Antibacteriano	Pó liofilizado para injetável / 40.2	70-120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,18% / 0,06%	0,82%	¹¹⁰
Doripenem / Antibacteriano	Pó para injetável / 41.1	5-40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	100,68% / 1,40%	1,56%	¹¹¹
Pristinamicina / Antibacteriano	Comprimido / 42.1	25-150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	99,43% / 0,64%	0,86%	¹¹²

ID = identificação de cada incerteza padrão combinada; Rec. = recuperação; Ref. = referência dos artigos; N.D. = não disponível; ^a estimado com base nos resultados de validação do método (exatidão e precisão); ^b estimado com base no guia Eurachem/Citac (propagação de incerteza) ou método da planilha de Kragten; ^c estimado com base no erro da curva de calibração, ^d estimado com base em simulações de Monte Carlo.

Figura 1 – Contribuição da precisão e exatidão na incerteza expandida dos métodos analíticos aplicados às seguintes formas farmacêuticas: (A) pós para suspensão oral ou injetáveis; (B) cápsulas e comprimidos; (C) soluções, suspensões e outros, e (D) creme, gel e pomada. O tracejado (2,5%) representa a incerteza alvo de acordo com guia da Eurachem/Citac ⁶⁴.

Figura 2 – Incertezas de medição estimadas por outros métodos. O tracejado (2,5%) representa a incerteza alvo de acordo com guia da Eurachem/Citac ⁶⁴.

Nos casos em que os valores de IM foram estimados com base na precisão e exatidão dos métodos, foi verificada a contribuição individual desses dois parâmetros para a IM final (Figura 1). Em sua maioria (73%), a precisão foi o parâmetro crítico, chegando a contribuir em cerca de até 100% para a IM final. Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, a precisão também se mostrou como fator crítico ²⁷. Isso pode ser devido à precisão ser um parâmetro associado ao tipo de erro aleatório, que pode surgir de variações temporais e espaciais imprevisíveis ou aleatórias, causando variações nas observações repetidas do mensurando, e podendo ser reduzido pelo aumento do número de determinações ⁶¹. Além disso, sempre que possível, a precisão intermediária foi a utilizada para estimativa da IM neste estudo, na qual são consideradas mais fontes de variabilidade (diferentes analistas, instrumentos e/ou dias de análise) quando comparada às condições de repetibilidade ⁴³.

A exatidão geralmente é realizada por meios de recuperação de uma quantidade conhecida do analito. A diferença entre o valor conhecido e valor experimental pode ser insignificante ou considerável para fins de correção. Essa correção poderia ser aplicada a cada resultado analítico do método, sem interferir na IM do mesmo, porém ainda não há um consenso quanto ao uso dessa correção entre guias e autores ¹¹³. Neste trabalho, a exatidão foi incluída na estimativa da IM de tal modo em que os resultados não seriam corrigidos, estando essa diferença já considerada no cálculo da IM ⁶², o que pode levar a uma superestimação do valor da IM naqueles casos em que essa diferença for significativa. Ainda assim, na maior parte dos casos, a principal contribuição para a IM final foi dada pela precisão dos métodos, como discutido acima.

Foram encontradas cerca de 10 diferentes formas farmacêuticas entre os métodos, que para melhor visualização dos resultados, foram separadas de acordo com suas similaridades em 4 grupos: pós para suspensão oral ou injetáveis; cápsulas e comprimidos; soluções, suspensões e outros; e creme, gel e pomada (Figura 1). Com isso, pode-se observar que os métodos analíticos para formas farmacêuticas que requerem mais etapas no preparo de amostra (como creme, gel ou pomada) apresentaram um maior número de valores de IM acima do recomendado quando comparados aos métodos para outras formas farmacêuticas. Isso faz sentido, uma vez que quanto mais etapas, mais fontes de incerteza um método apresenta.

Foi notado que os métodos que tratam de compostos isômeros possuíram valores altos de IM (dos 11 valores de IM maiores que 5%, 6 os representavam). Isso também pode ser devido à necessidade de mais etapas de preparo, e consequentemente mais

fontes de incerteza, ou à maior dificuldade na separação desses compostos, ou até apontam uma necessidade de um método mais adequado a esses compostos.

Houve uma grande variação entre as IM estimadas (Figuras 1 e 2), dentre elas, a mais baixa foi 0,44% e a mais alta 29,82%, isso quer dizer que um resultado obtido por este último método teria uma variabilidade maior do que uma especificação de 90 a 110%.

Com os valores de IM, pode-se calcular a razão entre a IM de cada método analítico e as faixas de especificação. Dos métodos avaliados, mais da metade possuía essa razão acima de 25% (Tabela 4). Portanto, a maioria dos métodos analisados apresentou seu desempenho na avaliação da conformidade comprometido para as faixas de especificação.

Tabela 4 – Métodos analíticos de acordo com seus valores de U/T% para faixas de especificação de 90-110% e 95-105%.

Métodos avaliados		
U/T%	90-110%	95-105%
≤ 10	6 (9,4%)	1 (1,6%)
11-25	20 (31,3%)	5 (7,8%)
> 25	38 (59,4%)	58 (90,6%)

U/T% = razão entre incerteza de medição e faixa de especificação.

Diferentes guias de validação foram utilizados dentre os artigos selecionados, tais como: guias do ICH (*International Conference on Harmonization*), FDA (*Food and Drug Administration*), farmacopeias, publicações da ANVISA e INMETRO, entre outros. Mesmo atendendo aos parâmetros de validação, a maioria dos métodos avaliados não podem ser considerados com desempenho adequado para avaliação da conformidade, devido aos altos valores de U/T%, tendo sua aplicabilidade para o dia a dia numa rotina de análises comprometida. Isso demonstra a importância de se considerar a IM como um parâmetro de validação de métodos analíticos, particularmente para métodos cromatográficos. Adicionalmente, a IM pode ser utilizada para estimar os riscos de decisão errada na avaliação da conformidade ³⁶.

Os histogramas obtidos a partir das simulações de Monte Carlo considerando os diferentes cenários de processo produtivo são mostrados na Figura 3. A média, desvio padrão (DP) e faixa de especificação influenciam os valores de Cpk dos processos produtivos. Deste modo, foram obtidos cenários em que uma parte significativa dos lotes simulados ficou fora de especificação (Cpk 0,33; 0,50; 0,56; 0,83 e 0,89), um cenário minimamente capaz de produzir lotes dentro de especificação (Cpk 1,11), e cenários capazes de produzir lotes dentro de especificação (Cpk 1,33 e 1,67) ^{114 115}.

Figura 3 – Histogramas das simulações de Monte Carlo para distribuição prévia. Os tracejados delimitam as faixas de especificação para os cenários 1, 3, 5 e 7 (90-110%) e para os cenários 2, 4, 6 e 8 (95-105%). (A) cenários 1 (Cpk 1,67) e 2 (Cpk 0,83), média = 100% e DP = 2%; (B) cenários 3 (Cpk 1,11) e 4 (Cpk 0,56), média = 100% e DP = 3%; (C) cenários 5 (Cpk 1,33) e 6 (Cpk 0,50), média = 98% e DP = 2%; (D) cenários 7 (Cpk 0,89) e 8 (Cpk 0,33), média = 98% e DP = 3%. Onde: Cpk = índice de capacidade de processo e DP = desvio padrão.

Os cenários que apresentaram mais lotes fora de especificação foram aqueles com faixa de especificação mais restrita, deslocados do alvo da especificação (descentralizados) e com maior DP. Por outro lado, os cenários em que os lotes

estiveram dentro de especificação foram aqueles com faixa de especificação mais ampla, centralizados em relação ao alvo da especificação e com menor DP.

Os riscos foram estimados utilizando-se a abordagem Bayesiana, a partir dos valores das simulações dos teores dos lotes e resultados dos métodos. Essa abordagem depende de uma informação prévia, no caso, as características dos processos produtivos (distribuição prévia). Uma forma de calcular os riscos sem conhecimento prévio do processo produtivo seria pela abordagem frequentista ¹¹⁶. Utilizando abordagem frequentista, o risco de tomada de decisão é estimado com base no resultado analítico e sua IM, considerando os limites de especificação.

Os riscos globais e condicionais do consumidor e do produtor foram estimados para cada método analítico. Deste modo, foi possível obter os riscos para duas situações. Os riscos globais são estimados para qualquer lote a ser testado, independentemente do resultado analítico futuro, e os riscos condicionais consideram em sua estimativa o resultado futuro do lote a ser testado (aprovado ou reprovado).

Sendo assim, um risco global do produtor de 15,96% significa que essa é a probabilidade de se reprovar um lote erroneamente. Enquanto 79,07% de risco condicional do produtor significa que um lote que for reprovado tem 79,07% de chance de, na verdade, estar dentro de especificação. Esses valores de riscos foram encontrados para um dos métodos avaliados neste trabalho. Para este mesmo caso (Cpk 0,50), os riscos do consumidor foram 2,5% (global) e 3,14% (condicional).

Os riscos condicionais se apresentaram maiores do que os respectivos riscos globais (Figuras 4 e 5). Isso faz sentido uma vez que o fator em que se leva em consideração no cálculo para esses riscos é o resultado futuro aprovado ou reprovado, e não o total de lotes simulados, como no caso dos riscos globais (Equações 5, 6, 7 e 8).

Figura 4 – Riscos globais do consumidor (R_c) e do produtor (R_p) de acordo com a razão entre incerteza de medição e faixa de especificação ($U/T\%$) para diferentes índices de capacidade de processo (C_{pk}).

Figura 5 – Riscos condicionais do consumidor (R'_c) e do produtor (R'_p) de acordo com a razão entre incerteza de medição e faixa de especificação ($U/T\%$) para diferentes índices de capacidade de processo (Cpk).

Os gráficos foram ajustados de modo a apresentarem valores de U/T% de até 100% (Figuras 4 e 5), pois valores acima disso correspondem a uma variabilidade de resultado maior do que as faixas de especificação. No entanto, essa condição foi encontrada em 14 casos nesse estudo. Além disso, a maioria dos métodos analíticos possuía U/T% acima do recomendado.

É importante ressaltar que cada ponto dos gráficos de dispersão representando o valor de um risco foi calculado a partir da simulação de 100.000 lotes e resultados (Figuras 4 e 5). Além disso, as simulações dos resultados dos métodos foram obtidas a partir de valores de IM reais dos métodos analíticos, portanto, os riscos mencionados caracterizam o desempenho dos métodos quanto à avaliação da conformidade, considerando os diferentes cenários dos processos produtivos.

Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, os riscos globais de um método de cromatografia líquida para quantificação de amoxicilina foram estimados, obtendo valores de 0,28% (consumidor) e 2,34% (produtor). Este método não foi considerado adequado ao seu propósito quanto ao valor de incerteza de medição alvo ³⁶. No presente estudo, foram encontrados valores de risco global superiores para a maioria dos casos (Figuras 4 e 5).

As Figuras 4 e 5 podem ser usadas para prever os riscos de acordo com U/T% do método e Cpk do processo. Por exemplo, considerando $U/T\% = 42,2\%$ e $Cpk = 0,79$, o risco global do produtor estaria próximo a 2% e do consumidor próximo a 0,4%. Os riscos obtidos pelos gráficos são comparáveis aos estimados no trabalho precedente, 2,34% e 0,28%, respectivamente ³⁶. Pequenas diferenças são esperadas devido ao número de simulações realizadas pelo MCM.

Quanto aos métodos analisados, foi notado que quanto maior U/T%, maiores os riscos dentro de cada cenário. Como a maioria dos métodos possuía essa razão acima do recomendado, a maioria dos métodos avaliados apresentaram valores de risco altos. Também foi notado que quanto maior o Cpk, menor o risco do consumidor em relação ao do produtor, pois o número de lotes dentro de especificação serão maiores, independente do resultado do método (ou seja, se um lote for reprovado haverá mais chances de na verdade estar dentro de especificação, além de ter mais chances de ser aprovado corretamente).

Usualmente, são recomendados riscos do consumidor e do produtor abaixo de 5% ou 1% ¹¹⁷. É importante reconhecer esses riscos e ter algum plano de ação para reduzi-los sempre que possível, a fim de aumentar a qualidade dos métodos e sua

aplicabilidade na avaliação da conformidade, proporcionando maior confiabilidade aos resultados medidos.

Para redução dos riscos, sugerimos ter um controle efetivo do processo na indústria, para produção de lotes dentro de especificação, além de melhorar o sistema de medição, incluindo a IM como parâmetro na validação de métodos, com foco em limites recomendados ⁶⁴. O *Analytical Quality by Design* é uma ferramenta útil para otimização de métodos, pois estipula os critérios que o método deve atender no início de seu desenvolvimento, como IM alvo ⁵⁰.

Por fim, esperamos que mais trabalhos sejam feitos no âmbito de estimativa de IM e riscos em outros métodos já validados da área farmacêutica, e no desenvolvimento de novos métodos analíticos. Para maior conhecimento sobre os riscos do consumidor e produtor, a abordagem frequentista também pode ser utilizada, além de estudos que levem em consideração riscos totais, ou seja, os riscos relacionados a todas as determinações de controle de qualidade de um produto, além da quantificação de princípios ativos.

4. CONCLUSÃO

Os valores de precisão e exatidão afetam diretamente a incerteza de medição, e a maioria dos métodos analíticos avaliados mostrou a razão entre incerteza de medição e faixa de especificação acima dos valores recomendados. Altos valores de incerteza de medição comprometem o desempenho dos métodos analíticos na avaliação da qualidade, segurança e eficácia de medicamentos.

Com base na incerteza de medição e método de Monte Carlo, foi possível estimar os riscos do consumidor e do produtor relacionados aos métodos analíticos. Mesmo se tratando de métodos validados, a maioria não se apresentou adequada ao seu propósito. Sendo assim, este trabalho fundamenta a importância de se considerar a incerteza de medição como parte da validação de métodos analíticos, e a estimativa de riscos de tomada de decisão a fim de se obter métodos confiáveis para aplicação em rotinas de avaliação da conformidade.

Esta parte do trabalho foi publicada, conforme Anexo 1-c.

PARTE 2: Abordagem frequentista para estimativa de riscos de decisão de conformidade com base na incerteza de medição de métodos de cromatografia líquida

5. INTRODUÇÃO

Os resultados analíticos são utilizados como base para tomadas de decisão da conformidade. Porém, a fim de garantir a confiabilidade desses resultados, deve-se levar em consideração suas incertezas de medição (IM), pois valores de IM acima do recomendado podem levar a tomadas de decisão de conformidade equivocadas, como aprovação de um lote fora de especificação (risco do consumidor), ou reprovação de um lote dentro de especificação (risco do produtor). Estes riscos podem ser globais, condicionais ou específicos ^{1,36,118,119}.

Os riscos globais e condicionais são aqueles representativos de um item ou lote ainda não testado, diferindo pelos riscos condicionais considerarem em sua estimativa o resultado futuro ser dado como “aprovado” ou “reprovado” ¹¹⁹. Já os riscos específicos são considerados para um valor de resultado analítico de um item ou lote testado ¹²⁰.

Os riscos globais, condicionais e específicos podem ser estimados pela abordagem Bayesiana, em que se faz necessário ter um conhecimento prévio, como características do processo produtivo e histórico de produção, além da incerteza de medição e faixa de especificação, e no caso dos riscos específicos, também do resultado analítico. Essa abordagem é particularmente útil em indústrias, onde há o conhecimento da produção ¹¹⁹.

Os riscos específicos também podem ser estimados pela abordagem frequentista, que é baseada apenas no valor do resultado analítico, incerteza de medição e faixa de especificação, sendo uma abordagem útil para laboratórios prestadores de serviço ou de vigilância, não havendo necessidade de conhecimento prévio do processo produtivo ¹²⁰.

A IM e consequentemente os riscos de tomada de decisão estão presentes em qualquer resultado analítico quantitativo. Sendo assim, essas abordagens podem ser aplicadas para diversas análises, como de poluentes ambientais ¹²¹, de álcoois desnaturados ¹¹⁸, da potência de antibiótico por métodos microbiológicos ¹²⁰, e análises quantitativas de fármacos por métodos cromatográficos, especialmente cromatografia líquida, por ser uma das principais técnicas utilizadas para quantificação de fármacos e outros compostos, impurezas e produtos de degradação ^{36,37}.

Nosso grupo de pesquisa tem investigado o papel da incerteza de medição e estimativa dos riscos de tomada de decisão da conformidade na avaliação de métodos analíticos, estimando riscos globais e específicos em método microbiológico, e riscos globais e/ou condicionais em métodos cromatográficos ^{36,119,120}.

É importante conhecer os diversos tipos de riscos de tomada de decisão e as diferentes abordagens para estimá-los, a fim de compreender qual a melhor aplicação de cada tipo de risco e de sua abordagem de estimativa.

Portanto, para complementar esse conhecimento e ser possível entender melhor a aplicação desses riscos, o presente trabalho teve como objetivo estimar o risco específico do consumidor e do produtor a partir dos valores de IM de 64 métodos de cromatografia líquida para quantificação de antibióticos ou antifúngicos, a fim de avaliar suas performances na avaliação da conformidade. Para este fim, foram comparadas abordagens de estimativa desses riscos, com foco na frequentista.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Estimativa dos riscos específicos pela abordagem frequentista

Os riscos específicos foram estimados pela abordagem frequentista, utilizando o software Microsoft Excel[®].

Para isso, foram utilizados como base os valores de incerteza padrão combinada de cada um dos 64 métodos em avaliação, e as distâncias (delta) entre os possíveis valores de resultados analíticos e a faixa de especificação (90-110%). O delta pode ser obtido considerando as seguintes situações: se o resultado analítico (R) estiver posicionado no limite inferior (LL) ou limite superior (UL), $\text{delta} = 0$; se R estiver abaixo do centro da especificação (T) e for diferente do LL, $\text{delta} = |R - LL| / T - LL$; se R estiver acima do T e for diferente do UL, $\text{delta} = |R - UL| / UL - T$; se $R = T$, $\text{delta} = 1$. Neste trabalho consideramos resultados entre 80-120%.

Os riscos foram estimados assumindo uma distribuição normal, seguindo a fórmula “=DIST.NORM.N (x; média; desv_padrão; cumulativo)”; onde x = 0; média = delta; desv_padrão (desvio padrão) = incerteza padrão combinada; e cumulativo por considerar o intervalo de menos infinito até o ponto de interesse.

6.2. Planilha para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista

Como material suplementar, uma planilha foi criada no software Microsoft Excel®, com a finalidade de ser utilizada como base para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista (Anexo 2).

Os dados de entrada (*inputs*) da planilha são: o valor do resultado analítico, a incerteza expandida e seu fator de abrangência (*k*) correspondente, de acordo com o nível de confiança adotado, os limites de especificação e o risco máximo admissível, normalmente de 1 a 5% ¹²². A partir desses parâmetros, a planilha calcula a estimativa do risco específico de tomada de decisão de conformidade para um ensaio quantitativo de um lote ou item, além das *guard bands*.

Na coluna “Valores” estão configurados valores de resultados com base nos limites de especificação, de modo a sempre possuir valores abaixo do limite inferior até acima do limite superior.

Para estimativa dos riscos, foi assumida distribuição normal, de forma a calcular o risco do produtor quando o valor de resultado estiver fora de especificação, e o risco do consumidor quando o valor de resultado se encontrar dentro de especificação.

A probabilidade foi adquirida seguindo distribuição normal, em que x = linha da coluna “Valores” correspondente; média = resultado analítico (experimental); desvio padrão = incerteza padrão combinada; e não cumulativa por considerar somente cada ponto em questão.

A coluna “Frequência” foi criada para padronizar a visualização do gráfico, evitando que os valores de desvio padrão diminuam a altura do pico da curva. Isso foi obtido pela divisão das probabilidades pelo seu maior valor.

6.2.1. Validação da planilha de riscos específicos pela abordagem frequentista

A planilha de riscos específicos pela abordagem frequentista foi validada comparando-se os valores de risco obtidos na planilha com valores de risco obtidos pelo método de Monte Carlo. Este foi realizado utilizando um gerador aleatório com distribuição normal, assumindo como média o valor de resultado analítico e como desvio padrão o valor de incerteza padrão combinada. Os valores de risco obtidos pelo método de Monte Carlo foram estimados com base em 100.000 simulações. A validação da planilha foi realizada considerando diferentes cenários, variando os valores de resultados analíticos, de incerteza de medição e os limites de especificação.

6.3. Estimativa dos riscos globais pela abordagem Bayesiana

Os riscos também foram estimados utilizando abordagem Bayesiana, porém assumindo como informação prévia um cenário de processo produtivo uniforme, ou seja, que não apresenta maior tendência de lotes dentro ou fora de especificação (50% de chance de estarem dentro e 50% de chance de estarem fora de especificação). A faixa de especificação considerada foi de 90-110%.

Para tal, foi utilizado o método de Monte Carlo no software estatístico Minitab[®], onde 100.000 simulações de lotes de processo produtivo foram realizadas, seguindo uma distribuição uniforme com pontos extremos 80 e 120 (distribuição prévia).

Como simulação intermediária, foram geradas simulações de 100.000 valores com uma distribuição normal, média 0 e desvio padrão igual à incerteza padrão combinada de cada um dos 64 métodos analíticos avaliados neste estudo. Os resultados analíticos simulados foram obtidos pela adição dos valores gerados para a distribuição prévia com os valores gerados na simulação intermediária.

Então, os teores dos lotes simulados foram comparados com os resultados analíticos simulados, com relação aos que seriam considerados dentro ou fora de especificação. Com isso, os cálculos de estimativa dos riscos globais do consumidor e do produtor foram realizados seguindo o procedimento descrito no estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (Equações 5 e 6) ¹¹⁹.

6.4. Comparação dos riscos específicos estimados pelas abordagens Bayesiana e frequentista

Para fins de comparação, dois casos de riscos específicos também foram estimados pela abordagem Bayesiana, utilizando-se a planilha “UnCorrel4Risk.xlsm” oferecida como material suplementar de um estudo realizado por R.J.N.B. da Silva et al., para estimativa de riscos específicos, assumindo distribuição normal para a distribuição prévia e simulação intermediária ¹²³.

Para esta estimativa, foram realizadas 150.000 simulações de Monte Carlo com cadeia de Markov e algoritmo de Metropolis-Hasting (MCMC-MH), considerando distribuição prévia com média 100 e desvio padrão 3; simulação intermediária com média 87 para estimar risco do produtor e média 93 para estimar o risco do consumidor,

ambas com desvio padrão 2,64 (incerteza padrão combinada de um dos métodos avaliados neste estudo); faixa de especificação 90-110% e nível de confiança 95%.

Outros parâmetros, relacionados ao método MCMC-MH, foram utilizados para a estimativa dos riscos pela planilha: “*Start*”= 87 ou 93, “*Increment*”= 1,3, “*Burn-in period*”= 50 e “*Thinning interval*”= 3 ¹²³.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Estimativa dos riscos específicos pela abordagem frequentista

Os riscos específicos para cada método analítico foram estimados seguindo abordagem frequentista. A Figura 6 mostra os riscos específicos para cada U/T% (razão entre incerteza de medição e faixa de especificação) dos métodos avaliados, sendo possível relacionar com os deltas, ou distâncias, dos resultados com relação ao limite de especificação. Um método com valor de U/T% de até 25% é considerado adequado ao seu propósito analítico, da mesma forma que a incerteza expandida alvo deve ser 8 vezes menor do que a variação da faixa de especificação. É importante ressaltar que a incerteza expandida é aquela que acompanha o resultado analítico, e que ela é o produto da incerteza padrão combinada do método pelo fator de abrangência, para um determinado nível de confiança ^{1,64}.

Figura 6 – Riscos específicos de acordo com o U/T% (razão entre incerteza de medição e faixa de especificação) dos métodos analíticos avaliados (pontos no gráfico), para cada delta (distância entre possíveis resultados analíticos e faixa de especificação).

O risco específico será do produtor quando o resultado analítico estiver fora da faixa de especificação e parte de sua dispersão de valores se encontrar dentro de especificação, ou seja, esse lote tem o risco de ser reprovado estando na verdade dentro de especificação. Já o risco específico do consumidor pode ocorrer quando o resultado estiver dentro de especificação, porém parte de sua dispersão de valores se encontrar fora de especificação, ou seja, esse lote tem o risco de ser aprovado estando fora de especificação.

Apenas 39% dos métodos avaliados possuíam U/T% e IM dentro do recomendado. Para um método com IM 5,28%, resultados com deltas de 0,5 a 1 garantem riscos abaixo de 5%, já resultados com deltas de 0 a 0,4 apresentam riscos entre 6 e 50%. Para um método com IM 2,50% (alvo), resultados com deltas de 0,3 a 1 garantem riscos abaixo de 1%, já resultados com deltas de 0 a 0,2 apresentam riscos entre 5 e 50%. Ou seja, mesmo que a incerteza de medição esteja dentro do recomendado, quando o resultado se encontra próximo ao limite de especificação, o risco pode ser significativo. Nesses casos, uma estratégia é adotar *guard bands* para reduzir ou ampliar os limites de especificação na tomada de decisão da conformidade, minimizando assim os riscos ^{51,122,124}.

Considerando como *guard band* a incerteza padrão combinada multiplicada pelo fator de abrangência 1,64, isso garante 95% de chance de decisão correta. Desta forma, quando a *guard band* for utilizada para ampliar o limite de especificação, o risco do produtor será de até 5%, e quando reduzir o limite de especificação, o risco do consumidor será de até 5% ¹²².

Por exemplo, para um método com incerteza padrão combinada alvo (portanto, $guard\ band = 1.25\% \times 1.64 = 2.05\%$) e resultado analítico fora de especificação, a faixa de especificação de 90-110% passa a ser 87,95-112,05% e para um resultado analítico dentro de especificação, o limite de especificação de 90-110% passa a ser 92,05-107,95%. Resultados dentro do intervalo 87,95-92,05% ou 107,95-112,05% terão riscos acima de 5%.

Cabe ressaltar que nos casos de incerteza de medição muito acima do recomendado, essa estratégia pode ficar impraticável, pois o limite de especificação ficaria muito amplo ou muito restritivo.

Um valor alto de incerteza de medição aumentaria o risco de falsas decisões na avaliação da conformidade, o que aumenta o custo devido a decisões erradas. Por outro lado, quanto menor o valor de incerteza de medição, mais caro é o procedimento analítico, devido às técnicas analíticas mais sensíveis, aos reagentes analíticos de alta pureza, entre outros custos. O procedimento analítico de melhor custo-benefício deve considerar o valor de incerteza de medição e os custos analíticos ¹²⁵.

De qualquer forma, quanto menor o risco, mais segura será a tomada de decisão. Outras estratégias podem ser adotadas para reduzi-los de forma a garantir o melhor custo-benefício a longo prazo, como realizar retestes quando o resultado analítico se encontrar na região da *guard band*, realizar maior número de réplicas da amostra na rotina, ou diminuir a incerteza do método por meio de sua otimização, para tal, as ferramentas do *Analytical Quality by Design* podem ser particularmente úteis ⁵⁵.

Outra estratégia relatada na literatura é definir um intervalo de tolerância apropriado que garanta um risco reduzido de decisões falsas, e então realizar a validação do método para avaliar a adequação ao propósito do procedimento analítico ^{126,127}.

7.2. Planilha para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista

A partir da planilha criada como material suplementar para estimativa de riscos específicos (Anexo 2), são gerados dois gráficos considerando uma distribuição normal.

Um gráfico (Figura 7) mostra os riscos de tomada de decisão para um valor de IM, considerando valores de resultado dentro e fora dos limites de especificação, possibilitando verificar o risco de acordo com o resultado analítico obtido. Enquanto o segundo gráfico (Figura 8) mostra a dispersão de valores (incerteza) do resultado analítico obtido considerando os limites de especificação e *guard bands*, ficando visível como a IM pode influenciar a tomada de decisão da conformidade. A forma como os gráficos são apresentados pode ser editada para melhor visualização, de acordo com o interesse do usuário, como valores mínimo e máximo dos eixos, por exemplo.

Figura 7 – Riscos específicos para uma incerteza de medição 2,50%, considerando faixa de especificação de 90-110%, *guard band* com intervalo de aceitação de 92.1-107.9% e resultados analíticos de 80-120%.

É importante apontar que resultados iguais aos limites de especificação possuem risco de 50%, pois 50% da dispersão de seus valores estará fora de especificação ¹²⁸. Sendo assim, conforme os resultados analíticos se aproximam dos limites, o risco aumenta, e conforme se distanciam, o risco diminui. A incerteza padrão combinada delibera o quanto os riscos aumentam ou diminuem de acordo com a proximidade ou distanciamento dos limites de especificação.

Para ilustrar melhor os resultados obtidos por essa planilha, ela foi preenchida considerando faixa de especificação de 90-110%, $k = 2$ (para um nível de confiança de 95%), e resultado analítico 93%, para três valores de IM: abaixo da IM alvo (0,44%),

igual ao alvo (2,50%) e acima do alvo (5,28%), todos encontrados dentre os métodos avaliados. A Figura 8 mostra os gráficos para o resultado analítico e cada IM. Os riscos específicos do consumidor, estimados a partir da planilha, foram de 0,00% para o método com IM 0,44%; 0,82% para IM alvo e 12,79% para IM 5,28%.

Figura 8 – Influência da incerteza de medição para um mesmo resultado analítico (93%), considerando faixa de especificação de 90-110%. (A) incerteza de medição 0,44% e *guard band* com intervalo de aceitação de 90,4-109,6%; (B) incerteza de medição 2,50% e *guard band* com intervalo de aceitação de 92,1-107,9%; (C) incerteza de medição 5,28% e *guard band* com intervalo de aceitação de 94,3-105,7%.

7.2.1. Validação da planilha de riscos específicos pela abordagem frequentista

Um resumo dos valores de risco para diferentes cenários obtidos na planilha de riscos e nas simulações do método de Monte Carlo é mostrado na Tabela 5. Os valores de risco obtidos pela planilha foram semelhantes aos obtidos nas simulações de Monte Carlo. Assim, concluímos que a planilha deste trabalho foi validada e fornece valores de risco adequados.

Tabela 5 – Valores de risco específicos obtidos na planilha e nas simulações de Monte Carlo para diferentes cenários.

Resultado analítico (%)	Incerteza expandida (%)	Faixa de especificação (%)	Risco obtido pela planilha (%)	Risco obtido por Monte Carlo - média e (desvio padrão)* (%)
88,0	2,5	90,0 – 110,0	5,48	5,51 (0,07)
98,0	2,5	90,0 – 110,0	0,00	0,00 (0,00)
88,0	5,0	90,0 – 110,0	21,19	21,15 (0,16)
98,0	5,0	90,0 – 110,0	0,07	0,07 (0,01)
88,0	2,5	95,0 – 105,0	0,00	0,00 (0,00)
98,0	2,5	95,0 – 105,0	0,82	0,81 (0,03)
88,0	5,0	95,0 – 105,0	0,26	0,25 (0,02)
98,0	5,0	95,0 – 105,0	11,51	11,51 (0,11)

*média e desvio padrão obtidos a partir de 6 réplicas usando 100.000 simulações cada.

7.3. Estimativa dos riscos globais pela abordagem Bayesiana

A estimativa de riscos pela abordagem Bayesiana utilizando como distribuição prévia um processo produtivo uniforme (50% dos lotes dentro de especificação e 50% fora de especificação) se aproxima da abordagem frequentista, na qual não se utiliza o conhecimento do processo produtivo, ou seja, assume-se que há a mesma chance do lote estar dentro ou fora de especificação.

Os valores de riscos globais se mostraram praticamente iguais aos valores de incerteza expandida (Figura 9), pois como não há tendência da distribuição prévia entre lotes dentro ou fora de especificação (distribuição prévia pouco informativa), o risco é impactado apenas pela IM.

Figura 9 – Riscos globais do consumidor e do produtor obtidos pela abordagem Bayesiana a partir de cenário de processo produtivo uniforme, de acordo com a incerteza expandida (%) dos métodos analíticos avaliados neste estudo.

Portanto, de acordo com essa abordagem, quando não se tem conhecimento prévio do processo produtivo nem do resultado analítico, pode-se considerar o risco global como sendo o valor da incerteza expandida (para nível de confiança de 95%) (Figura 9). Além disso, o risco global do produtor e do consumidor são praticamente idênticos (Figura 9), pois como o processo produtivo produz lotes dentro ou fora de especificação com a mesma probabilidade, há a mesma chance de decisões falsas quanto a aprovação ou reprovação.

Essa pode ser uma saída simples, que não requer a estimativa dos riscos globais em si, porém não é a indicada para se obter um valor mais realístico dos riscos, em que

é possível aplicar controle e estratégias de redução de riscos. Sendo assim, esse método pode trazer valores de riscos distantes dos que seriam obtidos por outras abordagens, devido à falta de informações necessárias para se estimar os riscos com maior confiabilidade.

7.4. Comparação dos riscos específicos estimados pelas abordagens Bayesiana e frequentista

Utilizando a planilha “UnCorrel4Risk.xlsm”, conseguimos estimar os riscos específicos do produtor e do consumidor, e a partir da planilha criada neste trabalho (Anexo 2), também estimamos os riscos específicos do produtor e do consumidor. É importante ressaltar que os riscos específicos estimados por ambas abordagens, Bayesiana e frequentista, utilizaram como base um mesmo valor de incerteza padrão combinada encontrado em um dos métodos avaliados neste estudo (2,64%).

Considerando um resultado analítico de 87%, os riscos do produtor obtidos pelas abordagens Bayesiana e frequentista foram de 92,0% e 12,8%, respectivamente. Já para o resultado 93%, os riscos do consumidor obtidos pelas abordagens Bayesiana e frequentista foram 0,1% e 12,8%, respectivamente.

A abordagem Bayesiana, diferente da frequentista, leva em consideração as características do processo, além da medição, o que influencia a estimativa dos riscos do produtor e do consumidor. No exemplo dado, o processo produtivo possuía índice de capacidade do processo (C_{pk}) = 1,11, o que é considerado um processo capaz de produzir lotes dentro de especificação ¹¹⁹.

Para um processo produtivo com essa capacidade de produzir lotes dentro de especificação, o risco do consumidor fica reduzido (0,1%), pois apesar da incerteza padrão combinada estar acima do recomendado ($2,64\% > 1,25\%$) e o resultado estar dentro e não distante do limite de especificação (93%), na abordagem Bayesiana, as características do histórico de produção (distribuição prévia) deslocam a curva do resultado (posterior), fazendo com que seja mais provável que esteja dentro de especificação, ou seja, com baixas chances de ser aprovado erroneamente (Figura 10 - A).

Seguindo o mesmo conceito, o risco do produtor pela abordagem Bayesiana se encontra com alto valor (92,0%), pois mesmo que o resultado analítico esteja fora, porém não distante do limite de especificação (87%), a chance de se reprovar

erroneamente é alta, considerando um processo produtivo que produz lotes dentro de especificação (Figura 10 - B).

Por outro lado, os riscos do produtor e do consumidor estimados pela abordagem frequentista foram iguais por apresentarem a mesma distância quanto ao limite de especificação inferior (Figura 10). Por considerarem apenas a incerteza padrão combinada e o resultado com relação aos limites de especificação, a estimativa do risco não é influenciada pelo histórico de produção, o que, como visto, pode acabar por subestimar ou superestimar os riscos. Além disso, mesmo que um histórico de produção tenha alta capacidade de produzir lotes dentro de especificação, pode ser que por alguma razão o processo daquele lote analisado não esteja dentro do esperado, o que resultaria em riscos diferentes. Sendo assim, é preciso ter um certo cuidado e saber avaliar a situação ao se estimar os riscos específicos pela abordagem Bayesiana.

Figura 10 – Comparação entre riscos específicos Bayesianos e frequentistas. As curvas em azul representam a abordagem frequentista, e as verdes representam a curva posterior obtida pela abordagem Bayesiana; as partes preenchidas representam os riscos por cada abordagem, sendo (A) riscos do consumidor ($R = 93\%$) e (B) riscos do produtor ($R = 87\%$).

8. CONCLUSÃO

Há diversas formas de se estimar os riscos de tomada de decisão errada na conformidade. Este trabalho demonstra a aplicação da abordagem frequentista para estimativa dos riscos específicos, além de disponibilizar uma planilha para estimativa desses riscos, que pode ser aplicada quando o resultado analítico e sua incerteza de medição são conhecidos.

A maioria dos métodos analíticos avaliados possuía incerteza de medição acima do recomendado, o que refletiu na estimativa de seus riscos, reforçando a necessidade de um maior controle dos métodos utilizados na avaliação da conformidade de medicamentos.

A estimativa dos riscos globais pela abordagem Bayesiana assumindo-se distribuição uniforme é aplicável a situações em que as informações do processo produtivo são inexistentes e se deseja estimar o risco de um lote futuro para um método analítico com incerteza conhecida. Porém, no momento que se tem conhecimento do resultado analítico, a abordagem frequentista fornece estimativa de risco mais confiável (risco específico).

Os riscos específicos estimados pela abordagem Bayesiana e frequentista se mostraram divergentes, o que é explicado pela influência da distribuição prévia na primeira abordagem, podendo superestimar ou subestimar os riscos do produtor ou do

consumidor com relação a abordagem frequentista, que leva em conta somente o resultado analítico de acordo com os limites de especificação e a incerteza de medição.

Naturalmente, as falhas na qualidade de medicamentos e decisões equivocadas de conformidade estão associadas a prejuízos à saúde, altos custos e até mesmo impacto ambiental, o que justifica o investimento em ações preventivas, como desenvolver, avaliar e/ou otimizar métodos analíticos de forma a possuírem incerteza de medição abaixo ou igual à incerteza alvo, e adotar estratégias na rotina para minimizar os riscos de tomada de decisão errada, como estabelecer estratégias para reteste quando o risco de decisão falsa for superior ao risco máximo admissível.

Esta parte do trabalho foi publicada, conforme Anexo 1-e.

PARTE 3: Identificação e quantificação das fontes de incerteza do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC e otimização com aplicação do *Analytical Quality by Design*

9. INTRODUÇÃO

A terbinafina é um antifúngico sintético da classe das alilaminas. Assim como outras alilaminas, inibe a enzima esqualeno epoxidase, prejudicando a biossíntese de ergosterol na membrana celular e causando acúmulo intracelular de esqualeno, resultando na lise da célula fúngica^{90,100,129}. O cloridrato de terbinafina ($C_{21}H_{26}ClN$) (Figura 11) é a principal forma química da terbinafina para fins farmacêuticos. É um composto altamente lipofílico, que tende a acumular na pele, unhas e tecido adiposo, e é facilmente solúvel em metanol e cloreto de metileno, solúvel em etanol e pouco solúvel em água^{129,130}. Clinicamente, é utilizada para tratamento de infecções dermatófitas de unhas e pele, como tinea cruris, tinea pedis (pé de atleta) e tinea corporis. O creme para uso tópico também é utilizado no tratamento de pitíriase versicolor e infecções da pele causadas por leveduras, principalmente do gênero *Candida*^{101,129,131}.

Figura 11 – Estrutura molecular do cloridrato de terbinafina¹²⁹.

A técnica de cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) com detector UV é amplamente utilizada para determinação de cloridrato de terbinafina em produtos farmacêuticos, devido ao seu alto potencial de separação, seletividade e sensibilidade¹³⁰. Um trabalho do nosso grupo de pesquisa avaliou o desempenho de quatro métodos de HPLC para determinação de cloridrato de terbinafina em diferentes formas

farmacêuticas com base na incerteza de medição (IM) ¹¹⁹. Dentre os métodos avaliados, somente o aplicado à determinação em comprimidos apresentou valor de IM dentro do recomendado. Os outros métodos, para determinação de terbinafina em gel ou creme, apresentaram IM acima do valor alvo ¹¹⁹. A IM é um parâmetro associado ao resultado analítico, representando a dispersão de valores que podem ser atribuídos a ele, e mesmo que não seja estimada, está sempre presente ¹. Ainda assim, a IM é dificilmente considerada nas análises de medicamentos ¹¹⁹, porém sua importância vem sendo discutida em diversos trabalhos ³⁸, assim como em diferentes guias e normas ^{1,61,132}.

Os valores de IM no trabalho citado acima foram estimados seguindo abordagem *top-down*, como uma combinação entre precisão e exatidão do método ^{62,119}. Outra forma de se estimar a IM em análises químicas se dá pela abordagem *bottom-up* ^{1,38,133}. Dentre as diferenças entre as abordagens pode-se citar a quantidade de informação prévia necessária para a estimativa (como valores de precisão e exatidão do método, certificados de calibração, pureza do padrão, etc.), o trabalho, tempo e recursos exigidos, e a possibilidade de se conhecer mais a fundo as fontes de incerteza, o que é um pré-requisito para posterior otimização do método ³⁸. A abordagem *bottom-up* se enquadra nessa possibilidade. Os principais métodos para estimativa de incerteza por essa abordagem são: método de propagação de incertezas, método da planilha de Kragten e método de Monte Carlo ^{1,38}.

O guia para expressão de incerteza na medição (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* - GUM) ⁶¹ descreve o método de propagação de incertezas, que se baseia nas seguintes etapas: a) especificar o que será medido, por exemplo, o teor (%) de cloridrato de terbinafina em cremes, determinado por HPLC com detector DAD, e a fórmula matemática que será utilizada para seu cálculo; b) identificar as fontes de incerteza envolvidas na medição, etapa em que utilizar um diagrama de Ishikawa é particularmente útil a fim de se identificar cada incerteza, sem considerá-las mais de uma vez. Cada fonte de incerteza pode ter diversas incertezas associadas, por exemplo: o padrão de referência tem a incerteza proveniente de sua pureza e dos equipamentos utilizados em seu preparo, como incertezas da balança analítica e vidrarias volumétricas, da mesma forma a amostra também tem as incertezas provenientes de seu preparo, tendo em comum com o padrão as incertezas da balança analítica. Na recente publicação do nosso grupo de pesquisa ³⁸ apresentamos diversos exemplos de fontes de incerteza na área de análise de medicamentos; c) quantificar os componentes de incerteza, sendo necessário converter em desvio padrão (incerteza padrão) as incertezas

apresentadas como intervalo de valores, dividindo o valor da incerteza por um fator apropriado de acordo com sua função densidade de probabilidade ^{1,38,61}; d) calcular a incerteza padrão combinada (u_c), seguindo a lei da propagação das incertezas descrita no guia citado, que considera cada parâmetro com sua incerteza padrão quantificada, e a correlação entre os parâmetros (se existente), relacionando a incerteza padrão combinada com a incerteza dos parâmetros dos quais depende ^{1,61}; e finalmente calcular a incerteza expandida (U), considerando um nível de confiança adequado (geralmente 95%, na área de análises químicas), o que corresponde a um fator de abrangência (usualmente $k = 2$), que será multiplicado pela incerteza padrão combinada. A incerteza expandida é o que chamamos de incerteza de medição (IM) ¹.

O método da planilha foi introduzido por J. Kragten em 1994 ¹³⁴, como uma simplificação do método de propagação de incertezas, utilizando-se de um software de planilhas. Neste método se faz necessário ter conhecimento apenas da fórmula de cálculo do mensurando, dos valores dos parâmetros e suas incertezas padrão ³⁸. Esse método é reconhecido como uma alternativa equivalente ao método descrito pelo GUM ^{1,38}. Ao longo dos anos autores apresentaram adaptações do método da planilha de Kragten, visando aplicações mais amplas, considerando a correlação entre os parâmetros de entrada no cálculo da incerteza ¹³⁵, e considerando a correlação metrológica entre resultados analíticos de produtos multiparâmetro devido a etapas analíticas compartilhadas ¹³⁶.

Outra forma de se estimar a incerteza é utilizando o método de simulações de Monte Carlo, implementado em um software estatístico ou de planilhas ¹. Esse método leva em consideração a relação matemática do mensurando com os parâmetros de entrada, os valores e a função densidade de probabilidade dos parâmetros e suas incertezas associadas ³⁸. Cada parâmetro terá valores gerados aleatoriamente de acordo com sua função densidade de probabilidade, que então serão relacionados matematicamente, gerando uma distribuição de resultados simulados do mensurando, a partir dos quais determinamos a incerteza combinada. Essa amostragem aleatória é repetida extensivamente, na ordem de 10^5 ou mais, obtendo um espaço amostral suficiente para inferência estatística ^{38,137}.

Há alguns pontos a se considerar ao escolher qual método *bottom-up* utilizar, visto que cada um tem suas vantagens e limitações. Os métodos de propagação de incertezas e da planilha de Kragten são aplicáveis majoritariamente nos casos em que há uma relação linear entre os parâmetros de entrada e a resposta ^{29,39,138,139}. Caso não haja

essa linearidade (o que pode ser verificado somente no método da planilha), adicionar termos de segunda e terceira ordem na expressão da incerteza pode ser necessário no caso da lei da propagação de incertezas, o que pode tornar o cálculo ainda mais complexo ²⁹. Já para o método da planilha, há a alternativa de utilizar uma aproximação quadrática, proposta por Ellison ¹³⁵, que melhora a estimativa da incerteza nesses casos. Além disso, esses métodos exigem a distribuição normal ou ao menos aproximadamente normal dos parâmetros ^{139,140}. Por outro lado, o método de Monte Carlo é prontamente efetivo nos casos de não linearidade e em que há diferentes distribuições ^{39,138}. Como dito anteriormente, esse método leva em consideração a função densidade de probabilidade de cada parâmetro, culminando numa resposta com sua própria função densidade de probabilidade. Adicionalmente, é particularmente útil nos casos em que há grande complexidade na relação entre os parâmetros e resposta, o que pode dificultar a aplicação dos outros métodos, especialmente o de propagação de incertezas ¹³⁹. Uma limitação das simulações de Monte Carlo pode ser a exigência computacional, seja de softwares específicos (apesar de poder ser executado em softwares como Microsoft Excel) ou da capacidade de gerar e armazenar a eventual grande quantidade de dados ¹⁴⁰. Outra dificuldade desse método poderia ser para identificar as principais contribuições dos parâmetros para o valor da incerteza combinada, tendo-se uma solução proposta por Jakab e colaboradores ¹³⁹.

A IM estimada está relacionada ao desempenho do método analítico, visto que quanto maior o valor da incerteza, menor é a confiabilidade do resultado analítico, levando aos riscos de tomada de decisão errada na avaliação da conformidade, que podem afetar os consumidores ou produtores de medicamentos ¹⁴¹. Há diversos tipos de riscos de decisão errada. Neste trabalho focamos nos riscos particulares globais estimados pela abordagem Bayesiana ¹¹⁹ e riscos particulares específicos estimados pela abordagem frequentista ¹⁴¹. Estes riscos são chamados particulares por levar em consideração somente um parâmetro de qualidade do produto (o teor do princípio ativo, no caso deste trabalho), diferente do risco total que leva em consideração dois ou mais parâmetros de qualidade, assim como foi abordado em estudos prévios ^{136,142,143}.

As decisões erradas na conformidade de medicamentos estão relacionadas a custos ou prejuízos financeiros de diversos tipos, considerando retrabalhos, descartes, lotes perdidos, descredibilidade do produtor, custos com saúde, etc. Para garantir um melhor custo-benefício, o ideal é que os métodos analíticos reproduzam resultados com valores razoavelmente baixos de IM e que sejam viáveis financeiramente na rotina do

laboratório. Além disso, espera-se que os processos produtivos sejam capazes de produzir medicamentos dentro da especificação ^{119,125,141}.

Portanto, quando um método analítico fornece resultados com IM acima do recomendado ^{64,122}, como os métodos citados para determinação de cloridrato de terbinafina em gel ou creme ¹¹⁹, se faz necessário adotar estratégias de otimização do método para aumentar a confiabilidade, diminuindo os erros sistemático e aleatório na medida do possível, como melhorando exatidão e precisão e/ou reduzindo as principais fontes de incerteza, que podem ser identificadas pela abordagem *bottom-up* de estimativa de incerteza, como visto anteriormente. A redução da IM possibilitará maior confiabilidade na avaliação da conformidade, reduzindo o risco de decisões falsas devido à incerteza.

Uma forma cada vez mais conhecida e utilizada para se chegar a um método mais adequado ao seu propósito é seguindo os conceitos do *Analytical Quality by Design* (AQbD) ^{54,56,144}. Atualmente, a farmacopeia americana está trabalhando em um novo capítulo baseado na abordagem AQbD, levando em consideração a IM e riscos de decisão errada ¹⁴⁵.

O AQbD é uma abordagem sistemática para desenvolvimento e otimização de métodos que se sobressai em diversos aspectos comparado à abordagem tradicional de tentativa e erro, na qual se testa um fator por vez. Essa abordagem sistemática se baseia no conhecimento científico, no entendimento do produto, analito, técnica e método, e no gerenciamento de risco de qualidade ^{53,56,146}.

A abordagem AQbD se utiliza de diversas ferramentas e segue suas etapas de forma cíclica, permitindo melhoria contínua. Primeiramente, define-se o perfil analítico alvo, especificando o que se deseja medir e quais características de desempenho se deseja obter, como a IM alvo. Esses objetivos devem ser atendidos não só ao final do desenvolvimento, mas em todo ciclo de vida do método. Então, são utilizadas ferramentas de análise de risco, como diagrama de Ishikawa, Análise de Modos de Falha e Efeitos ou Número de Prioridade de Risco, para identificação e quantificação dos riscos associados aos parâmetros (variáveis) e atributos (respostas) críticos do método. Em seguida, com o uso de ferramentas de planejamento de experimentos, diversos parâmetros são testados simultaneamente, inclusive podendo verificar interações entre eles, o que não é possível com a abordagem tradicional. A partir dos resultados desses experimentos são estabelecidas equações de regressão linear múltipla que explicam os resultados em função dos parâmetros de entrada, sendo possível fazer

predições de resultados dentro das faixas dos parâmetros estudados no planejamento e realizar a análise de superfície de resposta, com finalidade de definir a região operável do método. Essa região é um espaço multidimensional explorável de combinação e interação dos parâmetros, em que os objetivos pré-definidos do método são atendidos, o que garante uma maior robustez ao método. Dentro da região operável, é possível identificar as condições ótimas de trabalho e a partir delas verificar o desempenho do método de acordo com o perfil analítico alvo^{54,56,147,148}.

Como essa abordagem leva em consideração todo o ciclo de vida do método (desde o começo de seu desenvolvimento até o seu eventual desuso), são adotadas estratégias de controle contínuo, como acompanhamento de resultados na rotina, verificando possíveis tendências ou resultados fora de especificação, além de verificar o desempenho regularmente. Dessa forma, a abordagem AQbD se mostra muito mais efetiva, focada e menos custosa, chegando a um entendimento muito maior de como os parâmetros do método afetam as respostas analíticas e possibilitando um método robusto que atenda ao seu propósito ao longo de seu uso^{53,54,56,149}.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a incerteza pela abordagem *bottom-up*, com identificação e quantificação das fontes de incerteza, assim como propor estratégias de melhoria do método com a aplicação da abordagem AQbD, considerando um dos métodos citados que apresentou alta IM (método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC). Adicionalmente, os métodos antes e após otimização foram comparados quanto à IM, aos riscos de decisão falsa e aos custos associados à tomada de decisões quanto à conformidade/não-conformidade.

10. MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, foi realizada a verificação da balança analítica (Shimadzu) com pesos padrão calibrados para verificar o erro sistemático (exatidão das pesagens) e aleatório (repetibilidade das pesagens) considerando a faixa de utilização da balança.

Então, foi verificada a repetibilidade do volume das pipetas e balões volumétricos utilizados para preparo de padrão e amostras. Para tal, foram realizadas 10 pesagens do volume ocupado por água ultra purificada à temperatura ambiente até o menisco de cada pipeta. Para os balões volumétricos, foram realizadas 10 pesagens de água ultra purificada até seu menisco (ajustando-se a cada pesagem), à temperatura ambiente.

Foi utilizado material de referência certificado de cloridrato de terbinafina com pureza de 99,8% (Sigma-Aldrich), creme contendo 1% (10 mg/g) de cloridrato de terbinafina (adquirido no comércio local), metanol e acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, Scharlau ou Riedel-de Haën), trietilamina P.A. (Sigma-Aldrich), ácido fosfórico P.A. (Synth) e filtros de seringa de nylon de 0,45 µm de porosidade (Allcrom ou Whatman).

As condições cromatográficas foram: HPLC com detector de arranjo de diodos (DAD) da marca Shimadzu ou Agilent (otimização), utilizando comprimento de onda de 224 nm; coluna Zorbax Eclipse XDB-C18, de dimensões 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5 µm; fase móvel de metanol e acetonitrila (60:40), pH 7,68 (ajustes com trietilamina e/ou ácido fosfórico); fluxo de 0,4 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL⁹⁰.

A porcentagem de cloridrato de terbinafina (*Terb%*) nos padrões e testes foi calculada seguindo a Equação 9.

Equação 9 – Teor (%) de cloridrato de terbinafina.

$$Terb\% = \left(\frac{A_t}{A_s} \times \frac{m_s \times P_s}{V_{f1}} \times \frac{V_{p1}}{V_{f2}} \times \frac{V_{f3}}{m_t \times 0,01} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde: A_t e A_s = áreas dos picos da amostra (teste) e do padrão, respectivamente; m_s e m_t = massas pesadas do padrão e do teste, respectivamente; P_s = pureza do padrão; V_{f1} , V_{f2} e V_{f3} = volume dos balões volumétricos; V_{p1} = volume da pipeta volumétrica.

Os parâmetros avaliados nesta etapa foram linearidade, exatidão e precisão (repetibilidade e precisão intermediária).

Para o preparo da solução padrão, 10 mg do padrão de cloridrato de terbinafina foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e diluídos em metanol até o menisco (solução estoque). Então, 10 mL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL, completando seu volume com metanol, de forma a se obter 10 µg/mL de cloridrato de terbinafina.

A linearidade foi realizada a partir de soluções contendo 6, 8, 10, 12 e 14 µg/mL de cloridrato de terbinafina (60 a 140% da concentração da solução padrão). As soluções foram injetadas em triplicata. A linearidade foi avaliada empregando-se o método de regressão por mínimos quadrados.

O preparo da solução amostra (10 µg/mL) foi realizado a partir da pesagem de 100 mg do creme contendo 1% de cloridrato de terbinafina, diluídos com auxílio de sonificador em 25 mL de metanol, por aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, essa solução foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, no qual foi adicionado metanol até aproximadamente metade do volume, e então levado para sonicação por 5 minutos antes de se completar até o volume com metanol e filtrar.

Para a avaliação da exatidão, foi preparado um creme base (placebo)¹⁵⁰, e então foram pesados 100 mg desse creme em sextuplicata, seguindo o procedimento adotado para preparo da solução amostra, porém sem completar o volume. Em seguida, foram transferidos 10 mL da solução estoque do padrão para cada um dos balões contendo o placebo diluído, para então completar até o volume com metanol e filtrar, obtendo-se 10 µg/mL de cloridrato de terbinafina nas amostras (100% da solução padrão). As soluções foram injetadas em triplicata.

A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e precisão intermediária (dias diferentes). Para tal, em cada dia foram preparadas seis soluções amostra independentes que foram injetadas em triplicata.

O valor de IM foi estimado pela abordagem *top-down* a partir dos dados obtidos pela exatidão e precisão (precisão intermediária) do método (Equação 1). Com essa estimativa foi possível comparar o valor de IM obtido neste trabalho com a IM obtida pela abordagem *top-down* a partir dos dados de validação apresentados no artigo no qual o método em avaliação foi publicado⁹⁰.

Para maior entendimento sobre o método e possíveis estratégias de melhoria, o valor de IM também foi estimado pela abordagem *bottom-up*. Seguindo o método da propagação da incerteza^{1,61}, a incerteza combinada ($u\%$) foi calculada pela Equação 10. Alternativamente, a incerteza foi estimada pelo método da planilha de Kragten^{134,135} e pelo método de Monte Carlo¹.

Equação 10 – Expressão matemática para cálculo da incerteza combinada.

$$u\% = \text{Terb}\% \times \sqrt{\left(\frac{u_{A_t}}{A_t}\right)^2 + \left(\frac{u_{A_s}}{A_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{m_s}}{m_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{P_s}}{P_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{f1}}}{V_{f1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{f2}}}{V_{f2}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{f3}}}{V_{f3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{m_t}}{m_t}\right)^2 + r\left(\frac{u_{m_s}}{m_s}\right)\left(\frac{u_{m_t}}{m_t}\right)} \quad (10)$$

Onde: A_t e u_{A_t} = área do pico do teste (amostra) e sua incerteza; A_s e u_{A_s} = área do pico do padrão e sua incerteza; m_s e u_{m_s} = massa pesada do padrão e sua incerteza; P_s e u_{P_s} = pureza do padrão e sua incerteza; V_{f1} , V_{f2} , V_{f3} , $u_{V_{f1}}$, $u_{V_{f2}}$ e $u_{V_{f3}}$ = volumes dos balões

volumétricos e suas incertezas; V_{p1} e $u_{V_{p1}}$ = volume da pipeta volumétrica e sua incerteza; m_t e u_{m_t} = massa pesada do teste e sua incerteza; r = correlação entre massas pesadas do padrão e do teste (devido a utilização da mesma balança).

No método de Monte Carlo, foram simulados resultados de teor de cloridrato de terbinafina a partir de 50.000 simulações de cada parâmetro da Equação 9 e das outras fontes de incerteza identificadas do método, considerando suas relações matemáticas. As simulações dos parâmetros de entrada foram realizadas com base nas respectivas distribuições e incertezas, utilizando dados de amostragem aleatória. Os resultados de teor obtidos (parâmetro de saída) tiveram distribuição avaliada e a incerteza padrão combinada foi obtida pelo seu desvio padrão.

Independentemente do método de estimativa da incerteza padrão combinada (u_c), os valores de incerteza expandida (U) foram obtidos pela Equação 2, utilizando fator de abrangência $k = 2$, para 95% de nível de confiança.

Como a abordagem *bottom-up* permite identificar as principais fontes de incerteza do método, as etapas de otimização foram realizadas com base nesse conhecimento, com foco em reduzir a incerteza final e consequentemente os riscos de decisão errada, para tornar o método mais adequado ao seu propósito e apresentar melhor custo-benefício.

Foram utilizadas ferramentas de AQbD adequadas à melhoria de desempenho do método, seguindo as etapas de definição do perfil analítico alvo e dos atributos de qualidade do método; análise de risco com identificação dos parâmetros críticos; planejamento de experimentos e estudo dos modelos de regressão dos atributos em função dos parâmetros; seleção das condições de trabalho; obtenção da região operável do método e verificação do desempenho com base nos objetivos da otimização.

Para otimização das condições cromatográficas foi realizado planejamento fatorial fracionário com ponto central, considerando seis fatores em dois níveis mais o ponto central (X1: proporção de metanol de 40 a 80%; X2: proporção de acetonitrila de 20 a 60%, X3: pH de 5,2 a 10,2; X4: temperatura da coluna de 25 a 40°C; X5: fluxo de 0,3 a 0,5 mL.min⁻¹; X6: volume de injeção de 10 a 20 µL) para otimização de seis respostas (Y1: tempo de retenção; Y2: área; Y3: assimetria; Y4: pureza; Y5: pratos teóricos; Y6: sinal/ruído). A partir dos experimentos foram obtidos os modelos de regressão de cada resposta em função dos fatores estudados, e, com base nos modelos obtidos, as condições ótimas do método foram selecionadas empregando funções de desejabilidade, a fim de obter as melhores respostas. Ainda com base nos modelos de

regressão obtidos, a região operável do método com baixa probabilidade de falha (até 5%) foi definida empregando método de simulações de Monte Carlo.

Finalmente, foram feitas comparações entre o método antes e após otimização, quanto às melhorias realizadas na incerteza de medição, riscos de decisão errada e em seus custos relativos.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

11.1. Verificação do método e estimativa da incerteza pela abordagem *top-down*

Na avaliação da linearidade, foi verificada relação linear entre os teores de cloridrato de terbinafina e áreas cromatográficas, obtendo-se faixa linear de 6 a 14 µg/mL, com coeficiente de correlação $r = 0,9999$; coeficiente de determinação $R^2 = 0,9998$ e equação de regressão linear: $y = 78444 + 321840x$ (Figura 12). A reta não passa pela origem – o que pode levar a um problema de exatidão. Comparando os teores calculados pela equação da reta com aqueles calculados por calibração pontual (solução padrão 100%), não houve diferença (p-valor = 0,535). Sendo assim, pode-se utilizar calibração pontual, pois não haverá problema de exatidão.

Figura 12 – Linearidade do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC.

A exatidão foi obtida por meio de placebo adicionado de solução padrão 100% (n = 6). Dessa forma, a recuperação experimental foi 99,63%, com desvio padrão

relativo (DPR) 1,54%; enquanto a recuperação obtida pelos dados de validação do artigo de referência foi 100,43% com DPR 1,63%, no qual também foi utilizado placebo. A exatidão não foi considerada estatisticamente distinta entre este trabalho e o artigo (p-valor 0,321).

Na avaliação da repetibilidade foi obtido DPR 1,37% ($n = 5$); enquanto que no artigo de referência o DPR foi 1,99% ($n = 9$). O teste de homogeneidade de variâncias (p-valor 0,244) sugere que a repetibilidade obtida neste trabalho não foi estatisticamente diferente à relatada no artigo.

Na avaliação da precisão intermediária foi obtido DPR 2,35% ($n = 10$); enquanto que no artigo de referência o DPR foi 2,60% ($n = 9$). O teste de homogeneidade de variâncias (p-valor 0,401) sugere que a precisão intermediária obtida neste trabalho não foi estatisticamente diferente à relatada no artigo.

A partir dos dados de exatidão e precisão intermediária obtidos, foi possível estimar a incerteza padrão combinada (u_c) pela abordagem *top-down*, obtendo-se $u_c = 2,38\%$; por outro lado, a incerteza padrão combinada obtida pelos dados do artigo foi de 2,64% (estimada da mesma forma). Considerando a variabilidade de estimativas de incerteza, as incertezas de medição deste trabalho e do artigo foram consideradas metrologicamente equivalentes, visto que a diferença observada entre elas (9,9%) é menor do que 20% ^{64,151}.

Tanto neste trabalho quanto no artigo avaliado, a precisão foi o fator que mais contribuiu para o valor de incerteza do método, o que condiz com a precisão ser relacionada ao tipo de erro aleatório e possuir mais fontes de variabilidade, visto que a estimativa foi realizada com a precisão intermediária ¹¹⁹.

11.2. Estimativa da incerteza pela abordagem *bottom-up*

A fim de se estimar a IM pela abordagem *bottom-up*, primeiramente foi realizada a identificação das fontes de incerteza com auxílio do diagrama de Ishikawa (Figura 13).

Figura 13 – Diagrama de Ishikawa com as principais fontes de incerteza do método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC.

Onde: S = padrão; T = teste (amostra); I = instrumento; V_{f1} , V_{f2} e V_{f3} = volume dos balões volumétricos; V_{p1} = volume da pipeta volumétrica; m_s e m_t = massas pesadas do padrão e do teste; P_s = pureza do padrão; r_{ts} e r_{tT} = repetibilidade da tara da balança para padrão e teste; r_{f1} , r_{f2} e r_{f3} = repetibilidade dos balões volumétricos; r_{p1} = repetibilidade da pipeta volumétrica; r_{m_s} e r_{mT} = repetibilidade da massa do padrão e do teste; e_B = erro da balança; e_{f1} , e_{f2} e e_{f3} = erro dos balões volumétricos; e_{p1} = erro da pipeta volumétrica; A_s e A_t = áreas dos picos do padrão e do teste.

As incertezas dos componentes individuais do método foram estimadas (Tabela 6) para tornar possível o cálculo da incerteza de medição pela abordagem *bottom-up*, e assim, identificar os fatores que mais contribuem para a incerteza final.

Tabela 6 – Descrição das fontes individuais de incerteza associadas ao método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC.

Fonte de incerteza	Símbolo	Valor	Distribuição	u
Área da solução teste	A_t	3451680	Normal	1611
Área da solução padrão	A_s	3456836	Normal	5333
Massa do padrão (mg)	m_s	10,5	Normal	0,19
Pureza do padrão	P_s	0,998	Retangular	0,0012
Balão volumétrico 1 (mL)	V_{f1}	100	Triangular	0,064
Balão volumétrico 2 (mL)	V_{f2}	100	Triangular	0,064
Balão volumétrico 3 (mL)	V_{f3}	100	Triangular	0,064
Pipeta volumétrica (mL)	V_{p1}	10	Triangular	0,017
Massa do teste (mg)	m_t	101,6	Normal	0,19

u = incerteza padrão.

A incerteza combinada, calculada a partir da Equação 10, foi $u_c = 1,75\%$ e a incerteza expandida $U = 3,5\%$.

A Figura 14 mostra a estimativa da incerteza de medição pelo método da planilha de Kragten, considerando a correlação entre as massas pesadas do padrão e do teste, obtendo-se $u_c = 1,75\%$ e $U = 3,5\%$.

Figura 14 – Incerteza de medição estimada pelo método da planilha de Kragten.

		u_{m_s}	u_{P_s}	$u_{V_{f1}}$	$u_{V_{p1}}$	$u_{V_{f2}}$	u_{m_T}	$u_{V_{f3}}$	u_{A_T}	u_{A_s}
		0,19	0,0012	0,064	0,017	0,064	0,19	0,064	1611	5333
m_s	10,50	10,69	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50
P_s	0,9980	0,9980	0,9992	0,9980	0,9980	0,9980	0,9980	0,9980	0,9980	0,9980
V_{f1}	100,00	100,00	100,00	100,06	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
V_{p1}	10,00	10,00	10,00	10,00	10,02	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
V_{f2}	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,06	100,00	100,00	100,00	100,00
m_T	101,60	101,60	101,60	101,60	101,60	101,60	101,79	101,60	101,60	101,60
V_{f3}	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,06	100,00	100,00
A_T	3451680	3451680	3451680	3451680	3451680	3451680	3451680	3451680	3453291	3451680
A_s	3456836	3456836	3456836	3456836	3456836	3456836	3456836	3456836	3456836	3462169
Terb%	102,99%	104,85%	103,11%	102,92%	103,16%	102,92%	102,79%	103,05%	103,03%	102,83%
±Terb%	0,00%	1,86%	0,12%	-0,07%	0,18%	-0,07%	-0,19%	0,07%	0,05%	-0,16%
Correlação	m_s	P_s	V_{f1}	V_{p1}	V_{f2}	m_T	V_{f3}	A_T	A_s	
	m_s	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,730	0,000	0,000	0,000
	P_s	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	V_{f1}	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	V_{p1}	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	V_{f2}	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	m_T	0,730	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
	V_{f3}	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	A_T	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
	A_s	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
		1,86%	0,12%	-0,07%	0,18%	-0,07%	-0,19%	0,07%	0,05%	-0,16%
1,86%		0,0347%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	-0,0026%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
0,12%		0,0000%	0,0002%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
-0,07%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
0,18%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0003%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
-0,07%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
-0,19%		-0,0026%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0004%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
0,07%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
0,05%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%
-0,16%		0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0000%	0,0003%
u%		m_s	P_s	V_{f1}	V_{p1}	V_{f2}	m_T	V_{f3}	A_T	A_s
	1,75%	0,0321%	0,0002%	0,0000%	0,0003%	0,0000%	-0,0022%	0,0000%	0,0000%	0,0003%

Onde: m_s e m_t = massas pesadas do padrão e do teste (amostra); P_s = pureza do padrão; V_{f1} , V_{f2} e V_{f3} = volume dos balões volumétricos; V_{p1} = volume da pipeta volumétrica; A_s e A_t = áreas dos picos do padrão e do teste; u = incerteza padrão; $u\%$ = incerteza combinada; Terb% = teor de cloridrato de terbinafina (%).

A partir das simulações de Monte Carlo obtivemos $u_c = 1,83\%$ e $U = 3,7\%$, mostrando-se equivalente aos valores de incerteza obtidos pelos métodos de propagação de incertezas e da planilha de Kragten ($u_c = 1,75\%$ e $U = 3,5\%$), com diferença menor do que 20% entre eles (4,6%). Leves flutuações entre os valores de incerteza pelo método de Monte Carlo são esperadas devido à característica aleatória do mesmo. O histograma a seguir mostra a distribuição normal das respostas obtidas pelas simulações de Monte Carlo (Figura 15).

Figura 15 – Distribuição das respostas obtidas pelo método de Monte Carlo. As linhas tracejadas mostram o valor medido e sua incerteza de medição.

Os valores de incerteza calculados pela abordagem *top-down* ($u_c = 2,38\%$ e $U = 4,8\%$) foram maiores do que os encontrados pela abordagem *bottom-up* ($u_c = 1,75\%$ e $U = 3,5\%$), com diferença observada entre elas (26,5%) maior do que 20%. Essa diferença não é incomum, uma vez que a segunda abordagem considera as fontes de incerteza individualmente, inclusive evitando que sejam consideradas mais de uma vez na estimativa da incerteza. Já a primeira abordagem considera todas as fontes de erros sistemáticos e aleatórios conjuntamente e sem distinções, o que pode levar a uma superestimação da incerteza ^{1,62,152}.

11.3. Estratégias de melhoria do método

Nesta etapa, estratégias de melhoria do método são propostas com base nas fontes de incerteza que mais contribuíram com o valor de incerteza final, e na busca de um método robusto com menor valor de IM, levando em consideração os conceitos de AQbD.

11.3.1. Contribuição das fontes de incerteza e aplicação do AQbD para otimização do método

Através da abordagem *bottom-up*, as contribuições individuais para a incerteza final foram quantificadas, como mostra a Figura 16. A massa pesada do padrão (m_s) foi identificada como fator crítico para a IM, contribuindo cerca de 97% para o valor de incerteza final.

Figura 16 – Contribuição individual das fontes de incerteza para o valor de incerteza total.

Onde: A_s e A_t = áreas dos picos do padrão e do teste (amostra); V_{f1} , V_{f2} e V_{f3} = volume dos balões volumétricos; m_s e m_t = massas pesadas do padrão e do teste; V_{p1} = volume da pipeta volumétrica; P_s = pureza do padrão.

Utilizamos o conhecimento acima para aplicação do AQbD, assim como conhecimentos prévios adquiridos na literatura, em bases de dados sobre as propriedades de moléculas ^{129,153}, nas farmacopeias ^{154,155}, em artigos sobre métodos analíticos para quantificação de cloridrato de terbinafina (especialmente o descrito no artigo precursor) ^{90,91,100,101}, e também sobre a técnica de HPLC e seus fatores mais relevantes para as respostas cromatográficas ^{70,155}.

O perfil analítico alvo foi definido considerando-se que o método deve ser capaz de quantificar cloridrato de terbinafina em cremes, na faixa de 95 a 105% da concentração nominal, com redução expressiva da IM (ao menos pela metade quanto ao método original) para um nível de confiança de aproximadamente 95%.

Os atributos (respostas cromatográficas) considerados para o planejamento de experimentos foram: tempo de retenção (Y1), área (Y2), assimetria (Y3) e pureza (Y4) do pico cromatográfico, pratos teóricos (Y5) e sinal/ruído (Y6). De acordo com os atributos escolhidos e com os objetivos do método, a análise de risco foi realizada com base na identificação dos parâmetros que podem influenciar as respostas cromatográficas e a incerteza de medição, por meio de diagrama de Ishikawa (Figura 17).

Figura 17 – Parâmetros que podem influenciar os atributos e objetivos do método.

O tempo de retenção é característico para o analito dentro de condições definidas. Tem relação com a afinidade do analito entre fase móvel e estacionária, variando com a composição e pH da fase móvel. A área do pico está relacionada com a

concentração do analito, e costuma ser utilizada na quantificação do mesmo. A assimetria do pico está ligada a eficiência cromatográfica, picos simétricos permitem melhor integração e precisão. A pureza de pico tem relação com a especificidade do método, confirmando a ausência de outras substâncias coeluintes no mesmo tempo de retenção do analito. Os pratos teóricos refletem a eficiência de separação da coluna, é geralmente verificado na adequabilidade do sistema. O sinal/ruído corresponde à relação entre área do pico e a variabilidade da linha de base ^{42,155–157}.

Considerando o fator crítico para a incerteza de medição (massa pesada do padrão - m_s), e visto que as incertezas dos balões volumétricos ($V_{f1,2,3}$) contribuíam abaixo de 1% para o valor de incerteza final, e a incerteza da pipeta volumétrica (V_{p1}) contribuíam com aproximadamente 1% (Figura 16), optamos por um novo preparo de solução padrão com aumento da massa pesada do padrão de referência, pouco modificando o modo de preparo da solução padrão. Para minimizar o alto valor de incerteza, evitamos testar massa próxima à original do método (10 mg), ou que necessitasse de alta quantidade de padrão de referência, considerando também a viabilidade do método na rotina. Sendo assim, optamos pela pesagem de 25 mg de padrão de referência, utilizando pipeta volumétrica de 4 mL na diluição da solução estoque, a fim de se manter a mesma concentração final da solução padrão. A pipeta utilizada teve sua repetibilidade verificada como descrito na seção de Material e Métodos.

Assim, para obter as melhores respostas cromatográficas e atender ao perfil analítico alvo, trabalhamos com alguns dos principais parâmetros que as influenciam, tendo como base o método original: composição da fase móvel (proporção de metanol (X1) e acetonitrila (X2)), pH da fase móvel (X3), temperatura da coluna (X4), fluxo (X5) e volume de injeção (X6), levando em consideração a pesagem de 25 mg de padrão de referência em todos experimentos. Outros parâmetros como coluna e comprimento de onda foram mantidos como no método original já descrito.

Considerando os fatores citados, foi realizado um planejamento de experimentos fatorial com ponto central. O ponto central é útil para avaliar melhor a adequação do modelo linear, checando se há curvatura, além de permitir testar os fatores com menos experimentos. Sendo assim, cada fator foi testado em 3 níveis: baixo (-1), central (0) e alto (+1), conforme mostrado na Tabela 7. Foram realizados 16 experimentos do planejamento fatorial (2^6 fracionário), mais duas repetições do ponto central.

Tabela 7 – Fatores e seus níveis utilizados no planejamento fatorial com ponto central.

Fatores	Nível -1	Nível 0	Nível +1
X1 (%)	40	60	80
X2 (%)	20	40	60
X3	5,2	7,7	10,2
X4 (°C)	25	32,5	40
X5 (mL.min ⁻¹)	0,3	0,4	0,5
X6 (μL)	10	15	20

X1 = proporção de metanol; X2 = proporção de acetonitrila; X3 = pH; X4 = temperatura da coluna; X5 = fluxo e X6 = volume de injeção.

A composição da fase móvel pode alterar o tempo de retenção devido à força de eluição dos solventes (quanto maior a força, menor o tempo de retenção). Consideramos diferentes proporções de metanol e acetonitrila a fim de testar essa resposta (sendo que a proporção de acetonitrila muda de acordo com a proporção de metanol). Outro fator importante é o pH da fase móvel, sendo ideal que o analito fique somente no estado iônico ou molecular (pH diferente do pka do analito). Por isso, testamos valores de pH acima e abaixo do pka do cloridrato de terbinafina (8,9). A temperatura da coluna também pode influenciar o tempo de retenção, maiores temperaturas diminuem a viscosidade da fase móvel, diminuindo o tempo de análise. Além disso, o controle da temperatura confere reprodutibilidade do tempo de retenção. O aumento do fluxo leva a um menor tempo de análise, porém não deve ser alto a ponto de não dar tempo de uma separação adequada ou ainda causar problemas com pressão na coluna, nem ser tão baixo a ponto de alongar os picos. O volume de injeção está relacionado com a área do pico, e volumes altos podem causar alargamento do mesmo ^{42,155}.

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente com auxílio do software Minitab[®] versão 20. Os modelos de regressão das respostas em função dos fatores foram obtidos através da análise de regressão linear múltipla por mínimos quadrados ordinais, e seus coeficientes de determinação foram verificados (Tabela 8).

Tabela 8 – Equações de regressão das respostas cromatográficas (Y) em função dos fatores do método (X).

Equação de regressão	R ²	R ² aj	R ² pr
$Y1 = 73,34 - 0,5136 \times X1 - 7,89 \times X3 - 0,1899 \times X4 - 45,09 \times X5 + 0,3162 \times X3X3$ $+ 0,03694 \times X1X3 + 0,00235 \times X1X4 + 0,2223 \times X1X5 + 1,137 \times X3X5$	95,2	93,5	90,7
$Y2 = -17041829 + 9329 \times X1 + 6193725 \times X3 - 24258068 \times X5 + 1519028 \times X6$ $- 483242 \times X3X3 + 3304767 \times X3X5 - 95268 \times X3X6$ $- 1010994 \times X5X6$	99,3	99,1	98,7
$Y3 = 3,082 - 0,3563 \times X3 - 0,02915 \times X4 - 1,560 \times X5 + 0,05011 \times X6 + 0,01715 \times X3X3$ $+ 0,002357 \times X3X4 + 0,0629 \times X3X5 - 0,003750 \times X3X6$ $+ 0,02869 \times X4X5 - 0,000352 \times X4X6$	95,8	94,1	91,1
$Y4 = 0,7272 + 0,0988 \times X3 - 0,00563 \times X6 - 0,00888 \times X3X3 + 0,001044 \times X3X6$	91,4	90,3	88,8
$Y5 = -45274 + 382 \times X1 + 11823 \times X3 + 134,2 \times X4 - 8461 \times X5 - 295,4 \times X6$ $- 541,7 \times X3X3 - 34,182 \times X1X3 + 0,630 \times X1X4 - 118,7 \times X1X5$ $- 1,123 \times X1X6 - 27,19 \times X3X4 + 399 \times X3X5 + 4,90 \times X3X6$ $+ 180,7 \times X4X5 + 2,36 \times X4X6 + 128,4 \times X5X6$	99,8	99,5	99,0
$\ln(Y6) = -7,36 + 4,24 \times X3 - 0,3068 \times X3X3$	67,9	65,9	62,6

Y1 = tempo de retenção; Y2 = área; Y3 = assimetria; Y4 = pureza; Y5 = pratos teóricos; Y6 = sinal/ruído; X1 = proporção de metanol; X3 = pH; X4 = temperatura da coluna; X5 = fluxo e X6 = volume de injeção; R² = coeficiente de determinação; R²aj = coeficiente de determinação ajustado; R²pr = coeficiente de determinação de predição.

Os modelos obtidos para as respostas Y1 a Y5 explicam consideravelmente a variação total do ensaio, com valores de R² ajustado entre 90,3 e 99,5%, indicando boa qualidade dos modelos. Além disso, esses modelos possuem boa capacidade de predição, com R² de predição entre 88,8 e 99,0%. Por outro lado, destacamos que para o modelo da resposta sinal/ruído (Y6) fez-se necessário uma transformação logarítmica das respostas (transformação Box-Cox, $\lambda = 0$). Por este motivo, essa resposta apresentou valores um pouco menores para os coeficientes de determinação (Tabela 8).

A análise de variância dos termos dos modelos foi realizada, conforme mostra a Tabela 9, permanecendo no modelo apenas os termos que contribuem na explicação das respostas (alfa 0,15 para seleção dos termos dos modelos). Adicionalmente, os resíduos dos modelos foram analisados quanto à normalidade, homoscedasticidade e independência, se mostrando adequados.

Tabela 9 – Análise de variância dos termos dos modelos de regressão das respostas cromatográficas (Y) em função dos fatores do método (X).

Termos	Y1			Y2			Y3			Y4			Y5			Y6		
	g.l.	SQ	p	g.l.	SQ	p	g.l.	SQ	p	g.l.	SQ	p	g.l.	SQ	p	g.l.	SQ	p
Regressão	9	385,39	0,000	8	6,55	0,000	10	0,763	0,000	4	0,1200	0,000	16	38664	0,000	2	60,58	0,000
X1	1	51,99	0,000	1	1,11	0,017	-	-	-	-	-	-	1	7195	0,000	-	-	-
X3	1	24,02	0,000	1	3,67	0,000	1	0,437	0,000	1	0,0990	0,000	1	12122	0,000	1	47,50	0,001
X4	1	4,27	0,007	-	-	-	1	0,042	0,000	-	-	-	1	889	0,001	-	-	-
X5	1	169,19	0,000	1	6,25	0,000	1	0,007	0,000	-	-	-	1	710	0,006	-	-	-
X6	-	-	-	1	1,16	0,000	1	0,077	0,000	1	0,0046	0,015	1	3101	0,000	-	-	-
X3X3	1	13,89	0,000	1	3,24	0,000	1	0,041	0,000	1	0,0109	0,000	1	4075	0,000	1	13,07	0,000
X1X3	1	109,14	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	9347	0,000	-	-	-
X1X4	1	3,99	0,029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	28	0,028	-	-	-
X1X5	1	6,33	0,007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	180	0,000	-	-	-
X1X6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	40	0,011	-	-	-
X3X4	-	-	-	-	-	-	1	0,062	0,000	-	-	-	1	831	0,000	-	-	-
X3X5	1	2,58	0,075	1	2,18	0,000	1	0,008	0,023	-	-	-	1	31	0,021	-	-	-
X3X6	-	-	-	1	5,54	0,000	1	0,070	0,000	1	0,0054	0,001	1	12	0,141	-	-	-
X4X5	-	-	-	-	-	-	1	0,019	0,003	-	-	-	1	59	0,003	-	-	-
X4X6	-	-	-	-	-	-	1	0,006	0,052	-	-	-	1	25	0,038	-	-	-
X5X6	-	-	-	1	8,18	0,000	-	-	-	-	-	-	1	13	0,123	-	-	-
Erro	26	19,54		27	4,68		25	0,034		31	0,0112		19	96		33	28,70	
Total	35	404,93		35	6,60		35	0,797		35	0,1312		35	38760		35	89,28	

Y1 = tempo de retenção; Y2 = área; Y3 = assimetria; Y4 = pureza; Y5 = pratos teóricos; Y6 = sinal/ruído; X1 = proporção de metanol; X3 = pH; X4 = temperatura da coluna; X5 = fluxo e X6 = volume de injeção; g.l. = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; p = p-valor.

Figura 18 – Importância dos parâmetros do modelo (X) de cada resposta cromatográfica (Y). O tracejado corresponde ao valor crítico considerando significância de 5%.

Onde: Y1 = tempo de retenção; Y2 = área; Y3 = assimetria; Y4 = pureza; Y5 = pratos teóricos; Y6 = sinal/ruído; X1 = proporção de metanol; X3 = pH; X4 = temperatura da coluna; X5 = fluxo e X6 = volume de injeção.

A Figura 18 mostra a influência de cada parâmetro para as respectivas respostas. Sendo assim, para o tempo de retenção (Y1), temos que a interação entre proporção de metanol e pH (X1X3), seguido da proporção de metanol (X1), são os parâmetros que mais influenciam essa resposta. Para a área do pico (Y2) os fatores mais importantes foram volume de injeção (X6) e interação do pH com volume de injeção (X3X6). Para assimetria do pico (Y3) os fatores mais importantes foram a interação entre pH e

volume de injeção (X3X6), volume de injeção (X6), pH (X3) e interação entre pH e temperatura da coluna (X3X4). Para pureza de pico (Y4) os fatores mais importantes foram os termos quadrático e linear do pH (X3² e X3) e interação entre pH e volume de injeção (X3X6). Para pratos teóricos (Y5), os fatores mais importantes foram a interação entre proporção de metanol e pH (X1X3), seguido pelo pH (X3). Para sinal/ruído (Y6), os únicos fatores significativos foram os termos quadrático e linear do pH (X3² e X3).

A partir dos modelos de regressão obtidos para cada resposta, empregou-se funções de desejabilidade para obter a melhor combinação de fatores (X1 à X6) que corresponde às melhores respostas (Y1 à Y6), de acordo com os critérios da Tabela 10.

Tabela 10 – Limites das respostas ótimas do método.

Resposta	Meta	LL	UL
Y1 (min)	Minimizar	5,5	8,5
Y2	Maximizar	10000000	20000000
Y3	Minimizar	0,85	1,15
Y4	Maximizar	0,95	1,00
Y5	Maximizar	10000	20000
Y6	Maximizar	1000	5000

Y1 = tempo de retenção; Y2 = área; Y3 = assimetria; Y4 = pureza; Y5 = pratos teóricos; Y6 = sinal/ruído; LL = limite inferior; UL: limite superior.

Dessa forma, foram definidas as condições cromatográficas ótimas para obter as respostas acima, consistindo na maior proporção de metanol, pH em que o cloridrato de terbinafina está na forma iônica (mais polar), temperatura mais alta da coluna, menor fluxo e maior volume de injeção. Em resumo: fase móvel composta por metanol e acetonitrila (80:20) com pH 7 (ajustes com trietilamina e/ou ácido fosfórico); temperatura da coluna em 40°C; fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e 20 µL de volume de injeção.

Essas condições ótimas foram verificadas experimentalmente (Figura 19). Os resultados obtidos para amostra de cloridrato de terbinafina creme são mostrados na Tabela 11.

Figura 19 – Cromatograma obtido pelo método em suas condições ótimas. **Tabela 11** – Respostas obtidas com as condições ótimas do método.

Resposta	Valor
Y1 (min)	8,601 (0,002)
Y2	15504464 (12487)
Y3	1,17 (0,02)
Y4	1,00 (0,00)
Y5	12717 (11)
Y6	1414 (525)

Y1 = tempo de retenção; Y2 = área; Y3 = assimetria; Y4 = pureza; Y5 = pratos teóricos; Y6 = sinal/ruído; média e (desvio padrão agrupado) obtidos a partir de 3 determinações (3 injeções para cada).

Podemos notar que essas condições foram condizentes com o previsto pelos modelos de regressão (Tabela 10), proporcionando tempo de retenção plausível e reproduzível, picos com área grande, simetria e pureza, valor alto para pratos teóricos e sinal/ruído. Adicionalmente, foi verificada a adequabilidade da repetibilidade das injeções, com DPR = 0,1% (n = 3).

A partir dos modelos obtidos, o método de Monte Carlo foi empregado para obtenção das regiões operáveis do método, onde se encontram as faixas de trabalho dos fatores em que os objetivos do método são atendidos (Figura 20). As simulações de Monte Carlo auxiliam na designação de probabilidades de falha, delimitando a região operável pela probabilidade de atingir ou não os limites desejados dos atributos do método. Sendo assim, é possível estimar os riscos de obter resultados fora do desejado para cada ponto dentro dos limites estudados experimentalmente^{56,158,159}.

As distribuições das respostas previstas simulam uma situação real com uma combinação aleatória dos fatores dentro dos limites estudados, abrangendo 1210 combinações dos fatores (X1 à X6) com 1000 simulações para cada combinação.

A região operável resultante apresentou limites operacionais para proporção de metanol (X1) de 40 a 80%, para proporção de acetonitrila (X2) de 60 a 20%, para pH (X3) de 6,2 a 7,7; para temperatura (X4) de 32,5 a 40°C; para fluxo (X5) de 0,3 a 0,46 mL.min⁻¹; e para volume de injeção (X6) de 13 a 20 µL. Dentro desses limites, 186 combinações de fatores (condições analíticas) apresentaram risco de até 5% de as respostas obtidas estarem fora do esperado (Tabela 10). As condições ótimas do método discutidas previamente apresentam risco menor do que 0,1%.

As regiões operáveis do método foram definidas combinando-se os fatores de entrada dois a dois, de forma a atender simultaneamente a todas as respostas (Tabela 10), com confiabilidade de 95% (risco máximo de 5%). As regiões operáveis são mostradas na Figura 20, onde: X1 = proporção de metanol; X3 = pH; X4 = temperatura da coluna; X5 = fluxo e X6 = volume de injeção.

Figura 20 – Regiões operáveis do método com probabilidade de falha de até 5% quanto ao atendimento a todos os atributos desejados simultaneamente.

A região operável do método obtida pelo método de Monte Carlo é relativamente menor do que a obtida por outros métodos (como análise de superfície de resposta por gráficos de contorno sobrepostos). Isso é devido à alta probabilidade (geralmente de 95 a 99%) de todos os atributos requeridos serem atendidos, o que garante uma região robusta na qual pode-se trabalhar com confiança ¹⁶⁰⁻¹⁶².

Dito isso, a otimização do método resultou em regiões operáveis com intervalos abrangentes para a maioria dos fatores, com menor possibilidade de variação para os fatores pH (X3) e temperatura da coluna (X4) (Figura 20). Desse modo, o método otimizado permite flexibilidade analítica com qualidade garantida.

Alterações nos fatores dentro da região operável do método não são consideradas como mudanças significativas, apresentando confiabilidade para as respostas estarem dentro dos limites desejados. Assim, qualquer combinação de fatores (X1 a X6) dentro dessa região pode ser escolhida como condições de trabalho ^{146,163}.

11.3.2. Avaliação da incerteza de medição, dos riscos de decisão falsa e seus custos relativos

O desempenho do método de acordo com o perfil analítico alvo foi verificado nas condições ótimas de trabalho, com base na IM e nos riscos de tomada de decisão errada.

A IM foi estimada pelo método de propagação de incertezas (Tabela 12), obtendo-se incerteza padrão combinada $u_c = 0,67\%$ e incerteza expandida $U = 1,4\%$, valores que condizem com o que esperávamos do método otimizado. Comparando-se ao método original, o método otimizado apresentou uma redução de 61,5% do valor de IM.

Tabela 12 – Descrição das fontes individuais de incerteza associadas ao método otimizado.

Fonte de incerteza	Símbolo	Valor	Distribuição	u
Área da solução teste	A_t	15504464	Normal	7209
Área da solução padrão	A_s	14995401	Normal	11537
Massa do padrão (mg)	m_s	25,6	Normal	0,19
Pureza do padrão	P_s	0,998	Retangular	0,0012
Balão volumétrico 1 (mL)	V_{f1}	100	Triangular	0,064
Balão volumétrico 2 (mL)	V_{f2}	100	Triangular	0,064
Balão volumétrico 3 (mL)	V_{f3}	100	Triangular	0,064
Pipeta volumétrica (mL)	V_{p1}	4	Triangular	0,007
Massa do teste (mg)	m_t	104,8	Normal	0,19

u = incerteza padrão.

Em seguida, os riscos de tomada de decisão falsa foram estimados, considerando o método original e o obtido pela otimização. Primeiramente, foram calculados os riscos específicos pela abordagem frequentista, utilizando a planilha “*Spreadsheet Frequentist Risk.xlsx*” (Anexo 2), disponível como material suplementar de um estudo prévio publicado ¹⁴¹. Esse tipo de risco considera o valor do resultado analítico, a faixa de especificação, e a IM com o fator de abrangência adotado.

O teor da amostra obtido pelo método original (102,99%) foi comparado ao obtido pelo método otimizado (100,82%) de acordo com a Equação 11, sendo que valores $z \leq 2$ indicam medidas consistentes, $2 < z \leq 3$ questionáveis e $z > 3$ medidas inconsistentes ¹⁶⁴. Como obtivemos valor $z = 1,15$, pudemos considerar os teores da amostra para ambos os métodos metrologicamente compatíveis, e, portanto, utilizamos o resultado analítico de cada método para estimar seus respectivos riscos específicos.

Equação 11 – Teste de compatibilidade metrológica de acordo com valor z.

$$z = \frac{|m_{otm} - m_{orig}|}{\sqrt{u_{motm}^2 + u_{morig}^2}} \leq 2 \quad (11)$$

Onde: m_{otm} = teor da amostra obtido pelo método otimizado; m_{orig} = teor da amostra obtido pelo método original; u_{motm} = incerteza combinada padrão do método otimizado; u_{morig} = incerteza combinada padrão do método original.

Como os teores se encontram dentro dos limites de especificação de 95-105%, os riscos específicos serão do consumidor, ou seja, refletem a probabilidade de se aprovar

a amostra erroneamente. Além disso, a planilha mostra os valores de *guard band*, ou nesse caso, intervalo de aceitação, que terá limites mais restritos do que os de especificação, garantindo que os valores de resultados analíticos dentro desse intervalo apresentem risco do consumidor de no máximo 5% ^{122,141}.

Para o método original, considerando o teor da amostra de 102,99% e incerteza expandida $U = 3,5\%$, foi obtido um risco específico do consumidor de 12,6% e intervalo de aceitação de 97,9 à 102,1%. Enquanto que para o método otimizado, considerando o teor de 100,82% e $U = 1,4\%$, o risco específico do consumidor foi de 0,0% e o intervalo de aceitação de 96,1 à 103,9%.

A planilha citada para cálculo dos riscos frequentistas cria um gráfico que mostra os riscos específicos para resultados analíticos de 90-110%, considerando a IM, a faixa de especificação (95-105%, nesse caso) e a *guard band*. A Figura 21 mostra esses gráficos para o método original e para o método otimizado. Podemos notar como o intervalo de aceitação do método otimizado é mais amplo, se aproximando mais dos limites de especificação. Isso quer dizer que na rotina de uso desse método, haverá uma faixa mais ampla de resultados confiáveis, havendo menor necessidade de investigações de resultados ou retrabalhos.

Figura 21 – Riscos específicos de acordo com resultados analíticos para o método original (A) e método otimizado (B).

Também foram estimados os riscos globais pela abordagem Bayesiana para ambos os métodos. Diferente dos riscos específicos que são baseados no resultado analítico, os riscos globais refletem as probabilidades de decisão errada para um item ou lote que ainda será testado, sendo assim, são estimados os riscos do consumidor e do produtor ^{119,141}. Nesse caso, é necessária informação prévia do processo produtivo ou histórico de produção, além do valor da incerteza padrão combinada e da faixa de especificação.

Os riscos globais foram estimados com auxílio do software Minitab[®] versão 17, utilizando simulações de Monte Carlo. Para ambos os métodos foi considerado um mesmo processo produtivo com índice de capacidade $C_{pk} = 0,83$ (média de 100%, desvio padrão de 2% e considerando faixa de especificação de 95-105%) ¹¹⁹. Como distribuição prévia, foram geradas 100.000 simulações de lotes do processo citado, assumindo distribuição normal. Para as simulações intermediárias, 100.000 valores foram gerados com distribuição normal, média 0 e desvio padrão igual ao valor de incerteza padrão combinada de cada método. Finalmente, as distribuições posteriores, representando os resultados das medições de teor para cada método, foram obtidas pela soma dos valores gerados para a distribuição prévia com os valores gerados nas simulações intermediárias para cada método.

A partir das simulações de Monte Carlo, comparamos a frequência dos teores da distribuição prévia com a frequência dos teores da distribuição posterior, quanto a

estarem conforme ou não conforme a especificação (Tabela 2). De acordo com essa comparação, os riscos globais são calculados considerando-se a quantidade de lotes erroneamente aprovados (risco do consumidor) e a quantidade de lotes erroneamente reprovados (risco do produtor) (Equações 5 e 6).

Considerando as incertezas padrão combinadas $u_c = 1,75\%$ e $u_c = 0,67\%$ para o método original e otimizado, respectivamente, foram obtidos risco global do produtor de 5,15 e 0,77% e risco global do consumidor de 0,45 e 0,27%, para o método original e otimizado, respectivamente. Sendo assim, para o método otimizado, o risco global do produtor foi reduzido em 85% e o risco global do consumidor foi reduzido em 40%.

Os riscos globais do produtor se encontraram maiores do que os riscos globais do consumidor devido à influência da distribuição prévia na posterior, ou seja, as medidas de teor simuladas são deslocadas de acordo com a capacidade do processo produtivo de produzir lotes dentro de especificação. Sendo assim, de um modo geral é esperado que quanto maior a capacidade do processo, maior seja o risco global do produtor em relação ao risco global do consumidor ¹⁴¹.

A partir das simulações de Monte Carlo para as estimativas dos riscos globais, foi estabelecida uma matriz de custo tendo como base os lotes (teor) e resultados simulados que ficaram conforme ou não conforme a especificação, para o método antes e depois da otimização, atribuindo um custo para cada caso (Tabela 13).

Tabela 13 – Matriz de custo do método original e otimizado.

Método original			Método otimizado	
Teor	Resultado		Resultado	
	C	NC	C	NC
C	93614 (1)	5148 (10)	97996 (1)	766 (10)
NC	449 (20)	789 (2)	274 (20)	964 (2)
Custo final: 155652			Custo final: 113064	

C = conforme a especificação; NC = não conforme a especificação; custo = contagem * (custo relativo); custo final = soma dos custos referentes ao método.

Para as decisões certas definimos como custo 1 a aprovação de um lote conforme (melhor caso), e consideramos o dobro desse custo (2) para reprovação de um lote não conforme. Para as decisões erradas, consideramos o custo para reprovação de um lote conforme (risco do produtor) como sendo dez vezes maior do que o custo do melhor

caso (10), e consideramos o dobro do custo do risco do produtor (20) para aprovação de um lote não conforme (risco do consumidor – pior caso), conforme Tabela 13. Comparando os custos finais do método antes e após otimização (155652 e 113064, respectivamente), temos uma redução de 27,4% de custos relacionados à tomada de decisão na conformidade com o método otimizado.

Finalmente, ao adotar o método otimizado numa rotina de análises, pode-se dar continuidade à abordagem AQbD por meio de estratégias de controle contínuo, que permitem que o método sempre cumpra seu propósito. Para tal, pode-se acompanhar o processo e o método e suas condições na rotina, e verificar a adequabilidade do sistema de acordo com as respostas cromatográficas ótimas (Tabela 10) e o desempenho de acordo com a incerteza de medição regularmente, inclusive avaliando os riscos de tomada de decisão. Se alguma mudança se tornar necessária, pode-se avaliar de acordo com a região operável do método, ou, se necessário, reiniciar o ciclo das etapas do AQbD.

12. CONCLUSÃO

O método de doseamento de cloridrato de terbinafina em cremes por HPLC foi verificado quanto à linearidade, exatidão, precisão e incerteza de medição pela abordagem *top-down*, obtendo-se resultados equivalentes aos publicados no artigo de referência. Em seguida, a incerteza foi avaliada utilizando abordagem *bottom-up*, pelo método de propagação de incertezas, método da planilha de Kragten e método de Monte Carlo. Por esta abordagem, obtemos um valor de incerteza de medição mais realista, por levar em consideração cada fonte de incerteza do método. Como esperado, o valor de incerteza de medição foi alto (2,8 vezes maior que o recomendado).

Com o principal objetivo de redução da incerteza de medição, aplicamos conceitos e ferramentas do *Analytical Quality by Design*. Após a avaliação das fontes de incerteza do método, foram identificados os atributos e fatores de interesse, considerando a fonte de incerteza crítica (massa pesada do padrão). Assim, realizamos planejamento fatorial com ponto central. Os modelos obtidos se mostraram adequados e com boa capacidade de previsão. A partir dos modelos obtidos, foram definidos os limites desejados de resposta, e simulações de Monte Carlo foram utilizadas a fim de se obter as regiões operáveis do método com probabilidades de falha de até 5%. O método

em suas condições ótimas foi verificado quanto à incerteza de medição e aos riscos de decisão falsa.

O método otimizado apresentou redução expressiva da incerteza de medição (61,5%) em relação ao método original. Na avaliação dos riscos frequentistas, o método otimizado apresentou maior intervalo de aceitação, o que confere maior confiabilidade dos resultados obtidos por este método. Quanto aos riscos globais, o método otimizado apresentou redução considerável para o risco do produtor (85%) e do consumidor (40%). Adicionalmente, os métodos antes e após otimização foram avaliados quanto aos custos relativos às tomadas de decisões na conformidade, sendo que o método otimizado obteve uma redução de 27,4% de custo quando comparado ao método original, demonstrando uma vantagem econômica tanto para os produtores quanto para os consumidores, devido à maior confiabilidade nas tomadas de decisão.

Dessa forma, o método obtido pelas estratégias de otimização deste trabalho se mostrou adequado ao seu propósito, com capacidade de obter as melhores respostas cromatográficas com incerteza de medição, riscos e custos de tomada de decisão na conformidade consideravelmente reduzidos.

Esta parte do trabalho foi submetida para publicação em periódico de alto fator de impacto assim como as demais partes até então.

CONCLUSÕES

Nas primeiras etapas deste trabalho foi possível verificar a importância da incerteza de medição como parâmetro a ser considerado durante o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, tendo como base a avaliação de métodos de cromatografia líquida utilizados para determinação de antibióticos e antifúngicos.

Ademais, foram discutidas as diferentes abordagens e aplicações das estimativas dos riscos de tomada de decisão, adquirindo um entendimento mais amplo e crítico do impacto do desempenho dos métodos analíticos na avaliação da conformidade, visando garantir resultados analíticos mais confiáveis.

Na última etapa realizada demonstramos como o *Analytical Quality by Design* e suas ferramentas podem auxiliar na otimização de métodos analíticos, para obtenção de métodos robustos e com melhor desempenho, com base na incerteza de medição e riscos de tomada de decisão na conformidade, conferindo maior confiabilidade para os produtores e consumidores de medicamentos, assim como reduzindo os custos envolvidos.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ellison, S. L. R. & Williams (eds.), A. *Eurachem/CITAC Guide: Quantifying uncertainty in analytical measurement*. (2012).
2. Imai, H. Expanding needs for metrological traceability and measurement uncertainty. *Measurement* **46**, 2942–2945 (2013).
3. Mueller, N. Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025. *Accredit. Qual. Assur.* **7**, 79–80 (2002).
4. Albano, F. de M. & Caten, C. S. ten. Analysis of the relationships between proficiency testing, validation of methods and estimation of measurement uncertainty: A qualitative study with experts. *Accredit. Qual. Assur.* **21**, 161–166 (2016).
5. Williams, A. Introduction to measurement uncertainty in chemical analysis. *Accredit. Qual. Assur.* **3**, 92–94 (1998).
6. Ellison, S. L. R. & Barwick, V. J. Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach. *Accredit. Qual. Assur.* **3**, 101–105 (1998).
7. Desimoni, E. & Brunetti, B. Uncertainty of measurement and conformity assessment: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 1729–1741 (2011).
8. J. N. Bettencourt da Silva, R. Setting target measurement uncertainty in water analysis. *Water* **5**, 1279–1302 (2013).
9. Désenfant, M. & Priel, M. Reference and additional methods for measurement uncertainty evaluation. *Measurement* **95**, 339–344 (2017).
10. C. W. S. Eller, S. *et al.* Analysis of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in urine samples by hollow fiber-liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in consideration of measurement uncertainty. *Forensic Toxicol.* **32**, 282–291 (2014).
11. Leito, I., Strauss, L., Koort, E. & Pihl, V. Estimation of uncertainty in routine pH measurement. *Accredit. Qual. Assur.* **7**, 242–249 (2002).
12. Chui, Q. S. H., Antonoff, H. B. & Olivieri, J. C. Utilização de índices r e R obtidos de programas interlaboratoriais para o controle de precisão de método analítico: Determinação de água por Karl Fischer. *Quim. Nova* **25**, 657–659 (2002).
13. Paakkunainen, M. *et al.* Uncertainty in dissolution test of drug release. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **97**, 82–90 (2009).
14. Rodrigues, J., J. N. Bettencourt da Silva, R., F. G. F. C. Camões, M. & M. Oliveira, C. Designing valid and optimised standard addition calibrations: Application to the determination of anions in seawater. *Talanta* **142**, 72–83 (2015).
15. R. Lourenço, F., M. O. Amaral, C., C. Azevedo, J. & J. A. Pinto, T. Estimativa da incerteza de mediação em contagem microbiana pelo método de semeadura em profundidade a partir dos resultados de validação. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **40**,

- 181–183 (2004).
16. R. Lourenco, F., S. Botelho, T. & J. A. Pinto, T. How pH, temperature, and time of incubation affect false-positive responses and uncertainty of the LAL gel-clot test. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **66**, 542–546 (2012).
 17. R. Lourenço, F., M. Kaneko, T. & J. A. Pinto, T. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **41**, 438–443 (2005).
 18. Niemi, R. M. & Niemelä, S. I. Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods. *Accredit. Qual. Assur.* **6**, 372–375 (2001).
 19. Ostronoff, C. S. & Lourenço, F. R. Measurement uncertainty of chromogenic LAL assays: Reaction time and proportion of endotoxin and LAL reagent affect release of p-nitroaniline. *J. AOAC Int.* **98**, 51–55 (2015).
 20. Ghisleni, D. D. M., Okamoto, R. T., Amaral, C. M. O., Lourenço, F. R. & Pinto, T. J. A. New microbiological assay for determination of caspofungin in the presence of its degradation products and its measurement uncertainty. *J. AOAC Int.* **97**, 908–912 (2014).
 21. Lourenço, F. R. Uncertainty measurement of microbiological assay for apramycin soluble powder. *Lat. Am. J. Pharm.* **32**, 640–645 (2013).
 22. Lourenço, F. R., Kaneko, T. M. & Pinto, T. J. A. Evaluating measurement uncertainty in the microbiological assay of vancomycin from methodology validation data. *J. AOAC Int.* **90**, 1383–1386 (2007).
 23. Saviano, A. M., Francisco, F. L. & Lourenço, F. R. Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty. *Talanta* **127**, 225–229 (2014).
 24. Moreira, C. S. & Lourenço, F. R. In vitro therapeutic equivalence of acetaminophen oral solution in dropper bottles. *Lat. Am. J. Pharm.* **34**, 78–85 (2015).
 25. Okamoto, R. T., Traple, M. A. L. & Lourenco, F. R. Uncertainty in the quantification of metronidazole in injectable solution and its application in the assessment of pharmaceutical equivalence. *Curr. Pharm. Anal.* **9**, 355–362 (2013).
 26. Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Uncertainty evaluation for determining linezolid in injectable solution by UV spectrophotometry. *Measurement* **46**, 3924–3928 (2013).
 27. Takano, D. E. N., Reis, P. R. de S., Singh, A. K. & Lourenço, F. R. Estimation of uncertainty for measuring desloratadine in tablets formulation using UV spectrophotometry. *Measurement* **101**, 40–44 (2017).
 28. Anglov, T. *et al.* Uncertainty budget for final assay of a pharmaceutical product based on RP-HPLC. *Accredit. Qual. Assur.* **8**, 225–230 (2003).
 29. Barwick, V. J., Ellison, S. L. ., Lucking, C. L. & Burn, M. J. Experimental studies of uncertainties associated with chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **918**, 267–276 (2001).
 30. Ghisleni, D. D. M., Okamoto, R. T., Lourenco, F. R. & Pinto, T. J. A. Validation

- and measurement uncertainty of an UPLC-PDA stability indicating method applied to degradation kinetics of caspofungin. *Curr. Pharm. Anal.* **10**, 193–202 (2014).
31. Leito, S., Mölder, K., Künnapas, A., Herodes, K. & Leito, I. Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources. *J. Chromatogr. A* **1121**, 55–63 (2006).
 32. Saviano, A. M., Madruga, R. O. G. & Lourenço, F. R. Measurement uncertainty of a UPLC stability indicating method for determination of linezolid in dosage forms. *Measurement* **59**, 1–8 (2015).
 33. J. N. Bettencourt da Silva, R., M. Silveira, D., F. G. F.C. Camões, M., M. F. Borges, C. & A. S. Salgueiro, P. Validation, uncertainty, and quality control of qualitative analysis of tear gas weapons by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Lett.* **47**, 250–267 (2014).
 34. Ghisleni, D. D. M., Okamoto, R. T., Lourenço, F. R. & Pinto, T. J. A. An alternative capillary electrophoresis method for the quantification of caspofungin in lyophilisate powder and its measurement uncertainty. *African J. Pharm. Pharmacol.* **8**, 1025–1032 (2014).
 35. A. L. Traple, M., M. Saviano, A., L. Francisco, F. & R. Lourenço, F. Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. *J. Pharm. Anal.* **4**, 1–5 (2014).
 36. Separovic, L., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Using measurement uncertainty to assess the fitness for purpose of an HPLC analytical method in the pharmaceutical industry. *Measurement* **119**, 41–45 (2018).
 37. A. R. Hassan, B. HPLC uses and importance in the pharmaceutical analysis and industrial field. *Pharm. Anal. Acta* **3**, (2012).
 38. Separovic, L. *et al.* Measurement uncertainty and conformity assessment applied to drug and medicine analyses – A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1–16 (2021) doi:10.1080/10408347.2021.1940086.
 39. Chen, A. & Chen, C. Comparison of GUM and Monte Carlo methods for evaluating measurement uncertainty of perspiration measurement systems. *Measurement* **87**, 27–37 (2016).
 40. B. Motra, H., Hildebrand, J. & Wuttke, F. The Monte Carlo Method for evaluating measurement uncertainty: Application for determining the properties of materials. *Probabilistic Eng. Mech.* **45**, 220–228 (2016).
 41. Francisco, F. L., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Measuring uncertainty using different approaches: A case study for acetaminophen quantification. *J. AOAC Int.* **99**, 612–617 (2016).
 42. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) & Ministério da Saúde. RDC nº 166/2017: Validação de métodos analíticos. 21 (2017).
 43. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). RE nº 899/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Brasil* (2003).
 44. International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonization (2005).

45. Food and Drug Administration (FDA). *Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research* (1994).
46. United States Pharmacopeia & National Formulary. <1225> Validation of compendial methods. in *United States Pharmacopeia (USP) 32-NF 27* (2009).
47. Dalalah, D. & B. Hani, D. A precision-to-tolerance ratio model for the assessment of measurements uncertainty. *Precis. Eng.* **44**, 143–151 (2016).
48. Kuselman, I. *et al.* Long-term stability study of drug products and out-of-specification test results. *Accredit. Qual. Assur.* **16**, 615–622 (2011).
49. Küppers, S. The application of the measurement uncertainty concept to in-process control in pharmaceutical development. *Accredit. Qual. Assur.* **2**, 30–35 (1997).
50. L. Barnet, K. *et al.* Analytical Target Profile: Structure and application throughout the analytical lifecycle. *Pharmacopeial Forum* **42**, (2016).
51. Burgess, C. *et al.* Fitness for use: Decision rules and target measurement uncertainty. *Pharmacopeial Forum* **42**, (2016).
52. Zacharis, C. K. & Vastardi, E. Application of analytical quality by design principles for the determination of alkyl p-toluenesulfonates impurities in Aprepitant by HPLC. Validation using total-error concept. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **150**, 152–161 (2018).
53. Bhutani, H., Kurmi, M., Singh, S., Beg, S. & Singh, B. Quality by Design (QbD) in analytical sciences: An overview. *Pharma Times* **46**, 71–75 (2014).
54. Parr, M. K. & Schmidt, A. H. Life cycle management of analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**, 506–517 (2018).
55. L. Reid, G. *et al.* Analytical Quality by Design (AQbD) in pharmaceutical development. *Am. Pharm. Rev.* **16**, (2013).
56. Deidda, R., Orlandini, S., Hubert, P. & Hubert, C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **161**, 110–121 (2018).
57. A. Bezerra, M., E. Santelli, R., P. Oliveira, E., S. Villar, L. & A. Escaleira, L. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965–977 (2008).
58. Candioti, L. V., De Zan, M. M., Cámara, M. S. & Goicoechea, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* **124**, 123–138 (2014).
59. J. N. Bettencourt da Silva, R. Spreadsheet for designing valid least-squares calibrations: A tutorial. *Talanta* **148**, 177–190 (2016).
60. Kovacs, E. *et al.* Analytical control strategy. *Pharmacopeial Forum* **42**, (2016).
61. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 100. *Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement.* (2008).
62. Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H. & Krysell, M. *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. NORDTEST 1589-02*

- (2012).
63. T. da Silva Junior, O., R. Santiago, P., A. A. L. Curiacos, J. & W. dos Santos, J. Accuracy and reliability of a videogrammetry system in the analysis of displacement of Wistar rats. *Motriz* **23**, 1–6 (2017).
 64. Bettencourt da Silva, R. & Williams (eds.), A. *Eurachem/CITAC Guide: Setting and using target uncertainty in chemical measurement*. (2015).
 65. Rozet, E. *et al.* Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. *Anal. Chim. Acta* **702**, 160–171 (2011).
 66. World Health Organization (WHO). *Antimicrobial resistance. Global report on surveillance*. World Health Organization (2014).
 67. L. F. Santos, S., B. N. T. Barros, K., M. S. Prado, R. & R. A. M. Oliveira, F. Aspectos toxicológicos do descarte de medicamentos: Uma questão de educação em saúde [Toxicological aspects of drug disposal: A question of health education]. *Revinter* **09**, 7–20 (2016).
 68. Chevillotte, G., S. Ficheux, A., Morisset, T. & C. Roudot, A. Exposure method development for risk assessment to cosmetic products using a standard composition. *Food Chem. Toxicol.* **68**, 108–116 (2014).
 69. P. Buslenko, N., I. Golenko, D., M. Sobol', I. & G. Sragovich, V. Principles of the Monte Carlo Method. in *The Monte Carlo Method* (ed. A. Shreider, Y.) 1–90 (1966). doi:10.1016/B978-0-08-011088-2.50005-5.
 70. Sahu, P. K. *et al.* An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147**, 590–611 (2018).
 71. L. Colombo, A. *et al.* Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: Results from the division of infectious diseases, UNIFESP. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* **81**, 571–587 (2009).
 72. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). *Farmacopeia Brasileira. Brasil* vol. 2 (2010).
 73. L. Pearn, W., C. Wu, C. & H. Wu, C. Estimating process capability index Cpk: Classical approach versus Bayesian approach. *J. Stat. Comput. Simul.* **85**, 2007–2021 (2015).
 74. Wang, Z. *et al.* Determination of enantiomeric impurity in besifloxacin hydrochloride by chiral high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *Chirality* **24**, 526–531 (2012).
 75. M. da Silva, L. & R. N. Salgado, H. Validation of a stability-indicating RP-LC method for the determination of tigecycline in lyophilized powder. *J. Chromatogr. Sci.* **51**, 192–199 (2012).
 76. Mantovani, L. *et al.* Stability-indicating RP-HPLC method for analysis of the antibiotic doripenem in pharmaceutical formulation—comparison to UV spectrophotometry and microbiological assay. *Acta Chromatogr.* **24**, 367–382 (2012).
 77. Lourenco, F. R. Simple estimation of uncertainty in the quantification of cefazolin by HPLC and bioassay. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **3**, 153–155 (2012).

78. C. R. Corrêa, J., Reichman, C., R. N. Salgado, H. & D. Vianna-Soares, C. Performance characteristics of high performance liquid chromatography, first order derivative UV spectrophotometry and bioassay for fluconazole determination in capsules. *Quim. Nova* **35**, 530–534 (2012).
79. A. Abdelaziz, A., E. Elbanna, T. & M. Gamaleldeen, N. Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma. *Brazilian J. Microbiol.* **43**, 1291–1301 (2012).
80. M. Annapurna, M., V. S. Goutam, S., Anusha, S. & Srinivas, L. Development and validation of the stability-indicating LC-UV method for the determination of cefditoren pivoxil. *J. Pharm. Anal.* **2**, 466–469 (2012).
81. Tan, L. *et al.* A high pH based reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside plazomicin and its impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **66**, 75–84 (2012).
82. C. Miguel, G., A. Orlando, E. & V. C. Simionato, A. Quantificação de antibióticos beta-lactâmicos em medicamentos veterinários: Determinação de amoxicilina e ampicilina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova* **36**, 1214–1221 (2013).
83. C. Kogawa, A. & R. N. Salgado, H. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *J. Chromatogr. Sci.* **51**, 919–925 (2013).
84. Manyanga, V., Elkady, E., Hoogmartens, J. & Adams, E. Improved reversed phase liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for tobramycin in bulk and pharmaceutical formulation. *J. Pharm. Anal.* **3**, 161–167 (2013).
85. C. Archakam, S. *et al.* Quantitative estimation of ceftibuten by RP-HPLC method in bulk and capsule dosage form. *J. Pharm. Res.* **6**, 395–400 (2013).
86. Palur, K. *et al.* RP-HPLC method for the estimation of ceftiofur hydrochloride in bulk form. *J. Pharm. Res.* **7**, 246–251 (2013).
87. K. Mbinze, J. *et al.* Application of an innovative design space optimization strategy to the development of LC methods for the simultaneous screening of antibiotics to combat poor quality medicines. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **85**, 83–92 (2013).
88. Kahsay, G., O. Adegoke, A., Van Schepdael, A. & Adams, E. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **80**, 9–17 (2013).
89. K. Vujanović, I. *et al.* Chemometrically assisted optimization and validation of RP-HPLC method for the analysis of itraconazole and its impurities. *Acta Pharm.* **63**, 159–173 (2013).
90. Kassem, H. & A. Almardini, M. High performance liquid chromatography method for the determination of terbinafine hydrochloride in semi solids dosage form. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **21**, 58–61 (2013).
91. Miron, D., Lange, A., R. Zimmer, A., Mayorga, P. & E. S. Schapoval, E. HPLC-DAD for the determination of three different classes of antifungals: Method characterization, statistical approach, and application to a permeation study.

- Biomed. Chromatogr.* **28**, 1728–1737 (2014).
92. Francisco, F. L., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. In vitro therapeutic equivalence of ciprofloxacin ophthalmic drugs based on measurement uncertainty and Monte Carlo simulations. *Lat. Am. J. Pharm.* **33**, 237–244 (2014).
 93. A. L. Traple, M., T. Okamoto, R., N. Yamamoto, R., J. A. Pinto, T. & R. Lourenço, F. A new multivariate similarity factor for in vitro therapeutic equivalence assessment. *African J. Pharm. Pharmacol.* **8**, 185–193 (2014).
 94. C. N. Costa, M., T. Barden, A., M. M. Andrade, J., P. Oppe, T. & E. S. Schapoval, E. Quantitative evaluation of besifloxacin ophthalmic suspension by HPLC, application to bioassay method and cytotoxicity studies. *Talanta* **119**, 367–374 (2014).
 95. Zeng, A. *et al.* Determination of azithromycin in raw materials and pharmaceutical formulations by HPLC coupled with an evaporative light scattering detector. *Asian J. Pharm. Sci.* **9**, 107–116 (2014).
 96. R. Marwada, K. *et al.* Ultraviolet spectrophotometry (dual wavelength and chemometric) and high performance liquid chromatography for simultaneous estimation of meropenem and sulbactam sodium in pharmaceutical dosage form. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **124**, 292–299 (2014).
 97. M. Pedroso, T. & R. N. Salgado, H. Validation of analytical methodology for quantification of cefazolin sodium pharmaceutical dosage form by high performance liquid chromatography to be applied for quality control in pharmaceutical industry. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **50**, 213–223 (2014).
 98. S. Rugani, K. & R. N. Salgado, H. Stability-indicating LC method for the determination of cephalothin in lyophilized powder for injection. *Anal. Methods* **6**, 4437–4445 (2014).
 99. P. Christ, A. *et al.* Development and validation of a stability-indication LC-UV method for determination of daptomycin injectable form and kinetic study in alkaline medium. *Anal. Methods* **6**, 1242–1247 (2014).
 100. K. Penmatsa, V. & Basavaiah, K. Simple, sensitive and stability indicating high performance liquid chromatographic assay of terbinafine hydrochloride in dosage forms. *Am. J. PharmTech Res.* **4**, 899–916 (2014).
 101. M. Patel, M. & D. Patel, H. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of terbinafine hydrochloride and mometasone furoate in combined dosage form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6**, 106–109 (2014).
 102. Tian, T. *et al.* Development and validation of stability-indicating method for the simultaneous determination of ketoconazole and beauvericin in pharmaceutical tablets. *J. Chromatogr. Sci.* **54**, 361–366 (2015).
 103. A. Aljuffali, I., A. Kalam, M., Sultana, Y., Imran, A. & Alshamsan, A. Development and validation of stability-indicating high performance liquid chromatography method to analyze gatifloxacin in bulk drug and pharmaceutical preparations. *Saudi Pharm. J.* **23**, 85–94 (2015).
 104. G. Tótolli, E. & R. N. Salgado, H. Development, optimization, and validation of a green and stability-indicating HPLC method for determination of daptomycin in lyophilized powder. *J. AOAC Int.* **98**, 1276–1285 (2015).

105. M. Curbete, M. & R. N. Salgado, H. Stability-indicating RP-LC method for quantification of fusidic acid in cream. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **52**, 447–457 (2016).
106. Pathak, S., P. Agrawal, G. & Mishra, P. Development and validation of stability indicating assay for griseofulvin by RP-HPLC in tablet dosage form. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **8**, 131–134 (2016).
107. N. Uddin, M. *et al.* Simultaneous determination of amoxicillin and chloramphenicol and their drug interaction study by the validated UPLC method. *J. Taibah Univ. Sci.* **10**, 755–765 (2016).
108. Maia, A. S., Castro, P. M. L. & Tiritan, M. E. Integrated liquid chromatography method in enantioselective studies: Biodegradation of ofloxacin by an activated sludge consortium. *J. Chromatogr. B* **1029–1030**, 174–183 (2016).
109. F. Rodrigues, D. & R. N. Salgado, H. Development and validation of a green analytical method of RP-HPLC for quantification of cefepime hydrochloride in pharmaceutical dosage form: Simple, sensitive and economic. *Curr. Pharm. Anal.* **12**, 306–314 (2016).
110. M. Pedroso, T., C. D. Medeiros, A. & R. N. Salgado, H. RP-HPLC $\times$ HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. *Talanta* **160**, 745–753 (2016).
111. S. Barbosa, F. *et al.* Stability of doripenem in reconstituted solution – Thermal and oxidative decomposition kinetics and degradation products by LC–MS. *Biomed. Chromatogr.* **31**, 1–10 (2017).
112. Mallikarjuna Rao, N. & Gowrisankar, D. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for the assay of pristinamycin in bulk and tablet dosage form. *Sci. Pharm.* **84**, 279–287 (2016).
113. R. Meyer, V. Measurement uncertainty of liquid chromatographic analyses visualized by Ishikawa diagrams. *J. Chromatogr. Sci.* **41**, 439–443 (2003).
114. Álvarez, E., J. Moya-Fernández, P., J. Blanco-Encomienda, F. & F. Muñoz, J. Methodological insights for industrial quality control management: The impact of various estimators of the standard deviation on the process capability index. *J. King Saud Univ. - Sci.* **27**, 271–277 (2015).
115. P. Anjard Sr, R. *et al.* Cpk applications – Uses and abuses. *Microelectron. Reliab.* **31**, 1123–1125 (1991).
116. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 106. *Evaluation of measurement data – The role of measurement uncertainty in conformity assessment.* (2012).
117. Lourenço, F. R. & Bettencourt da Silva, R. J. N. Risk of false conformity decisions of multicomponent items controlled by correlated measurement results due to the sharing of analytical steps. *Talanta* **196**, 174–181 (2019).
118. Kuselman, I., Pennecchi, F., da Silva, R. J. N. B. & Hibbert, D. B. Conformity assessment of multicomponent materials or objects: Risk of false decisions due to measurement uncertainty – A case study of denatured alcohols. *Talanta* **164**, 189–195 (2017).
119. Separovic, L. & Lourenço, F. R. Measurement uncertainty and risk of false

- conformity decision in the performance evaluation of liquid chromatography analytical procedures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **171**, 73–80 (2019).
120. Separovic, L., Bertanha, M. L. de G., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Conformity decisions based on measurement uncertainty—A case study applied to agar diffusion microbiological assay. *J. Pharm. Innov.* 1–6 (2019) doi:10.1007/s12247-019-09374-8.
 121. Pennecchi, F. R., Kuselman, I., da Silva, R. J. N. B. & Hibbert, D. B. Risk of a false decision on conformity of an environmental compartment due to measurement uncertainty of concentrations of two or more pollutants. *Chemosphere* **202**, 165–176 (2018).
 122. Ellison, S. L. R. & Williams (eds.), A. *Eurachem/CITAC Guide: Use of uncertainty information in compliance assessment*. (2007).
 123. B. da Silva, R. J. N., Pennecchi, F. R., Hibbert, D. B. & Kuselman, I. Tutorial and spreadsheets for Bayesian evaluation of risks of false decisions on conformity of a multicomponent material or object due to measurement uncertainty. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **182**, 109–116 (2018).
 124. Ribeiro, Á. S., Gölze, M. & EUROLAB TCQA Members. *EUROLAB Technical Report No.1/2017 - Decision rules applied to conformity assessment*. (2017).
 125. Pendrill, L. R. Using measurement uncertainty in decision-making and conformity assessment. *Metrologia* **51**, S206–S218 (2014).
 126. Saffaj, T. *et al.* An overall uncertainty approach for the validation of analytical separation methods. *Analyst* **138**, 4677 (2013).
 127. Bouchafra, H. *et al.* Application of a new strategy of validation based on ‘ β, γ -content tolerance interval’ for checking the chiral chromatography method for quantification of the chiral impurity of levofloxacin. *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 500–509 (2016).
 128. ILAC-G8. *Guidelines on decision rules and statements of conformity*. (2019).
 129. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
 130. Kanakapura, B. & Penmatsa, V. K. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. *J. Pharm. Anal.* **6**, 137–149 (2016).
 131. Oliveira, J. R. de, Mazocco, V. T. & Steiner, D. Pitiríase Versicolor. *An. Bras. Dermatol.* **77**, 611–618 (2002).
 132. ABNT. *ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. (2005).
 133. Lorêdo de França, M. *et al.* Determining uncertainty in a simple UV–Vis spectrometry method employing dimethyl carbonate as green solvent for lead determination in water. *Measurement* **173**, 1–7 (2021).
 134. Kragten, J. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* **119**, 2161–2165 (1994).
 135. Ellison, S. L. R. Including correlation effects in an improved spreadsheet calculation of combined standard uncertainties. *Accredit. Qual. Assur.* **10**, 338–

- 343 (2005).
136. Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Determination of intrinsic and metrological components of the correlation of multiparameter products for minimising the risks of false conformity decisions. *Measurement* **180**, 1–9 (2021).
 137. Kroese, D. P., Brereton, T., Taimre, T. & Botev, Z. I. Why the Monte Carlo method is so important today. *WIREs Comput Stat* **6**, 386–392 (2014).
 138. Carvalho, A., Costa, R., Neves, S., Oliveira, C. M. & Bettencourt da Silva, R. J. N. Determination of dissolved oxygen in water by the Winkler method: Performance modelling and optimisation for environmental analysis. *Microchem. J.* **165**, 1–9 (2021).
 139. Jakab, D., Pázmándi, T. & Zagyvai, P. Effects of the uncertainty contributions on the methods used for measurement uncertainty evaluation. *Appl. Radiat. Isot.* **173**, 1–14 (2021).
 140. Ramebäck, H. & Lindgren, P. Uncertainty evaluation in gamma spectrometric measurements: Uncertainty propagation versus Monte Carlo simulation. *Appl. Radiat. Isot.* **142**, 71–76 (2018).
 141. Separovic, L. & Rebello Lourenço, F. Frequentist approach for estimation of false decision risks in conformity assessment based on measurement uncertainty of liquid chromatography analytical procedures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **184**, 1–7 (2020).
 142. Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Determination of intrinsic and metrological correlations of components of product impact on risks of false decisions in conformity assessment. *Proceedings* **55**, 1–3 (2020).
 143. Separovic, L. & Lourenço, F. R. Particular and total risks in the conformity assessment of paracetamol oral solutions. in *Eurachem Online Workshop: Trends & Challenges In Ensuring Quality In Analytical Measurements 2* (2021).
 144. Bheemanapally, K., Ibrahim, M. M. H. & Briski, K. P. Optimization of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry detection of glutamine-FMOC Ad-Hoc derivative by central composite design. *Sci. Rep.* **10**, 1–9 (2020).
 145. Martin, G. P. *et al.* Stimuli to the revision process: Proposed new USP general chapter: The analytical procedure lifecycle <1220>. *Pharmacopeial Forum* 1–9 (2017).
 146. ICH Expert Working Group. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical development Q8(R2)*. (2009).
 147. Kalariya, P. D., Namdev, D., Srinivas, R. & Gananadhamu, S. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops. *J. Saudi Chem. Soc.* **21**, S373–S382 (2017).
 148. Fukuda, I. M., Pinto, C. F. F., Moreira, C. dos S., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Design of Experiments (DoE) applied to pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian J. Pharm. Sci.* **54**, 1–16 (2018).
 149. Azcarate, S. M., Pinto, L. & Goicoechea, H. C. Applications of mixture

- experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *J. Chemom.* **34**, 1–19 (2020).
150. Consiglieri, V. O., Ferraz, H. G. & Serra, C. H. dos R. *Roteiro para aulas práticas de farmacotécnica*. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2003).
 151. Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Improved spreadsheet method for determination of between components metrological correlation due to the sharing of analytical steps. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **189**, 161–168 (2019).
 152. Palma, C., Morgado, V. & Bettencourt da Silva, R. J. N. Top-down evaluation of matrix effects uncertainty. *Talanta* **192**, 278–287 (2019).
 153. ChemAxon. Chemicalize calculation for terbinafine. 10 <https://chemicalize.com/>.
 154. The Minister of Health Labour and Welfare. *The Japanese Pharmacopoeia 17th ed.* (2016).
 155. United States Pharmacopeia & National Formulary. General chapter <621> Chromatography. in *United States Pharmacopeia (USP) 40-NF 35* 12 (2017).
 156. Kaefer, C. L., Hellwig, F. M., Reis, R. H. D., Silva, C. V. & Malesuik, M. D. Desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD e estudo preliminar da estabilidade da sinefrina em extrato seco de *Citrus aurantium* L. *Quim. Nova* **38**, 709–714 (2015).
 157. Da Silva, J. M., Zini, C. A., Caramão, E. B., Canizares, E. M. P. N. & Leal, K. A. Development of analytical methods for pesticides in sediments by monodimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography with micro electron-capture detection. *Quim. Nova* **33**, 591–597 (2010).
 158. Wingert, N. R. *et al.* Application of Quality by Design to optimize a stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities. *Eur. J. Pharm. Sci.* **118**, 208–215 (2018).
 159. Terzić, J., Popović, I., Stajić, A., Tumpa, A. & Jančić-Stojanovic, B. Application of Analytical Quality by Design concept for bilastine and its degradation impurities determination by hydrophilic interaction liquid chromatographic method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **125**, 385–393 (2016).
 160. Tumpa, A., Stajić, A., Jančić-Stojanović, B. & Medenica, M. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **134**, 18–26 (2017).
 161. Nompari, L. *et al.* Quality by design approach in the development of an ultra-high-performance liquid chromatography method for Bexsero meningococcal group B vaccine. *Talanta* **178**, 552–562 (2018).
 162. Dobričić, V., Vukadinović, D., Jančić-Stojanović, B., Vladimirov, S. & Čudina, O. AQbD-oriented development of a new LC method for simultaneous determination of Telmisartan and its impurities. *Chromatographia* **80**, 1199–1209 (2017).
 163. Pantović, J., Malenović, A., Vemić, A., Kostić, N. & Medenica, M. Development of liquid chromatographic method for the analysis of dabigatran etexilate

- mesilate and its ten impurities supported by quality-by-design methodology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **111**, 7–13 (2015).
164. de Oliveira, E. C. & Lourenço, F. R. Data reconciliation applied to the conformity assessment of fuel products. *Fuel* **300**, 3–7 (2021).

ANEXOS

1) Artigos publicados

- a) Separovic, L., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Using measurement uncertainty to assess the fitness for purpose of an HPLC analytical method in the pharmaceutical industry. *Measurement* **119**, 41–45 (2018).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.01.048>

- b) Separovic, L., Bertanha, M. L. de G., Saviano, A. M. & Lourenço, F. R. Conformity decisions based on measurement uncertainty—A case study applied to agar diffusion microbiological assay. *J. Pharm. Innov.* 1–6 (2019).

Link: <https://doi.org/10.1007/s12247-019-09374-8>

- c) Separovic, L. & Lourenço, F. R. Measurement uncertainty and risk of false conformity decision in the performance evaluation of liquid chromatography analytical procedures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **171**, 73–80 (2019).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.005>

- d) Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Improved spreadsheet method for determination of between components metrological correlation due to the sharing of analytical steps. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **189**, 161–168 (2019).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.05.002>

- e) Separovic, L. & Rebello Lourenço, F. Frequentist approach for estimation of false decision risks in conformity assessment based on measurement uncertainty of liquid chromatography analytical procedures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **184**, 1–7 (2020).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113203>

- f) Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Determination of intrinsic and metrological correlations of components of product impact on risks of false decisions in conformity assessment. *Proceedings* **55**, 1–3 (2020).

Link: <https://doi.org/10.3390/proceedings2020055005>

- g) Lorêdo de França, M. *et al.* Determining uncertainty in a simple UV–Vis spectrometry method employing dimethyl carbonate as green solvent for lead determination in water. *Measurement* **173**, 1–7 (2021).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108581>

- h) Separovic, L., Bettencourt da Silva, R. J. N. & Lourenço, F. R. Determination of intrinsic and metrological components of the correlation of multiparameter products for minimising the risks of false conformity decisions. *Measurement* **180**, 1–9 (2021).

Link: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109531>

- i) Separovic, L. *et al.* Measurement uncertainty and conformity assessment applied to drug and medicine analyses – A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1–16 (2021).

Link: <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1940086>

- 2) Planilha para estimativa de riscos específicos pela abordagem frequentista

Resultado analítico		Incerteza de medição (U)
	±	
	K =	

Guard-Band g = #NÚM!

Plotagem dos riscos frequentistas		
#	Valores	Riscos (%)
0	0,0	#DIV/0!
1	0,0	#DIV/0!
2	0,0	#DIV/0!
3	0,0	#DIV/0!
4	0,0	#DIV/0!
5	0,0	#DIV/0!
6	0,0	#DIV/0!
7	0,0	#DIV/0!
8	0,0	#DIV/0!
9	0,0	#DIV/0!
10	0,0	#DIV/0!
11	0,0	#DIV/0!
12	0,0	#DIV/0!
13	0,0	#DIV/0!
14	0,0	#DIV/0!
15	0,0	#DIV/0!
16	0,0	#DIV/0!
17	0,0	#DIV/0!
18	0,0	#DIV/0!
19	0,0	#DIV/0!
20	0,0	#DIV/0!
21	0,0	#DIV/0!
22	0,0	#DIV/0!
23	0,0	#DIV/0!
24	0,0	#DIV/0!
25	0,0	#DIV/0!
26	0,0	#DIV/0!
27	0,0	#DIV/0!
28	0,0	#DIV/0!
29	0,0	#DIV/0!
30	0,0	#DIV/0!
31	0,0	#DIV/0!
32	0,0	#DIV/0!
33	0,0	#DIV/0!
34	0,0	#DIV/0!
35	0,0	#DIV/0!

Limite inferior de especificação		Limite superior de especificação
	a	
	Risco máximo admissível	
	Risco específico	#DIV/0!
Intervalo de aceitação:	#DIV/0!	a
		#DIV/0!

Histograma dos riscos específicos			
#	Valores	Frequência	Probabilidade
0	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
1	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
2	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
3	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
4	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
5	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
6	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
7	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
8	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
9	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
10	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
11	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
12	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
13	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
14	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
15	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
16	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
17	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
18	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
19	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
20	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
21	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
22	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
23	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
24	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
25	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
26	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
27	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
28	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
29	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
30	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
31	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
32	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
33	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
34	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
35	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!

36	0,0	#DIV/0!
37	0,0	#DIV/0!
38	0,0	#DIV/0!
39	0,0	#DIV/0!
40	0,0	#DIV/0!
41	0,0	#DIV/0!
42	0,0	#DIV/0!
43	0,0	#DIV/0!
44	0,0	#DIV/0!
45	0,0	#DIV/0!
46	0,0	#DIV/0!
47	0,0	#DIV/0!
48	0,0	#DIV/0!
49	0,0	#DIV/0!
50	0,0	#DIV/0!
51	0,0	#DIV/0!
52	0,0	#DIV/0!
53	0,0	#DIV/0!
54	0,0	#DIV/0!
55	0,0	#DIV/0!
56	0,0	#DIV/0!
57	0,0	#DIV/0!
58	0,0	#DIV/0!
59	0,0	#DIV/0!
60	0,0	#DIV/0!
61	0,0	#DIV/0!
62	0,0	#DIV/0!
63	0,0	#DIV/0!
64	0,0	#DIV/0!
65	0,0	#DIV/0!
66	0,0	#DIV/0!
67	0,0	#DIV/0!
68	0,0	#DIV/0!
69	0,0	#DIV/0!
70	0,0	#DIV/0!
71	0,0	#DIV/0!
72	0,0	#DIV/0!
73	0,0	#DIV/0!
74	0,0	#DIV/0!
75	0,0	#DIV/0!
76	0,0	#DIV/0!
77	0,0	#DIV/0!
78	0,0	#DIV/0!
79	0,0	#DIV/0!
80	0,0	#DIV/0!
81	0,0	#DIV/0!
82	0,0	#DIV/0!

36	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
37	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
38	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
39	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
40	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
41	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
42	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
43	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
44	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
45	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
46	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
47	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
48	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
49	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
50	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
51	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
52	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
53	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
54	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
55	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
56	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
57	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
58	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
59	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
60	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
61	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
62	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
63	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
64	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
65	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
66	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
67	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
68	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
69	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
70	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
71	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
72	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
73	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
74	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
75	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
76	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
77	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
78	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
79	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
80	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
81	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
82	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!

83	0,0	#DIV/0!
84	0,0	#DIV/0!
85	0,0	#DIV/0!
86	0,0	#DIV/0!
87	0,0	#DIV/0!
88	0,0	#DIV/0!
89	0,0	#DIV/0!
90	0,0	#DIV/0!
91	0,0	#DIV/0!
92	0,0	#DIV/0!
93	0,0	#DIV/0!
94	0,0	#DIV/0!
95	0,0	#DIV/0!
96	0,0	#DIV/0!
97	0,0	#DIV/0!
98	0,0	#DIV/0!
99	0,0	#DIV/0!
100	0,0	#DIV/0!

83	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
84	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
85	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
86	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
87	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
88	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
89	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
90	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
91	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
92	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
93	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
94	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
95	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
96	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
97	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
98	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
99	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!
100	0,0	#DIV/0!	#DIV/0!