UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

ESTIMATIVA DE INCERTEZAS DE MEDIÇÕES E SUAS APLICAÇÕES NAS ANÁLISES DE MEDICAMENTOS

Felipe Rebello Lourenço

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIENCIAS FARMACEUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

ESTIMATIVA DE INCERTEZAS DE MEDIÇÕES E SUAS APLICAÇÕES NAS ANÁLISES DE MEDICAMENTOS

Felipe Rebello Lourenço

Texto sistematizado apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para o concurso de Livre Docência junto ao Departamento de Farmácia

São Paulo
2018

Lourenço, Felipe Rebello
LL892e Estimativa de incertezas de medições e suas aplicações nas análises de medicamentos / Felipe Rebello Lourenço. - São Paulo, 2018.
140 p.

Tese (livre docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: ,

1. Incerteza de medição. I. T. II. , , orientador.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Luiz Antônio e Marisa (*in memoriam*), pelo amor, pela dedicação e pelo exemplo de vida, que foram a base da minha formação.

A minha esposa, Daniela, por seu amor, sua compreensão e presença nos momentos mais difíceis.

À minha filha Raquel, por seu amor, carinho e por ter trazido um novo sentido para a minha vida.

Aos meus irmãos, Guilherme, Juliana e Pedro Henrique, pelo amor, pela ajuda e pelas alegrias compartilhadas durante as nossas vidas.

Aos meus sogros, cunhados, tios, primos e demais familiares, pelo amor, amizade e companheirismo.

Aos meus alunos de mestrado, doutorado e iniciação científica, pelo compromisso e pelo entusiasmo durante a realização de suas pesquisas.

Aos professores do Departamento de Farmácia, pelo coleguismo, apoio e amizade, que proporcionaram meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo!

Lista de Figuras

Figura 1 Etapas envolvidas na estimativa da incerteza de medição combinada (u_y) e expandida ($U = k \times u_y$) de uma resposta $y = f(x_i)$ e suas incertezas (u_{x_i})..... 8

Figura 2 Diagrama de causa-efeito (Ishikawa) com as principais fontes de incerteza relacionadas aos resultados analíticos na área farmacêutica..... 10

Figura 3 Equações utilizadas para a cálculo da incerteza combinada empregado o método da planilha proposto por Kragten..... 18

Figura 4 Fórmulas utilizadas em planilha MS-Excel para cálculo da incerteza combinada empregado o método da planilha proposto por Kragten. 19

Figura 5 Representação gráfica da aplicação do método de simulações de Monte Carlo para uma resposta $y = f(x_1, x_2, x_3)$, com incertezas u_y, u_{x_1}, u_{x_2} e u_{x_3}, respectivamente..... 22

Figura 6 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV..... 30

Figura 7 Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV..... 34

Figura 8 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de linezolida por UV..... 35

Figura 9 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de paracetamol por espectrofotometria de absorção no UV..... 36

Figura 10 Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de paracetamol (amostras A, B, C, D e E, de diferentes fabricantes) por espectrofotometria de absorção no UV..... 40

Figura 11 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 42

Figura 12 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 44

Figura 13 Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de desloratadina por espectrofotometria de absorção no UV..... 45

Figura 14 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC..... 48

Figura 15 Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC..... 50

Figura 16 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de linezolida por UPLC..... 52

Figura 17 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de metronidazol por HPLC..... 53

Figura 18 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de metronidazol por HPLC..... 55

Figura 19 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de caspofungina por UPLC-PDA..... 57

Figura 20 Histograma obtido para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de caspufungina por UPLC-PDA..... 59

Figura 21 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de caspofungina por UPLC-PDA..... 60

Figura 22 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de amoxicilina por HPLC..... 61

Figura 23 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de amoxicilina por HPLC..... 63

Figura 24 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de caspofungina por CE-PDA..... 66

Figura 25 Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de caspufungina por CE-PDA, com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente..... 68

Figura 26 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de caspufungina por CE-PDA, com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente..... 69

Figura 27 Gráficos 3D da quantidade de paracetamol dissolvido (%) em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D)..... 72

Figura 28 Histograma obtido para as simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada ao teste de dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas de liberação imediata..... 74

Figura 29 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada ao teste de dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas de liberação imediata..... 75

Figura 30 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação da dose efetivamente administrada de ciprofloxacino em preparações farmacêuticas oftálmicas..... 77

Figura 31 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação da dose efetivamente administrada de ciprofloxacino em preparações farmacêuticas oftálmicas..... 79

Figura 32 Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas (Produtos A e B)..... 80

Figura 33 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas..... 84

Figura 34 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada doseamento microbiológico de caspofungina em formas farmacêuticas..... 88

Figura 35 Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada ao doseamento microbiológico de caspofungina em formas farmacêuticas..... 88

Figura 36 Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de microrganismo (X1), concentração de linezolida (X2), proporção de inóculo (X3), volume de camada inoculada (X4) e tipo de meio de cultura (X5) no tamanho dos halos de inibição de crescimento..... 90

Figura 37 Gráficos de efeitos principais mostrando a influência do tipo de microrganismo, tipo de meio de cultura, volume de camada inoculada e proporção de inóculo no tamanho dos halos de inibição de crescimento..... 90

Figura 38 Gráficos 3D que explicam o tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y). (A) Y em função do volume do meio de cultura (X1) e da proporção de inóculo (X2); (B) Y em função do volume de meio de cultura (X1) e das concentrações de linezolida (X2); e (C) Y em função da proporção de inóculo (X1) e das concentrações de linezolida (X2)..... 92

Figura 39 Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para cefazolina. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h..... 96

Figura 40 Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para Cefuroxima. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h..... 97

Figura 41 Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para ceftriaxona. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h..... 98

Figura 42 Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para cefepima. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h..... 99

Figura 43 Histogramas dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento obtidos a partir das 100.000 simulações de Monte Carlo e das equações de regressão para cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima..... 101

Figura 44 Gráficos de Pareto das fontes de incerteza associadas aos tamanhos dos halos de inibição de crescimento para cefazolina, cefuroxime, ceftriaxone e cefepime. Legenda: X1 = amino ácidos; X2 = extrato de carne; X3 = agar; X4 = concentração de antibiótico; X5 = proporção de inóculo; e X6 = período de pré-incubação..... 102

Figura 45 Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico colorimétrico em microplacas de linezolida em formas farmacêuticas..... 104

Figura 46 Gráfico 3D que explica a quantidade de liberação de p-nitroanilina (Y1) em função do tempo de incubação após a adição de reagente LAL (X1) e do tempo de incubação após a adição de solução de substrato cromogêncio (X2) para o teste LAL cromogênico de ponto final..... 111

Figura 47 Gráfico 3D que explica o tempo de reação (Y2) em função do volume de solução-teste (X3) e do volume de reagente LAL (X4) para o teste LAL cinético cromogênico..... 113

Figura 48 Decisão quanto à avaliação de conformidade (ou não-conformidade) com base na incerteza de medição, considerando-se quatro situações distintas: (A) conforme; (B) risco do consumidor (aprovar um lote fora de especificação); (C) risco do produtor (reprovar um lote dentro de especificação); e (D) não-conforme. Legenda: LIE = limite inferior de especificação e LSE = limite superior de especificação..... 116

Figura 49 Histograma do conteúdo de amoxicilina em comprimidos, obtido a partir dos dados históricos (45 lotes). Limites de especificação: 95 a 105%..... 117

Figura 50 Resultados analíticos e suas respectivas incertezas de medição para o conteúdo de amoxicilina em comprimidos (45 lotes). Limites de especificação: 95 a 105%..... 118

Figura 51 Gráfico de dispersão do conteúdo de amoxicilina nos lotes simulados *vs.* resultados analíticos simulados. Limites de especificação: 95 a 105%..... 119

Figura 52 Gráficos de degradação forçada de caspofungina determinada pelo método cromatográfico (A) e por doseamento microbiológico (B).... 122

Figura 53 Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para a razão das doses de ciprofloxacino efetivamente administrada para os medicamentos teste e referência, quando existem pequenas diferenças entre os medicamentos teste e referência no que diz respeito aos conteúdos de ciprofloxacino ou aos volumes das gotas (A) ou quando existem diferenças simultâneas para os conteúdos de ciprofloxacino e para os volumes das gotas (B)..... 124

Lista de Tabelas

Tabela 1 Fórmulas usualmente empregadas para a geração de dados aleatórios com distribuição normal, retangular, triangular e t-Student..... 21

Tabela 2 Erros sistemáticos e aleatórios associados aos diferentes parâmetros de validação usualmente avaliados..... 26

Tabela 3 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 31

Tabela 4 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV..... 33

Tabela 5 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 37

Tabela 6 Fontes de variabilidade para o estudo de repetibilidade e reprodutibilidade (RR) utilizado para a estimativa da incerteza de medição..... 38

Tabela 7 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de paracetamol em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 39

Tabela 8 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV..... 43

Tabela 9 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de desloratadina por espectrofotometria de absorção no UV..... 46

Tabela 10 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UPLC..... 49

Tabela 11 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC..... 51

Tabela 12 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas por HPLC..... 54

Tabela 13 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de metronidazol por HPLC..... 56

Tabela 14 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por UPLC-PDA..... 58

Tabela 15 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas por HPLC..... 62

Tabela 16 Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de amoxicilina por HPLC..... 64

Tabela 17 Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizado para explicar a quantidade de paracetamol dissolvido em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D)..... 71

Tabela 18 Equação de regressão e coeficientes de determinação para a quantidade de paracetamol dissolvido (Y) em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D)..... 73

Tabela 19 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a determinação da dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas..... 78

Tabela 20 Resumo dos resultados de validação de método para o doseamento microbiológico de vancomicina em formas farmacêuticas..... 82

Tabela 21 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada ao doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas..... 85

Tabela 22 Análise de variância (ANOVA) para as estimativas das incertezas associadas ao tamanho dos halos de inibição..... 86

Tabela 23 Equações de regressão e coeficientes de determinação do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura ($X1$ = amino ácidos, $X2$ = extrato de carne e $X3$ = agar), concentração de antibiótico ($X4$ = ln(Co)), proporção de inóculo ($X5$ = log2(No)) e período de pré-incubação ($X6$ = h)..... 94

Tabela 24 Análise de variância (ANOVA) do tamanho dos halos de inibição de crescimento em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = $\log_2$(No)) e período de pré-incubação (X6 = h)..... 95

Tabela 25 Funções de densidade de probabilidades (PDFs) de cada fator de entrada, assim como seus parâmetros, utilizados nas simulações de Monte Carlo para os tamanhos dos halos de inibição de crescimento..... 100

Tabela 26 Tabela de contingência com os dados para a estimativa das probabilidades de resultados falso-positivos, falso-negativos, valores de sensibilidade e especificidade..... 107

Tabela 27 Resultados das probabilidades de resultados falso-positivos (P_{F+}), falso-negativos (P_{F-}), valores de sensibilidade (S) e especificidade (E) para a confirmação da sensibilidade do reagente LAL e para a validação do teste LAL..... 108

Tabela 28 Tabela de contingência com os dados para a estimativa dos riscos do consumidor e do produtor..... 119

Tabela 29 Resultados das validações de métodos para quantificação de linezolida em formas farmacêuticas e suas respectivas incertezas de medição..... 121

Sumário

1. Proposta de texto sistematizado 1

2. Introdução 3

2.1. Histórico e evolução da incerteza de medição 5

2.2. Conceitos e definições sobre incerteza de medição 7

2.3. Etapas para a estimativa da incerteza de medição 7

3. Métodos de estimativa de incerteza de medição 13

3.1. Lei da propagação das incertezas 13

3.2. Método da planilha de Kragten 16

3.3. Simulações de Monte Carlo 19

3.4. Incerteza a partir dos resultados de validação de métodos 23

3.5. Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade 26

4. Incerteza de medição em análises de medicamentos 29

4.1. Métodos espectrofotométricos 29

4.1.1. Quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UV 30

4.1.2. Quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas por UV 35

4.1.3. Quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas por UV 41

4.2. Métodos cromatográficos 47

4.2.1. Quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UPLC 47

4.2.2. Quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas por HPLC 52

4.2.3. Quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por UPLC 57

4.2.4. Quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas por HPLC 60

4.3. Métodos eletroforéticos 65

4.3.1. Quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por CE 65

4.4. Ensaio de dissolução de formas farmacêuticas sólidas 70

4.4.1. Dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas sólidas 70

4.5. Teste de gotejamento 75

4.5.1. Dose efetiva de ciprofloxacino em formas farmacêuticas oftálmicas 76

4.6. Doseamento microbiológico por difusão em agar 81

4.6.1. Doseamento microbiológico de vancomicina em formas farmacêuticas . 81

4.6.2. Doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas 83

4.6.3. Doseamento microbiológico de caspofungina formas farmacêuticas 87

4.6.4. Doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas 89
4.6.5. Doseamento microbiológico de cefalosporinas em formas farmacêuticas93
4.7. Doseamento microbiológico turbidimétrico/colorimétrico em microplacas . 103
4.7.1. Doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas 104
4.8. Ensaio de LAL para detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas... 105
4.8.1. Detecção de LPS por gelificação de ponto final (*gel-clot*)..... 106
4.8.2. Quantificação de LPS pelo método cromogênico de ponto final 109
4.8.3. Quantificação de LPS pelo método cromogênico cinético..... 112
5. Aplicações da incerteza de medição..... 115
5.1. Gerenciamento de risco de decisões quanto à conformidade 115
5.2. Comparação de métodos analíticos..... 120
5.3. Estudos de estabilidade e degradação forçada 121
5.4. Estudos de equivalência farmacêutica 123
6. Considerações finais e perspectivas futuras..... 127
7. Referências bibliográficas..... 129
Anexos..... 137

1. Proposta de texto sistematizado

Minha jornada como pesquisador começou numa oportunidade de iniciação científica no laboratório de controle biológico de qualidade de medicamentos, cosméticos e correlatos. Após obter o título de Farmacêutico-Bioquímico (2004), desenvolvi os projetos de mestrado (Doseamento Microbiológico de Gentamicina por Difusão em Agar: Proposta de Delineamento Experimental – 2006) e doutorado (Doseamento Microbiológico de Apramicina: Desenvolvimento e Validação de Método empregando Leitura Cinética em Microplacas – 2009), sob orientação da Prof. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto. Ainda, tive a oportunidade de desenvolver estágios de pós-doutoramento na United States Pharmacopeia (USPharm, em 2010), em Rockville – Estados Unidos da América, sob supervisão do Dr. Michael Ambrose, e na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL, em 2018), em Lisboa – Portugal, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva.

Desde 2011, atou como docente no Departamento de Farmácia (FBF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP), desenvolvendo atividades de ensino (graduação e pós-graduação), orientação (trabalhos de conclusão de curso, iniciação científica, mestrado e doutorado), pesquisa (relacionadas à avaliação de qualidade, eficácia e segurança de medicamentos), extensão (participação em bancas, comissões julgadoras, dentre outras atividades) e gestão universitária (participação como membro do conselho de departamento, da congregação e de comissões).

Este texto tem por proposta sistematizar as minhas principais contribuições relacionadas à estimativa da incerteza de medição nas análises farmacêuticas, assim como suas aplicações na avaliação da qualidade, eficácia e segurança de medicamentos. Aqui, são apresentados e discutidos os resultados, assim como suas respectivas produções científicas, oriundos de projetos de pesquisa desenvolvidos ou orientados por mim, além daqueles aos quais fui colaborador, nos últimos 15 anos da minha carreira como pesquisador. Durante este período, foram publicados diversos artigos científicos relacionados ao tema proposto.

O texto sistematizado está organizado em 3 partes: a) uma apresentação teórica dos principais **métodos de estimativa de incerteza de medição**; b) a estimativa da **incerteza de medição em análise de medicamentos,** empregando-se métodos espectrofotométricos, cromatográficos, eletroforéticos, ensaios de dissolução, teste de

gotejamento, doseamento microbiológico por difusão em agar, doseamento microbiológico turbidimétrico/colorimétrico e ensaios de LAL para detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas; e c) **aplicação da incerteza de medição** na avaliação de conformidade às especificações, comparação de métodos, estudos de estabilidade e equivalência farmacêutica.

A oportunidade de revisitar os trabalhos de pesquisa desenvolvidos ou orientados por mim durante a elaboração deste texto sistematizado tem sido momento de reflexão e autoavaliação. Após quase 20 anos de atividades relacionadas à pesquisa, sinto-me, por um lado, satisfeito pelo caminho percorrido, e por outro, entusiasmado pela busca de novos desafios e perspectivas futuras.

2. Introdução

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 determinado estudo, estando habitualmente discriminado em seção particular nos modelos mais comuns de publicação científica. 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. Na área clínica farmacêutica, refletem determinada característica presente em um organismo, por exemplo, a dosagem de xenobióticos, toxinas, biomarcadores e outros; contagem de células; curvas de biodisponibilidade absoluta e relativa, entre outras situações.

Seu papel fundamental na transmissão de conhecimento e informação levou à identificação da importância de que tais resultados possuam características de precisão e exatidão garantidas. Em diversas áreas, hoje existe um requisito, frequentemente regulatório, para que os laboratórios emissores de resultados analíticos possuam algum tipo de sistema de garantia da qualidade que permita que o resultado reflita com precisão e exatidão as características do objeto ou material em estudo. As medidas comumente adotadas são: validação de método, protocolos de controle de qualidade internos, participação em ensaios de proficiência, e acreditação baseada na ISO/IEC 17025 [1, 2].

Apesar dessas medidas, um resultado analítico jamais será capaz de ser uma representação absoluta e perfeita do parâmetro sendo medido. Sempre haverá uma incerteza associada ao resultado experimental mesmo que todas as fontes de incerteza tenham sido avaliadas e corrigidas. Isso porque mesmo as correções aplicadas possuem, por si só, uma incerteza associada, não removendo por absoluto as incertezas. Ainda, tal método de correção de incertezas não contempla as variações oriundas de efeitos aleatórios, inerentes a qualquer determinação experimental [3].

É importante ressaltar que incerteza e erro são conceitos diferentes. Erro é um conceito idealizado e que não pode ser avaliado experimentalmente, pois se trata da diferença entre um resultado e o real valor do que está sendo medido, um valor individual e que em teoria poderia ser aplicado como correção ao resultado experimental. Incerteza reflete um intervalo de valores que podem ser atribuídos a um resultado experimental de

um atributo de um determinado objeto ou material em estudo através de metodologia específica, não sendo possível corrigir o resultado experimental encontrado para um resultado verdadeiro e absoluto, através da medição de incerteza [1].

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 ou entre um resultado e sua especificação [4].

2.1. Histórico e evolução da incerteza de medição

Em 1993, foi publicado, sob a autoria da ISO em colaboração com as organizações BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP e OIML, o documento "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", comumente referido como GUM, o qual estabeleceu conceitos e metodologias gerais para a análise e expressão de incerteza de medição. O guia, atualmente na primeira edição, mas com algumas correções feitas em 2008 a partir de sua versão original, é de aplicação geral à metrologia, atendendo-a como um todo, isto é, sem um foco específico para um determinado ramo. [5]

A medição de incerteza proposta no GUM incorpora tanto incertezas oriundas de efeitos sistemáticos como de efeitos aleatórios [6], através 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. Embora a abordagem seja diferente da usualmente utilizada em química analítica, onde usualmente a determinação de confiança e comparabilidade do resultado é realizada pela determinação de parâmetros gerais de performance do método, sejam eles linearidade, seletividade, robustez e principalmente, precisão e exatidão [4], e que, inicialmente tenha sido reconhecida a dificuldade de se aplicar a metodologia na área de química analítica, a metodologia proposta no GUM conseguiu ser aplicada e demonstrada na literatura científica [7], sendo aplicada em diferentes áreas como na quantificação de fármacos por métodos espectrofotométricos [8, 9, 10], cromatográficos [11, 12, 13] e microbiológicos [14, 15]. Traple e colaboradores publicaram em 2014 uma revisão da presença da incerteza de medição nas publicações científicas na área de análises farmacêuticas [16]. Atualmente, o Brasil conta com uma versão do GUM traduzida para o português, publicada em 2012, pelo INMETRO, sobre a coordenação de Antônio Carlos Baratto [17].

A determinação da incerteza de medição pela metodologia apresentada no GUM permite obter maior qualidade de informação sobre o método avaliado, permitindo tomadas de decisões mais seguras, aumentando a aceitabilidade de resultados analíticos, abrindo oportunidades para redução de custo de análise e aumentando o entendimento e a confiabilidade sobre o método e o resultado obtido [3]. Contudo, como ponderado por Ellison e Barwick [4, 18], a garantia da qualidade de um resultado analítico não se trata de uma disputa entre qual é a melhor metodologia de avaliação de incertezas. Enquanto o método do GUM permite entender com maior propriedade a contribuição individual de cada fator de variabilidade sobre a incerteza do método, esse conhecimento acaba sendo

encoberto quando se utiliza metodologias de avaliação de performance geral do método [19, 15]. Por outro lado, quando o único objetivo é se estimar a incerteza geral do método, metodologias de avaliação de performance geral podem ser mais vantajosas do que o método do GUM.

Para auxiliar a implementação do conceito de determinação de incerteza desenvolvido pelo GUM na área de análises químicas quantitativas, em 1995 foi publicado o guia da EURACHEM entitulado "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement". Com foco nas várias aplicações da química quantitativa, desde a pesquisa básica na universidade, até análises de rotina nas grandes indústrias, o guia foi bem acolhido pela comunidade analítica. Cinco anos após a publicação da primeira edição, baseada nas experiências práticas da medição de incerteza em laboratórios químicos, a EURACHEM, em parceria com a CITAC, publicou a segunda versão do guia, enfatizando novos conceitos como a integração entre medição de incerteza e procedimentos *in-house* de garantia da qualidade. A terceira edição, publicada em 2012, é a mais recente até a data de publicação deste trabalho e atualiza a versão anterior à luz do desenvolvimento obtido ao longo da primeira década dos anos 2000, trazendo conceitos de integração de testes de proficiência e aplicação de simulação de Monte Carlo para avaliação de incerteza [1].

De acordo com o GUM, incerteza de medição pode ser definida como um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que representa o intervalo de valores que podem ser atribuídos à quantidade mensurada [5]. Em análises químicas, frequentemente a quantidade mensurada é a concentração de uma espécie química [1]. Para que a incerteza de medição tivesse valor à comunidade e fosse robusto o suficiente para adquirir *status* de indicador de qualidade do resultado analítico, esta foi concebida de modo a ser avaliada e expressa de uma maneira padronizada, sendo universal (no sentido de aplicável as mais diversas áreas de medição), consistente e transferível, de modo que a incerteza avaliada para um método, por exemplo, pode ser utilizada no cálculo da incerteza de uma outra medição que utilize esse primeiro método avaliado como parte integrante da sua metodologia [3].

2.2. Conceitos e definições sobre incerteza de medição

Neste trabalho, a metodologia de medição de incerteza será referenciada ao guia da EURACHEM [1], contudo é importante salientar que todo o desenvolvimento matemático e estatístico é oriundo dos trabalhos para a confecção do GUM [5], a referência direta para a elaboração do guia da EURACHEM.

Assim, de acordo com o guia da EURACHEM, estabelece-se que, para um determinado resultado, sua incerteza total é um desvio-padrão calculado pela raiz quadrada positiva da combinação das incertezas dos componentes de variabilidade do resultado analítico, um parâmetro denominado incerteza padrão combinada (do inglês: *combined standard uncertainty*), representada por u_y [1].

Para a área de química analítica, outro parâmetro denominado incerteza expandida (do inglês: *expanded uncertainty*), representada por U, deve ser utilizada. A primeira forma proposta de se obter a incerteza expandida, também referida como método do GUM ou método clássico, é através da multiplicação da incerteza combinada padrão por um parâmetro k, denominado fator de abrangência (do inglês: *coverage fator*), que usualmente pode variar entre 2 e 3 e está relacionado com o nível de confiança desejado para o resultado em análise [1]. A incerteza expandida é um intervalo numérico que conterá o resultado analítico dentro de um determinado nível de confiança (usualmente 95% de confiança), diretamente relacionado ao parâmetro k.

2.3. Etapas para a estimativa da incerteza de medição

De acordo com o guia da EURACHEM [1], a avaliação da incerteza de medição, na sua forma original descrita no GUM [5], pode ser dividida em 4 etapas: Etapa 1) especificar o mensurando ($y = f(x_i)$); Etapa 2) identificar suas fontes de incerteza; Etapa 3) quantificar os componentes de incerteza e convertê-los a incerteza padrão (u_{x_i}); e Etapa 4) calcular a incerteza combinada (u_y) e a incerteza expandida ($U = k \times u_y$). Um esquema das etapas envolvidas na estimativa de incerteza está apresentado na **Figura 1**.

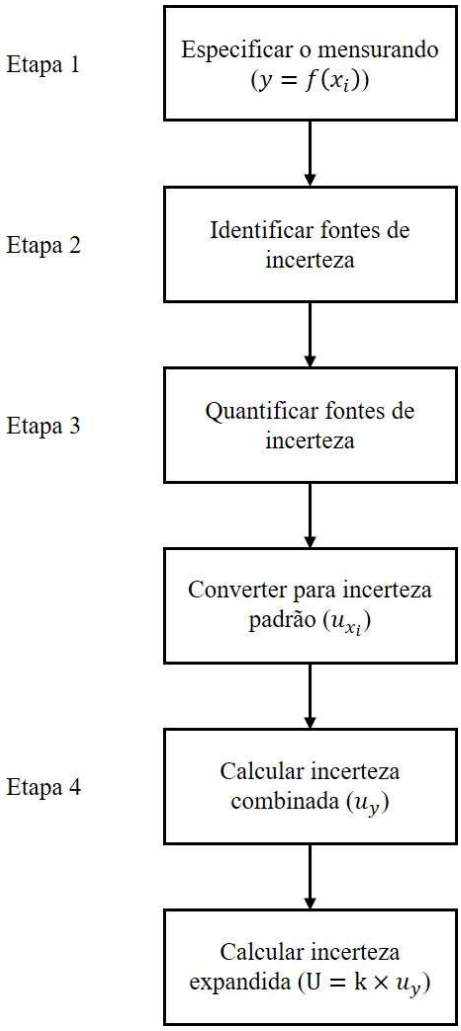


Figura 1. Etapas envolvidas na estimativa da incerteza de medição combinada (u_y) e expandida ($U = k \times u_y$) de uma resposta $y = f(x_i)$ e suas incertezas (u_{x_i}). Adaptado de [1].

No contexto da estimativa da incerteza de medição, deve-se definir o que está sendo medido de forma clara e não ambígua. A definição do mensurando deve incluir o analito de interesse (por exemplo: paracetamol), qual o nível de concentração esperado (por exemplo: na ordem de µg/mL) e o tipo de matriz a ser analisada (por exemplo: em preparações farmacêuticas). É recomendada a definição da expressão matemática ($y = f(x_i)$) que relaciona o que está sendo medido (y) com os parâmetros aos quais o mesmo depende (x_i).

As fontes de incerteza na área de análises químicas, incluindo sua abrangência farmacêutica, são bem conhecidas. Podem ser citados como fontes de incerteza: amostragem, efeitos instrumentais (calibração de balança analítica, termômetros ou sensores que controlam instrumentação, por exemplo), pureza de reagentes, efeitos da

própria amostra (degradação durante análise, purificação de uma matriz complexa, entre outros), efeitos do operador (leitura de uma escala, interpretação pessoal da metodologia), efeitos da análise (temperatura e umidade do ar, calibração da vidraria e pipetas, e outros), efeitos aleatórios inerentes a qualquer determinação experimental [20, 21, 22, 23, 4, 24, 7, 25, 26].

Como durante o processo de determinação de u_y as incertezas são matematicamente combinadas, é importante que uma mesma fonte de variabilidade não seja levada em conta mais de uma vez. Uma das maneiras mais conveniente, e frequentemente utilizada em publicações científicas da área, é a montagem de um diagrama de Ishikawa [10, 14, 12]. Com o diagrama de causa-efeito (Ishikawa), é possível listar quais as diferentes fontes de incerteza e agrupá-las, demonstrando a influência de umas sobre as outras e evitando que a mesma fonte apareça duas ou mais vezes. Um diagrama de Ishikawa com algumas das principais fontes de incerteza relacionadas aos resultados analíticos na área farmacêutica está apresentado na **Figura 2**. Embora não seja a única maneira de se trabalhar na identificação e organização de fontes de incerteza, o diagrama de Ishikawa é a metodologia adotada nos exemplos do guia da EURACHEM [1].

A quantificação da incerteza, no atual consenso, pode ser realizada tanto pela avaliação individual de cada fonte, com posterior combinação matemática dessas incertezas, como pela determinação da incerteza combinada de todas ou de diversas fontes diretamente no resultado da medição [1]. Este último modo é fruto da troca de ideias mútua entre a comunidade analítica e a EURACHEM, que revelou tanto uma necessidade de facilitar a aplicação da medição de incerteza, como uma inerente relação entre determinação de incerteza e alguns métodos de avaliação de desempenho geral, como validação de métodos, histórico de dados de controle da qualidade e testes de proficiência. A edição mais atual do guia da EURACHEM lista mais de dez modos diferentes de quantificação de incertezas, como por exemplo, utilizando os já mencionados métodos de avaliação de performance de metodologia, a avaliação individual de fontes de incerteza e outras situações como modelagem a partir de princípios teóricos e estudos colaborativos entre laboratórios. Estes diferentes modos podem ser utilizados em conjunto de modo a facilitar a coleta de dados para a medição de incerteza [1].

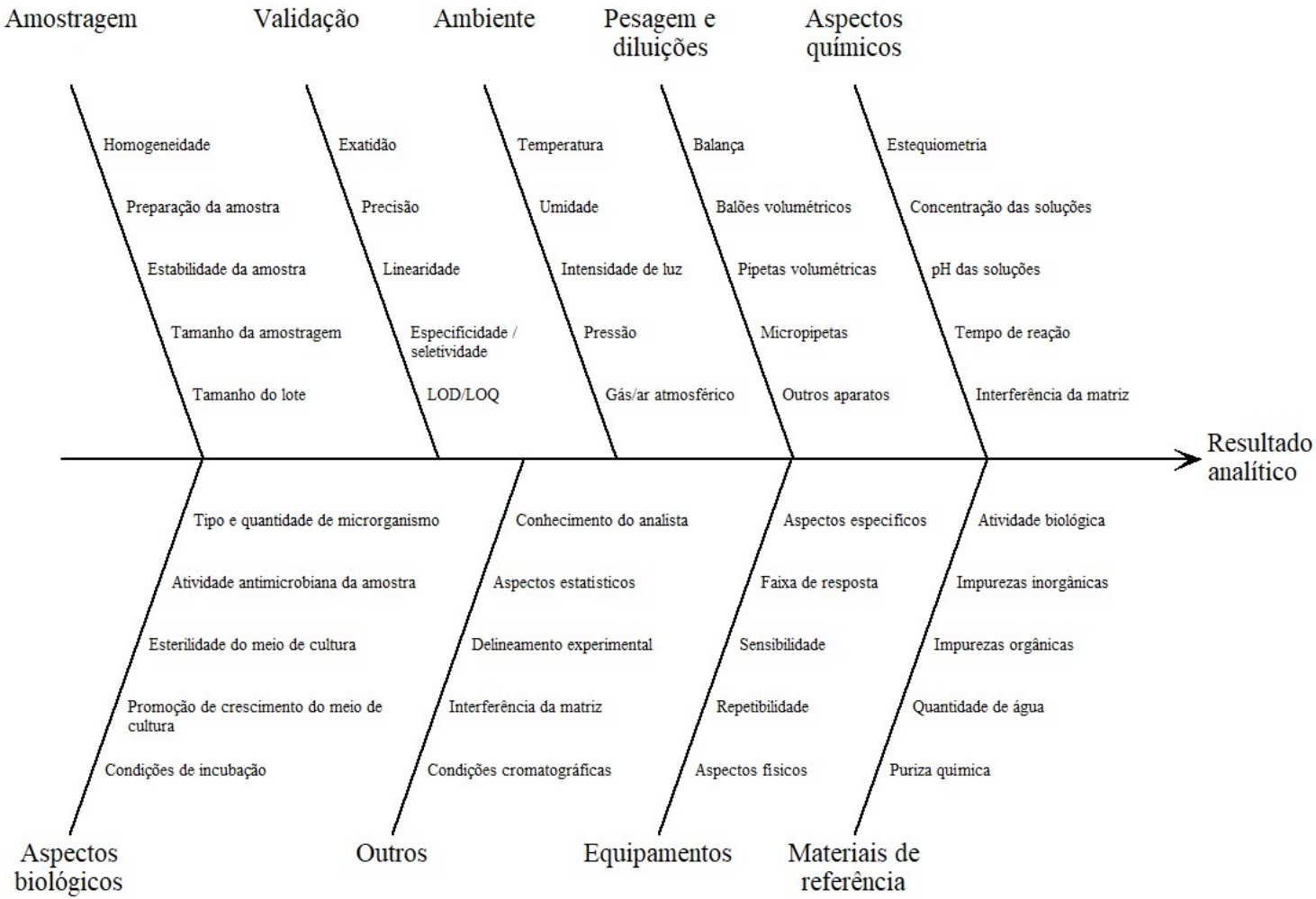


Figura 2. Diagrama de causa-efeito (Ishikawa) com as principais fontes de incerteza relacionadas aos resultados analíticos na área farmacêutica. Adaptado de [16].

As incertezas, não importando o modo como foram quantificadas, são combinadas para resultar uma incerteza combinada padrão (u_y). Para que essa combinação seja efetuada, as incertezas avaliadas devem estar expressas na forma de desvio-padrão. Isto é prontamente obtido se o modo de quantificação das incertezas foi experimental (incertezas do tipo A). No caso de quantificações baseadas em certificados, registros ou resultados prévios de avaliação, as incertezas (tipo B) podem estar tanto expressas na forma de desvio-padrão como na forma de intervalo de confiança, isto é, "± x". Neste último caso, a orientação da EURACHEM é que a conversão para desvio-padrão seja feita de acordo com a função de densidade de probabilidade adequada. Por exemplo, quando um determinado resultado pode atingir valores de –x ou +x na mesma probabilidade, ou seja, sem preferência por um valor central, isso caracteriza uma função de distribuição retangular dentro do intervalo ± x, cujo desvio-padrão é calculado por x/√3. Para funções de distribuição triangular, ou seja, quando há razões para que os valores se agrupem mais centralmente dentro do intervalo ± x, o desvio-padrão é calculado por x/√6. A EURACHEM apresenta, no apêndice E, as conversões para desvio-padrão das funções de distribuição de valores mais comuns [1].

A combinação dessas incertezas pode ser realizada tanto pela lei de propagação de incertezas (ver seção 3.1) como por métodos alternativos, como o método da planilha (ver seção 3.2), o método de simulação de Monte Carlo (ver seção 3.3), a partir dos resultados de validação de métodos (ver seção 3.4), e de estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (ver seção 3.5), [1].

O cálculo da incerteza expandida (U) é a etapa final na medição de incerteza, e consiste na multiplicação da incerteza combinada padrão (u_y) pelo fator de abrangência k. Desse modo, se expressa a incerteza de medição na forma de um intervalo de valores que podem ser atribuídos ao resultado, dentro de determinado nível de confiança, o qual está diretamente relacionado ao fator de abrangência k. O valor do fator de abrangência é geralmente dois ($k = 2$), entretanto, sua determinação deve levar em conta o nível de confiança desejado, o conhecimento sobre as funções de distribuição de incertezas e o número de valores usados para estimar efeitos aleatórios [1].

3. Métodos de estimativa de incerteza de medição

A incerteza combinada pode ser obtida a partir das incertezas padrão individuais adotando-se duas abordagens: a) abordagem *bottom-up*, na qual os erros sistemáticos e aleatórios de cada etapa do procedimento analítico são combinadas para obter-se a incerteza de medição; e b) abordagem *top-down*, na qual os erros sistemáticos e aleatórios do procedimento analítico como um todo são combinadas para obter-se a incerteza de medição.

Usualmente, a abordagem *bottom-up* é mais trabalhosa e exige uma quantidade maior de informações para a estimativa da incerteza combinada e expandida. Por outro lado, permite identificar as fontes de incerteza mais significativas, o que pode auxiliar no controle e/ou redução da incerteza final. Os principais métodos utilizados na abordagem *bottom-up* são: a) a lei de propagação de incertezas (seção 3.1); o método da planilha (seção 3.2); e c) o método de simulação de Monte Carlo (seção 3.3).

Por sua vez, a abordagem *top-down* é menos trabalhosa e requer menor quantidade de informação para a estimativa da incerteza combinada e expandida. Entretanto, não permite quantificar a contribuição individual de cada fonte de incerteza, além de usualmente levar a uma incerteza final superestimada. Os principais métodos utilizados na abordagem *top-down* são: a) incerteza a partir dos resultados de validação de métodos (seção 3.4); e b) estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (seção 3.5).

3.1. Lei da propagação das incertezas

A combinação das diversas incertezas padrão quantificadas pode ser realizada através da lei da propagação de incertezas, sendo aplicável tanto a incertezas de fontes individuais, de agrupamento de diversas fontes ou para o método como um todo [1]. A lei da propagação de incertezas, considerando-se um caso geral em que $y = f(x_1, x_2 \dots x_n)$, está apresentada nas equações (1a) e (1b).

$$u_y{}^2 = \sum_i^n \left(u_{x_i}{}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 \right) + \sum_i^n \sum_j^n \left(u_{x_i} u_{x_j} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right) \left(\frac{\partial y}{\partial x_j}\right) r_{ij} \right) \qquad \text{Eq. (1a)}$$

$$u_y = \sqrt{\sum_i^n \left({u_{x_i}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)^2 \right) + \sum_i^n \sum_j^n \left(u_{x_i} u_{x_j} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right) \left(\frac{\partial y}{\partial x_j}\right) r_{ij} \right)} \qquad \text{Eq. (1b)}$$

Onde: u_{x_i} é a incerteza padrão do *i*-éssimo componente de incerteza; $\left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right)$ é a derivada de *y* em função de x_i; e r_{ij} é o coeficiente de correlação entre x_i e x_j.

No caso particular em que $y = f(x_1, x_2)$, a incerteza combinada de y (u_y) pode ser expressa conforme apresentado nas equações (2a) e (2b).

$$u_y{}^2 = {u_{x_1}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + {u_{x_2}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 + u_{x_1} u_{x_2} \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right) \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right) r_{12} \qquad \text{Eq. (2a)}$$

$$u_y = \sqrt{{u_{x_1}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + {u_{x_2}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 + u_{x_1} u_{x_2} \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right) \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right) r_{12}} \qquad \text{Eq. (2b)}$$

A incerteza combinada de *y* (u_y) pode ser tanto aumentada como diminuída devido a correlação entre x_1 e x_2. Considerando-se que x_1 e x_2 sejam positivamente correlacionados ($r_{12} > 0$), podemos concluir que u_y será aumentada quando ambas as derivadas de x_1 e x_2 assumirem valores positivos ou negativos. Quando $r_{12} > 0$ e as derivadas de x_1 e x_2 assumirem valores positivo e negativo, respectivamente (ou o inverso, negativo e positivo, respectivamente), $u_{c(y)}$ será diminuída. Por outro lado, considerando que x_1 e x_2 sejam negativamente correlacionados ($r_{12} < 0$), podemos concluir que u_y será diminuída quando ambas as derivadas de x_1 e x_2 assumirem valores positivos ou negativos. Quando $r_{12} < 0$ e as derivadas de x_1 e x_2 assumirem valores positivo e negativo, respectivamente (ou o inverso, negativo e positivo, respectivamente), u_y será aumentada.

No caso particular em que $y = f(x_1, x_2)$ e x_1 e x_2 são independentes, logo $r_{12} = 0$. Portanto, a equação (2a) e (2b) podem ser simplificadas, conforme apresentado nas equações (3a) e (3b).

$$u_y{}^2 = {u_{x_1}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + {u_{x_2}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 \qquad \text{Eq. (3a)}$$

$$u_y = \sqrt{{u_{x_1}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + {u_{x_2}}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2} \qquad \text{Eq. (3b)}$$

Considerando-se que $y = f(x_1, x_2, x_3)$ e no caso particular em que são utilizadas apenas operações matemáticas de soma $(+)$ e subtração $(-)$ (por exemplo, $y = x_1 + x_2 - x_3$), temos que as derivadas de *y* em função de x_1, x_2 e x_3 serão +1, +1 e −1, respectivamente. Portanto, a equação (3a) por ser simplificada de forma a se obter as equações (4a) e (4b). Ou seja, neste caso particular, a incerteza combinada de *y* (u_y) pode ser obtida pela raiz quadrada das somas quadráticas das incertezas padrão de x_1, x_2 e x_3, conforme apresentado na equação (4c).

$$u_y{}^2 = u_{x_1}{}^2(+1)^2 + u_{x_2}{}^2(+1)^2 + u_{x_3}{}^2(-1)^2 = u_{x_1}{}^2 + u_{x_2}{}^2 + u_{x_3}{}^2 \qquad \text{Eq. (4a)}$$

$$u_y{}^2 = u_{x_1}{}^2 + u_{x_2}{}^2 + u_{x_3}{}^2 \qquad \text{Eq. (4b)}$$

$$u_y = \sqrt{u_{x_1}{}^2 + u_{x_2}{}^2 + u_{x_3}{}^2} \qquad \text{Eq. (4c)}$$

Ainda, considerando-se que $y = f(x_1, x_2, x_3)$ e no caso particular em que são utilizadas apenas operações matemáticas de multiplicação $(\times)$ e divisão $(\div)$ (por exemplo, $y = \frac{x_1 \times x_2}{x_3}$), temos que as derivadas de *y* em função de x_1, x_2 e x_3 serão $\frac{x_2}{x_3}$, $\frac{x_1}{x_3}$ e $-\frac{x_1 \times x_2}{x_3{}^2}$, respectivamente. Portanto, podemos simplificar a equação (3a), dividindo-se ambos os lados da mesma por y^2, de forma a se obter as equações (5a) e (5b). Ou seja, neste caso particular, a incerteza combinada de *y* (u_y) pode ser obtida por *y* multiplicado pela raiz quadrada das somas quadráticas das incertezas padrão relativas de x_1, x_2 e x_3, conforme apresentado na equação (5c).

$$\left(\frac{u_y}{y}\right)^2 = \frac{(u_{x_1})^2\left(\frac{x_2}{x_3}\right)^2}{\left(\frac{x_1 \times x_2}{x_3}\right)^2} + \frac{(u_{x_1})^2\left(\frac{x_1}{x_3}\right)^2}{\left(\frac{x_1 \times x_2}{x_3}\right)^2} + \frac{(u_{x_1})^2\left(-\frac{x_1 \times x_2}{x_3{}^2}\right)^2}{\left(\frac{x_1 \times x_2}{x_3}\right)^2} \qquad \text{Eq. (5a)}$$

$$\left(\frac{u_y}{y}\right)^2 = \left(\frac{u_{x_1}}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_2}}{x_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_3}}{x_3}\right)^2 \qquad \text{Eq. (5b)}$$

$$u_y = y\sqrt{\left(\frac{u_{x_1}}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_2}}{x_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_3}}{x_3}\right)^2} \qquad \text{Eq. (5c)}$$

Quando pertinente, as abordagens adotadas nas equações (4) e (5) podem ser associadas, de modo a permitir a obtenção da incerteza combinada em casos em que ocorram operações matemáticas de soma/subtração e multiplicação/divisão concomitantemente. Por exemplo, considerando-se que $y = f(x_1, x_2, x_3)$ dada por $y = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3}$, a incerteza combinada de y (u_y) pode ser obtida substituindo-se a equação (6a) na equação (6b), de forma a obter a equação (6c).

$$u_{(x_1 - x_2)} = \sqrt{(u_{x_1})^2 + (u_{x_2})^2} \qquad \text{Eq. (6a)}$$

$$u_y = y\sqrt{\left(\frac{u_{c(x_1 - x_2)}}{x_1 - x_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_3}}{x_3}\right)^2} \qquad \text{Eq. (6b)}$$

$$u_y = y\sqrt{\left(\frac{\sqrt{(u_{x_1})^2 + (u_{x_2})^2}}{x_1 - x_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{x_3}}{x_3}\right)^2} \qquad \text{Eq. (6c)}$$

A metodologia para avaliação de medição de incerteza descrita até este ponto é referida atualmente como a metodologia clássica de medição de incerteza, ou, metodologia do GUM.

3.2.Método da planilha de Kragten

Kragten propôs um método numérico alternativo para combinação das incertezas individuais empregando planilhas de cálculos. O método da planilha pode ser usado para simplificar o cálculo da incerteza combinada. O procedimento proposto por Kragten utilizada a vantagem de uma aproximação de um método numérico diferencial, e exigem conhecimento apenas da equação para obtenção do resultado final e dos valores numéricos dos parâmetros de entrada e suas incertezas.

A seguir é apresentado um exemplo da aplicação do método proposto por Kragten. Considere que $y = f(x_1, x_2, x_3)$ dada por $y = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3}$. A **Figura 3** apresenta as equações utilizadas para o cálculo da incerteza combinada pelo método da planilha proposto por Kragten. O procedimento usualmente empregado para o cálculo da incerteza combinada abrange as seguintes etapas:

- Entrar com os valores de x_1, x_2 e x_3 na coluna A da planilha, nas células A2, A3 e A4, respectivamente;
- Entrar com a equação que define $y = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3}$ ao final da coluna A da planilha, na célula A5;
- Entrar com os valores de u_{X_1}, u_{X_2} e u_{X_3} na linha 1 da planilha, nas células B1, C1 e D1, respectivamente;
- Copiar os valores das células A2, A3, A4 e A5 para as colunas B, C e D;
- Calcular a soma das incertezas de u_{X_1}, u_{X_2} e u_{X_3} aos valores de x_1, x_2 e x_3 nas células B2, C3 e D4, respectivamente;
- Desta forma, os valores de y calculados nas células B5, C5 e D5 serão $y_{x_1} = \frac{(x_1 + u_{X_1} - x_2)}{x_3}$, $y_{x_2} = \frac{(x_1 - x_2 + u_{X_2})}{x_3}$ e $y_{x_3} = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3 + u_{X_3}}$, respectivamente;
- Calcular as diferenças $(y_{x_1} - y)$, $(y_{x_2} - y)$ e $(y_{x_3} - y)$ nas células B6, C6 e D6, respectivamente;
- Calcular o quadrado das diferenças $(y_{x_1} - y)^2$, $(y_{x_2} - y)^2$ e $(y_{x_3} - y)^2$ nas células B7, C7 e D7;
- Calcular a soma dos quadrados das diferenças, $\sum_{i=1}^{n=3} (y_{x_i} - y)^2$, a partir das células B7, B8 e B8 na célula A7;
- Calcular a incerteza combinada como a raiz quadrada da célula A7, $u_y = \sqrt{\sum_{i=1}^{n=3} (y_{x_i} - y)^2}$.

	Coluna A	Coluna B	Coluna C	Coluna D
Linha 1		u_{X_1}	u_{X_2}	u_{X_3}
Linha 2	x_1	$x_1 + u_{X_1}$	x_1	x_1
Linha 3	x_2	x_2	$x_2 + u_{X_2}$	x_2
Linha 4	x_3	x_3	x_3	$x_3 + u_{X_3}$
Linha 5	$y = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3}$	$y_{x_1} = \frac{(x_1 + u_{X_1} - x_2)}{x_3}$	$y_{x_2} = \frac{(x_1 - x_2 + u_{X_2})}{x_3}$	$y_{x_3} = \frac{(x_1 - x_2)}{x_3 + u_{X_3}}$
Linha 6		$(y_{x_1} - y)$	$(y_{x_2} - y)$	$(y_{x_3} - y)$
Linha 7	$\sum_{i=1}^{n=3} (y_{x_i} - y)^2$	$(y_{x_1} - y)^2$	$(y_{x_2} - y)^2$	$(y_{x_3} - y)^2$
Linha 8	$\sqrt{\sum_{i=1}^{n=3} (y_{x_i} - y)^2}$			

Figura 3. Equações utilizadas para a cálculo da incerteza combinada empregado o método da planilha proposto por Kragten. Adaptado de [1].

O método da planilha apresenta como vantagem sua simplicidade por não exigir que sejam determinadas as equações diferenciais necessárias no cálculo da incerteza combinada pela lei da propagação das incertezas. Adicionalmente, possibilita a estimativa da incerteza combinada em softwares de planilha de cálculo simples como, por exemplo, o MS-Excel ou equivalentes. As fórmulas utilizadas em planilha MS-Excel para cálculo da incerteza combinada para o exemplo apresentado anteriormente estão apresentadas na **Figura 4**.

	Coluna A	Coluna B	Coluna C	Coluna D
Linha 1		u_{X_1}	u_{X_2}	u_{X_3}
Linha 2	x_1	=A2+B2	=A2	=A2
Linha 3	x_2	=A3	=A3+C1	=A2
Linha 4	x_3	=A4	=A4	=A2+D1
Linha 5	=(A2-A3)/A4	=(B2-B3)/B4	=(C2-C3)/C4	=(D2-D3)/D4
Linha 6		=B5-A5	=C5-A5	=D5-A5
Linha 7	=(B7+C7+D7)	=B6^2	=C6^2	=D6^2
Linha 8	=RAIZQUAD(A7)			

Figura 4. Fórmulas utilizadas em planilha MS-Excel para cálculo da incerteza combinada empregado o método da planilha proposto por Kragten. Adaptado de [1].

Na maioria dos casos, o método da planilha proposto por Kragten irá fornecer valores praticamente idênticos aos obtidos pela lei de propagação das incertezas. Diferenças serão notadas quanto a incerteza padrão de um ou mais parâmetros de entrada não apresentarem distribuição normal ou quando o resultado do mensurando apresentar uma relação não-linear em relação a um ou mais parâmetros de entrada. Em casos de não-linearidade, o método da planilha irá apresentar uma estimativa de incerteza combinada mais realista que aquele obtido pela lei de propagação de incertezas, uma vez que a abordagem proposta por Kragten permite calcular a real variação do resultado quando o parâmetro de entrada varia. [1]

3.3.Simulações de Monte Carlo

O método de simulação de Monte Carlo foi incluído como método alternativo para a medição da incerteza na terceira e mais atual edição do guia EURACHEM [1].

A simulação de Monte Carlo é uma poderosa ferramenta estatística baseada na geração de números aleatórios através de um algoritmo de amostragem [27]. O uso de simulações de Monte Carlo é mais uma ferramenta da gama de métodos estatísticos aplicados na resolução de problemas em diversas áreas da ciência, inclusive as química e

farmacêutica [28]. Os métodos de Monte Carlo datam de estudos de 1944, embora sejam reportadas em ocasiões anteriores formas menos sofisticadas do que seria a sistemática de geração aleatória de números presente nos métodos de Monte Carlo [29]. Durante a segunda guerra, o método de Monte Carlo foi utilizado como ferramenta de pesquisa no desenvolvimento da bomba atômica, mais precisamente na simulação da difusão de nêutrons em materiais passíveis de fissão nuclear [28, 29]. Posteriormente, popularizado por Fermi, Von Neumann e Ulam, os métodos de Monte Carlo ganharam espaço na comunidade matemática [29], e, mais à frente, encontrando aplicação nas áreas de engenharia, ciências econômicas, ciências da computação, física, química, biologia e farmacêutica, em tópicos como formação de polímeros, simulações moleculares, bioinformática [28], decaimento radioativo, mecânica de fluidos sob a perspectiva atômica, dissolução de fármacos, simulação de tráfego em vias, dentro outras [27].

A simulação de Monte Carlo pode ser definida como o uso da geração aleatória de números ou processos, através de algoritmos que utilizam funções de probabilidade de distribuição, ou uma modelagem matemática de algum processo ou sistema, para obter determinado resultado sobre o processo ou objeto em estudo. A ideia principal da simulação de Monte Carlo é que a repetição extensiva do processo de amostragem aleatória permita a obtenção de um espaço amostral suficientemente grande e randômico para uma inferência estatística [30]. Essa amostragem aleatória é essencial para as simulações de sistemas reais modelados matematicamente, e também é o que aproxima essa metodologia estatística ao conceito de variabilidade e incerteza de medição, pois permite que o resultado gerado no *output* da simulação varie dentro de uma faixa determinada pelo algoritmo como se fossem flutuações de erros aleatórios.

Os algoritmos usados nos métodos de Monte Carlo são simples, e possuem a capacidade de reduzir a complexidade de sistemas modelados matematicamente [30]. Isso os torna aplicáveis às mais diversas áreas da ciência [30, 31]. Dentro do contexto de medição de incerteza, a simulação de Monte Carlo aparece pela primeira vez em 2008, como um documento suplementar ao GUM, o JCGM 101:2008, o qual descreve a técnica de propagação de distribuições, aplicada através da simulação de Monte Carlo [32]. Com auxílio de software dedicado, sua aplicação pode ser mais simples que a metodologia clássica do GUM ou o método de Kragten. Alternativamente, o guia da EURACHEM fornece fórmulas e orientação para a implementação de simulação de Monte Carlo em softwares de planilha no caso de ausência de software dedicado. As principais fórmulas

empregadas para a geração de dados aleatórios com distribuição normal, retangular, triangular e t-Student em planilha de cálculo MS-Excel são apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Fórmulas usualmente empregadas para a geração de dados aleatórios com distribuição normal, retangular, triangular e t-Student.

Distribuição	Fórmula do MS-Excel
Normal	=NORMINV(RAND();*x*;*u*)
Retangular	=*x*+2**a**(RAND()-0,5) ou =*x*+2**u**SQRT(3)*(RAND()-0,5)
Triangular	=*x*+*a**(RAND()-RAND()) ou
	=*x*+*u**SQRT(6)*(RAND()-RAND())
t-Student	=*x*+*u**TINV(RAND();*gl*)

Onde: x = valor do parâmetro de entrada, u = incerteza padrão do parâmetro de entrada, a = metade do intervalo da distribuição retangular ou triangular, e gl = graus de liberdade da distribuição t-Student. Adaptado de [1].

É importante ressaltar que, há casos onde o valor associado à incerteza de medição será relativamente o mesmo independente da metodologia de avaliação utilizada. É encontrado na literatura científica o uso da simulação de Monte Carlo como forma de se garantir que as funções de probabilidade estimadas para os fatores de variabilidade na metodologia clássica, foram de fato assertivas, como uma espécie de contra prova da metodologia clássica [33, 34, 12]. As diferenças entre as metodologias ficam evidentes em cenários de não-normalidade de distribuição de resultados, de falta de linearidade de resposta entre as fontes de incerteza e a incerteza combinada ou ainda quando a expressão matemática relacionando o resultado e os fatores de variabilidade é complexa demais para ser calculada, levando a simplificações que levam a desvios na medição da incerteza. Nesses casos, a simulação de Monte Carlo aparece como a metodologia mais adequada para ser utilizada [1].

A simulação de Monte Carlo na medição de incerteza exige que o parâmetro avaliado (*output*) tenha uma relação matemática com os parâmetros de entrada (*inputs*). Essa relação matemática pode ser na forma de uma equação, função ou programa computacional que relacione tais parâmetros. Além disso, os *inputs* devem ter uma função de densidade de probabilidade própria, o que pode ser obtido por informações já existentes sobre o processo ou avaliadas experimentalmente. Durante a simulação de Monte Carlo, serão amostrados aleatoriamente das funções de densidade de probabilidade

de cada parâmetro de entrada um valor que, ao ser colocado na expressão matemática, gerará um resultado simulado do parâmetro ao qual se avalia a incerteza. Esse processo é então repetido por um número expressivo de vezes, usualmente entre 10^5 a 10^6 vezes, gerando uma distribuição de resultados simulados que será utilizado para a determinação da incerteza. Meyer reporta 10^4 como um valor mínimo de repetições [35]. Repetições tão baixas quanto 200 vezes já são suficientes para gerar um resultado de incerteza com variabilidade de ±10% [1].

A presença de funções de densidade de probabilidade para os parâmetros de entrada é uma diferença fundamental entre a simulação de Monte Carlo e o método de propagação de incertezas, o método do GUM. Enquanto o primeiro leva em conta a distribuição dos valores para os parâmetros de entrada, o segundo é mais determinístico e tanto os parâmetros de entrada como o resultado analítico possuem valores e incertezas calculados independentemente [36]. A **Figura 5** mostra uma representação gráfica da aplicação do método de simulações de Monte Carlo.

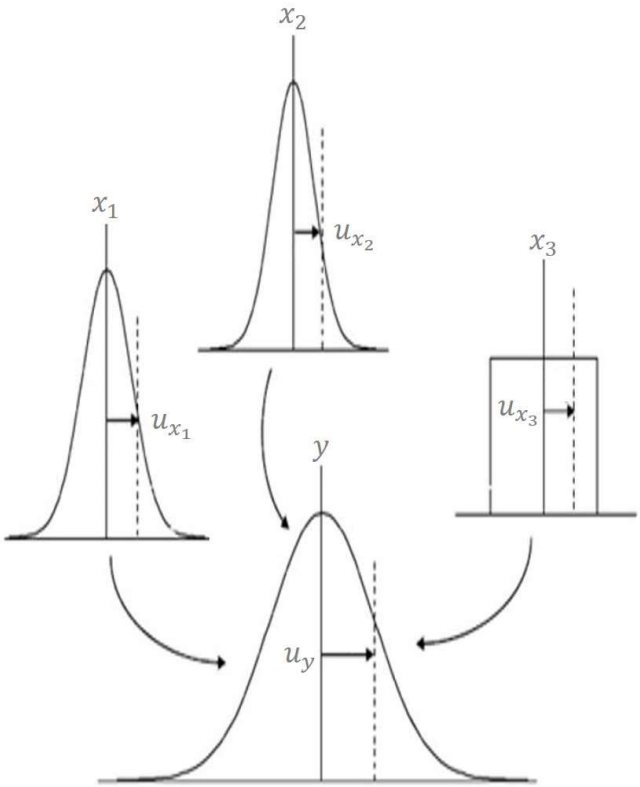


Figura 5. Representação gráfica da aplicação do método de simulações de Monte Carlo para uma resposta $y = f(x_1, x_2, x_3)$, com incertezas u_y, u_{x_1}, u_{x_2} e u_{x_3}, respectivamente.

As principais desvantagens do uso da simulação de Monte Carlo na medição de incerteza são relativas a acessibilidade ao hardware e a complexidade computacional exigidas, sendo esta última em parte bem atendida pelo uso de *softwares* dedicados [35]. Além disso, é muito importante que o programa computacional que gera a amostragem seja capaz de manter a sua aleatoriedade para amostragens da ordem de 10^5 a 10^6. Este é um detalhe que reforça a necessidade de um gerador confiável de números randômicos e que demonstra a limitação dessa metodologia em conseguir níveis de confiança da ordem de 99%, não só pela influência que a amostragem randômica começa a apresentar sobre a medição de incerteza, mas também porque as caudas da distribuição normal são particularmente sensíveis às funções de probabilidade de distribuição das fontes de incerteza usadas como parâmetros de entrada [32]. Além disso, existe uma variabilidade nos valores de incerteza calculados pela metodologia a cada determinação realizada. Isto é reflexo do caráter aleatório de amostragem do método, que acaba sempre gerando um resultado de incerteza ligeiramente diferente que o anterior, mesmo que a relação matemática entre fatores de entrada e resultado não tenha sido alterada. Essa variação de uma determinação para a outra é compensada quando o número de valores aleatórios gerados é da ordem de 10^5 para cima.

3.4.Incerteza a partir dos resultados de validação de métodos

A metodologia clássica de medição de incerteza pode ser vista como extensa e complexa por alguns. Essa, pelo menos, foi a percepção inicial de parte da comunidade analítica, que também reportou o alto custo envolvido para a avaliação de incerteza em todos os métodos analíticos de um determinado laboratório, como reportado à época da primeira edição do guia da EURACHEM [3]. Alternativamente, a incerteza combinada pode ser obtida a partir de dados dos estudos de validação de métodos para a determinação de incerteza de medição, algo que foi incorporado na segunda edição do guia da EURACHEM, como modo de resolver os pontos negativos expressados pela comunidade analítica.

A validação de métodos analíticos abrange a avaliação das características de performance do método, tais como especificidade/seletividade, linearidade, exatidão/recuperação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção/quantificação e robustez. A estimativa da incerteza de medição pode ser obtida

a partir dos resultados de validação de métodos, uma vez que permitem determinar os erros sistemáticos e aleatórios de todas as etapas envolvidas no método analítico de forma combinada nos parâmetros de exatidão e precisão, respectivamente.

Os estudos de precisão devem ser realizados considerando-se diferentes fontes de variabilidade, por exemplo, em condições de: a) repetibilidade - amostra analisada diversas vezes pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, no mesmo dia; e b) precisão intermediária – amostra analisada diversas vezes, por analistas diferentes, em equipamentos diferentes, em dias diferentes.

A incerteza associada a precisão do método pode ser calculada como o desvio padrão das diversas determinações em condições de repetibilidade e/ou reprodutibilidade. Usualmente, a precisão varia de acordo com o nível esperado do analito na amostra. Por exemplo, o desvio padrão aumenta significativamente com a concentração do analito. Neste caso, a estimativa da incerteza deve ser ajustada para que a precisão seja adequada ao resultado analítico obtido.

A exatidão do método é usualmente estimada com base em resultados obtidos a partir de análises de material de referência certificado (CRM – *Certified reference material*). Em algumas situações, faz-se necessário o preparo de amostras simuladas, obtidas a partir da adição de quantidade conhecida de substância química de referência ao placebo (matriz semelhante à amostra usualmente analisada, porém sem a presença do analito de interesse). Neste caso, a exatidão pode ser determinada como a recuperação da quantidade mensurada de analito em razão a quantidade de analito adicionado na amostra simulada. A equação utilizada é $R = \frac{Q^*}{Q}$, onde Q^* é a quantidade mensurada de analito e Q é a quantidade de analito adicionada a amostra simulada. Quando o placebo não está disponível, a recuperação pode ser determinada pela diferença das quantidades de analito mensuradas em amostras com e sem adição de analito pela razão da quantidade de analito adicionada na amostra. Neste caso, a equação utilizada é $R = \frac{Q^+ - Q^0}{Q}$, onde Q^+ e Q^0são as quantidades mensuradas de analito nas amostras com e sem adição de analito, respectivamente, e Q é a quantidade de analito adicionada a amostra simulada.

Quando o método apresenta erro sistemático (*bias*) desprezível, a incerteza da exatidão pode ser estimada como o desvio padrão obtido a partir das análises de diferentes determinações de recuperação, combinado com a incerteza do material de referência certificado (quando disponível). Caso o erro sistemático seja significativo, pode ser necessário aplicar um fator de correção para expressar o resultado final. Neste caso, o

resultado final pode ser obtido dividindo-se o valor medido pela recuperação média. O guia Nordtest apresenta uma abordagem em que está correção é dispensada, pois inclui um componente de incerteza adicional associado a exatidão. Este componente de incerteza adicional é calculado pela diferença entre o valor medido e aquela aceito como verdadeiro.

A incerteza combinada obtida a partir dos resultados de validação do método analítico pode ser obtida pela equação (7a). A incerteza associada a precisão ($u_{Precisão}$) pode ser determinada a partir do desvio padrão (ou desvio padrão combinado) em condições de precisão intermediária ($s_{Precisão\ Intermediária}$), enquanto que a incerteza associada a exatidão ($u_{Exatidão}$) pode ser determinada a partir do erro sistemático ($1 - R$ ou $100\% - R$), da incerteza associada aos ensaios de recuperação (u_R) e da incerteza da substância química de referência utilizada (u_{CRM}), conforme a equação (7b).

$$u_y = \sqrt{{u_{Precisão}}^2 + {u_{Exatidão}}^2} \qquad \text{Eq. (7a)}$$

$$u_{Exatidão} = \sqrt{(1 - R)^2 + {u_R}^2 + {u_{CRM}}^2} \qquad \text{Eq. (7b)}$$

Adicionalmente, outras fontes de incerteza podem ser consideradas, tais como a incerteza associada a especificidade/ seletividade, incerteza associada a linearidade, incerteza associada ao limite de detecção e quantificação, e incerteza associada a robustez do método analítico. Estas incertezas podem ser essencialmente classificadas como fontes de erros sistemáticos ou aleatórios, que afetam a exatidão e a precisão do método, respectivamente. A classificação de cada parâmetro de validação de acordo com o tipo de erro associado está apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2. Erros sistemáticos e aleatórios associados aos diferentes parâmetros de validação usualmente avaliados.

Tipo de erro	Parâmetro de validação
Sistemático	Especificidade/seletividade
	Linearidade
	Exatidão/Recuperação
Aleatório	Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)
	Limites de detecção/quantificação
	Robustez

O calculo da incerteza combinada a partir dos resultados de validação é uma forma simples e fácil de estimar a incerteza de medição, uma vez que leva em consideração essencialmente dois componentes de incerteza: a exatidão e a precisão. Na realidade, os erros sistemáticos e aleatórios de cada etapa do procedimento analítico estão estimados de forma combinada nos componentes de incerteza exatidão e precisão, respectivamente. Por outro lado, esta abordagem não permite identificar as fontes de incerteza mais relevantes, o que pode ser uma limitação quando são necessários estabelecer os pontos críticos do procedimento e/ou estratégias para a redução da incerteza combinada final.

3.5.Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade

Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade, tais como os estudos interlaboratoriais e os ensaios de proficiência são uma alternativa para a estimativa da incerteza de medição de métodos oficiais e/ou métodos bem-estabelecidos. É uma abordagem *top-down* pois, semelhantemente à abordagem adotada na estimativa da incerteza a partir dos resultados de validação, a incerteza combinada é calculada a partir das componentes dos erros sistemáticos e aleatórios.

Num estudo interlaboratorial ou ensaio de proficiência, o erro sistemático de um laboratório em particular pode ser estimado como a diferença entre o resultado analítico obtido pelo laboratório e o valor médio calculado a partir de todos os laboratórios participantes. O *Z-score* pode ser obtido dividindo-se esta diferença pela variabilidade

(desvio padrão) dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes. Valores de *Z-score* menores ou igual a 2 indicam o laboratório apresenta resultado analítico satisfatório. Ou seja, o erro sistemático é desprezível. Por outro lado, quando o *Z-score* é maior que 3 o laboratório apresenta resultado analítico insatisfatório. Valores de *Z-score* entre 2 e 3 indicam resultado questionável.

Por outro lado, a precisão em condições de reprodutibilidade (diferentes laboratórios, analistas, equipamentos, etc.) pode ser estimado como o desvio padrão dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes. Quando realizado de forma controlada e sistematizada, os estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (estudos RR) permitem identificar quais os fatores que contribuem de forma significativa para a variabilidade total. Por exemplo, num estudo RR em que diversas amostras são analisadas por 3 analistas diferentes utilizando 2 equipamentos diferentes, é possível determinar qual o fator que contribui de forma significativa para a incerteza final: os analistas ou os equipamentos. Ainda, é possível identificar uma possível interação entre os fatores, por exemplo, os resultados de um determinado analista utilizando um determinado equipamento apresenta discrepâncias em relação ao mesmo analista utilizando outros equipamentos ou ao mesmo equipamento utilizado por outros analistas. Esta abordagem pode ser útil para identificar necessidades de treinamentos ou níveis de experiência inadequados, necessidade de calibração/qualificação de equipamentos, dentre outras questões relevantes na busca pela redução da incerteza de medição.

Estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (estudos RR), estudos interlaboratoriais e ensaios de proficiência podem fornecer uma estimativa da incerteza de medição superestimada em relação às outras abordagens, uma vez que leva em consideração a variabilidade devido à diferentes laboratórios, analistas, equipamentos, dentre outros fatores que usualmente não são considerados nas demais abordagens. [37]

4. Incerteza de medição em análises de medicamentos

A eficácia e segurança de produtos farmacêuticos usualmente é garantida pela avaliação da qualidade por meio de testes físicos, químicos e microbiológicos. A identificação, quantificação e avaliação do perfil de liberação (dissolução) do princípio ativo em formas farmacêuticas, assim como a presenta de impurezas ou determinação da pureza/potência, podem ser realizadas empregando-se diferentes técnicas analíticas como espectrofotometria de absorção no UV-Visível, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), doseamento microbiológico, dentre outras.

Todas estas técnicas geram resultados analíticos, que representam uma etapa importante na avaliação de qualidade. As decisões quanto aceitar ou rejeitar um lote de medicamento usualmente são baseadas nestes resultados analíticos. Neste contexto, a incerteza de medição é uma ferramenta útil para avaliar a qualidade do resultado analítico e auxiliar das decisões de conformidade (não-conformidade) dos medicamentos frente as especificações.

4.1. Métodos espectrofotométricos

A espectrofotometria de absorção no UV-Visível é uma das técnicas mais utilizadas, particularmente nas análises quantitativas de fármacos e medicamentos. Dentre as vantagens da espectrofotometria de absorção no UV-Visível, podemos destacar a facilidade de operação, boa sensibilidade, boa exatidão, seletividade moderada e ampla aplicabilidade. A técnica fundamenta-se na lei de Beer ($A = \alpha \times l \times C$), que tem como princípio a relação entre a quantidade de luz absorvida (A), a absortividade do composto analisado (α), o caminho óptico percorrido (l) e a concentração do composto analisado (C). A principal aplicação da espectrofotometria de absorção no UV-Visível é a quantificação de fármacos, que pode ser realizada por meio da comparação a absorbância da solução amostra com aquela obtida empregando-se solução padrão, ou alternativamente pelo valor de absortividade (α considerando C =1% e l = 1 cm).

4.1.1. Quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UV

Saviano e Lourenço [14] realizaram estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas à quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

A quantificação de linezolida em formas farmacêuticas foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível ajustado à 254 nm, empregando-se água ultrapurificada como branco. As soluções padrão e amostra foram diluídas em água ultrapurificada até concentração de 10 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 6** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

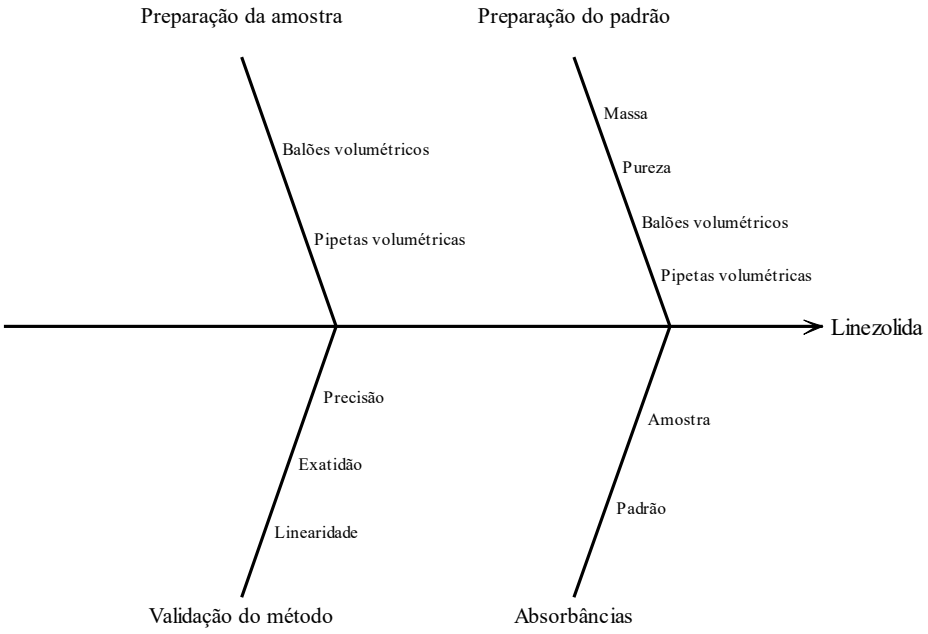


Figura 6. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [14].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 3** apresenta a relação dos valores dos componentes de

incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 3 Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	10,1 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cs} conforme Eq. (8)	Pureza do padrão de referência	Pot	0,995	0,005*	0,0029
	Balão volumétrico de 100 mL	$100vf$	100,0 mL	0,2 mL	0,1 mL
	Pipeta volumétrica de 5 mL	$5vp$	5,00 mL	0,02 mL	0,01 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	$50vf$	50,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
Preparação da solução amostra	Pipeta volumétrica de 1 mL	$1vp$	1,000 mL	0,004 mL	0,002 mL
u_{Cu} conforme Eq. (9)	Balão volumétrico de 200 mL	$200vf$	200,0 mL	0,4 mL	0,2 mL
Absorbâncias	Da solução padrão	As	0,554	0,001*	0,0006
u_A conforme Eq. (10)	Da solução amostra	Au	0,517	0,001*	0,0006
Validação do método	Linearidade	Lin	1,000	-	0,0062
u_V conforme Eq. (11)	Exatidão	Acc	0,9985	-	0,0026
	Precisão	Pr	1,0000	-	0,0060

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular. Adaptado de [14].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}), das absorbâncias medidas (u_A) e da validação do método (u_V) estão apresentas nas equações (8), (9), (10) e (11), respectivamente. As incertezas intermediárias foram combinadas na incerteza final conforme a equação (12).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{100vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{5vp}}{5vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{50vf}}{50vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (8)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{1v}}{1v}\right)^2 + \left(\frac{u_{200vf}}{200vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (9)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (10)}$$

$$u_V = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{{u_{Lin}}^2 + {u_{Pr}}^2 + \left(\frac{u_{Acc}}{Acc}\right)^2} \qquad \text{Eq. (11)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + {u_V}^2} \qquad \text{Eq. (12)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 3** nas equações (8) a (12), podemos calcular que a quantidade de linezolida na forma farmacêutica foi de 93,9 ± 2,1% do valor rotulado, empregando-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 4**) e por simulações de Monte Carlo, empregando-se 100.000 simulações (**Figura 7**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha e de Monte Carlo foram semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

Tabela 4. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV.

Valores \ Incertezas		u_{ws}	u_{Pot}	u_{100vf}	u_{5vp}	u_{50vf}	u_{1vp}	u_{200vf}	u_{As}	u_{Au}	u_{Lin}	u_{Acc}	u_{Pr}
		0,05	0,0029	0,1	0,01	0,05	0,002	0,2	0,0006	0,0006	0,0062	0,0026	0,006
ws	10,10	10,15	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
Pot	0,9950	0,9950	0,9979	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950
$100vf$	100,0	100,0	100,0	100,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
$5vp$	5,00	5,00	5,00	5,00	5,01	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
$50vf$	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,05	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
$1vp$	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,002	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
$200vf$	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,2	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
As	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5546	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540
Au	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5176	0,5170	0,5170	0,5170
Lin	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0062	1,0000	1,0000
Acc	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	1,0011	0,9985
Pr	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0060
	93,92	94,39	94,20	93,83	94,11	93,83	93,74	94,02	93,82	94,03	94,51	93,68	94,49
		0,46	0,27	-0,09	0,19	-0,09	-0,19	0,09	-0,10	0,11	0,58	-0,24	0,56
	1,13	0,22	0,07	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,34	0,06	0,32
$u =$	1,06		$k =$	2,00		$U =$	2,1						

Adaptado de [14].

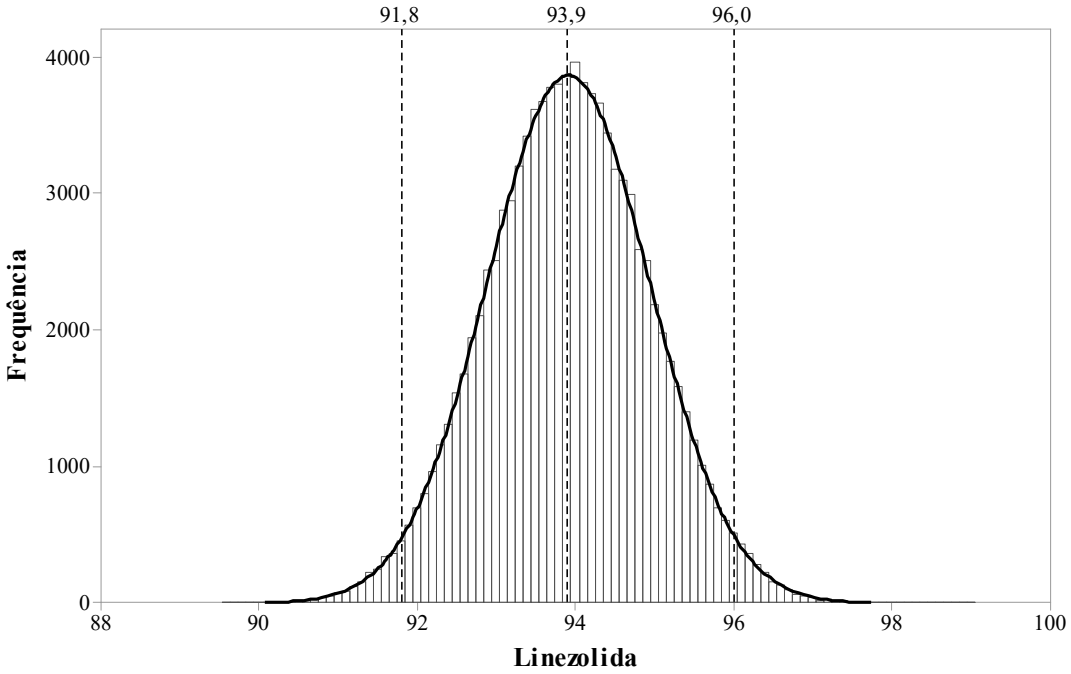


Figura 7. Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [14].

A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 8**. As incertezas associadas a linearidade, precisão e massa do padrão de referência constituíram-se as principais fontes de incerteza, contribuindo com cerca de 77% da incerteza total. A contribuição da incerteza associada a massa do padrão de referência de linezolida pode ser reduzida através do aumento da massa do mesmo (por exemplo, para 25,0 mg). Por outro lado, as incertezas associadas às absorbâncias (do padrão e da amostra) e aos balões e pipetas volumétricas apresentaram pequena contribuição para a incerteza final.

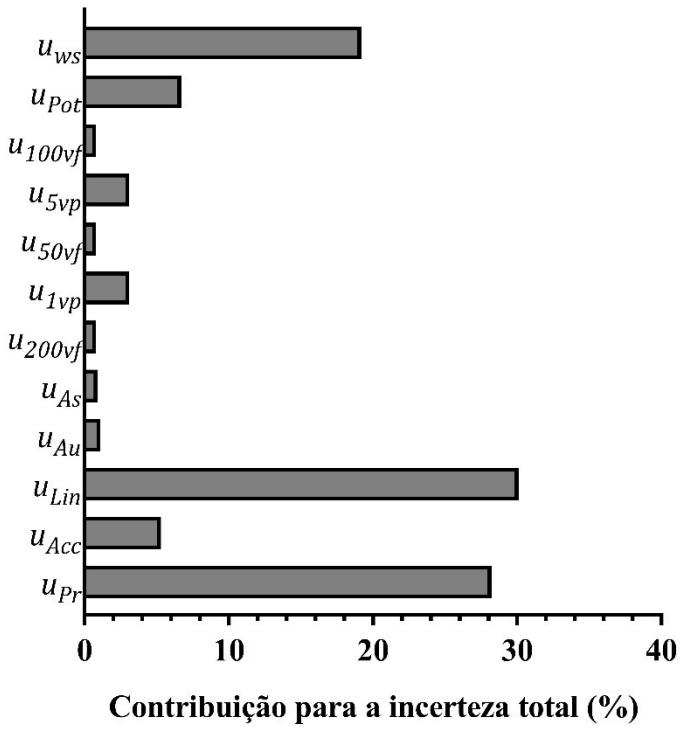


Figura 8. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de linezolida por UV. Adaptado de [14].

4.1.2. Quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas por UV

Francisco e colaboradores [19] identificaram as principais fontes de incerteza e propuseram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada a quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

A quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível ajustado a 249 nm, empregando-se ácido clorídrico 0,1 M diluído em metanol como branco. As soluções-amostra foram diluídas em ácido clorídrico 0,1 M diluído em metanol até concentração de 10 µg/mL. A quantidade de paracetamol foi calculada considerando-se a absortividade α (1%, 1 cm) = 880, em 249 nm. Neste estudo, foram analisadas soluções orais contendo paracetamol de cinco diferentes fabricantes (A e E) .

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 9** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

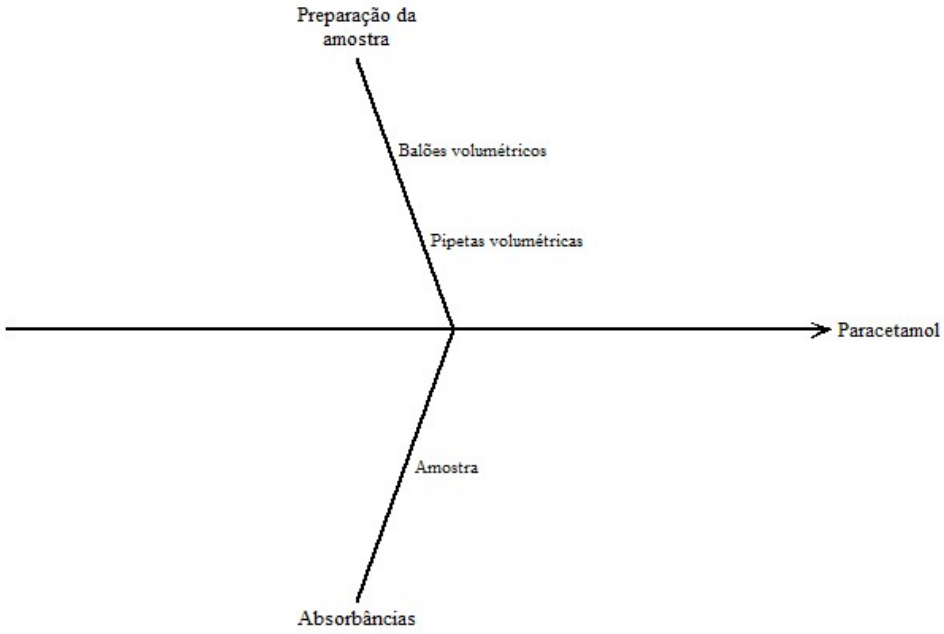


Figura 9. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de paracetamol por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [19].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 5** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 5. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de paracetamol em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

Fonte (i) (Tipo)	Amostra A		Amostra B		Amostra C		Amostra D		Amostra E	
	M_i	u_i	M_i	u_i	M_i	u_i	M_i	u_i	M_i	u_i
A (A)	0,9265	0,0036	0,9280	0,0036	0,9440	0,0036	0,9390	0,0036	0,9065	0,0036
$1vp1$ (B)	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017
$200vf$ (B)	200,00	0,35	200,00	0,35	200,00	0,35	200,00	0,35	200,00	0,35
$1vf2$ (B)	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017	1,0000	0,0017
$100vf$ (B)	100,00	0,17	100,00	0,17	100,00	0,17	100,00	0,17	100,00	0,17
% Eq. (13)	210,6	1,1	210,9	1,1	214,5	1,1	213,4	1,1	206,0	1,1

(A)= incerteza tipo A, obtida de determinações repetidas; (B) = incerteza tipo B, obtida a partir dos certificados de calibração.

M_i = valor do i-éssimo mensurando, u_i = incerteza padrão i-éssimo mensurando. Adaptado de [19].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação das soluções amostra e das absorbâncias está apresentas na equação (13), respectivamente, sendo que % é definido pela equação (14).

$$u_{\%} = \% \times \sqrt{\left(\frac{u_A}{A}\right)^2 + \left(\frac{u_{1vp1}}{1vp1}\right)^2 + \left(\frac{u_{200vf}}{200vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{1vp2}}{1vp2}\right)^2 + \left(\frac{u_{100vf}}{100vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (13)}$$

$$\% = \frac{A \times 200vf100vf \times 10}{1vp1 \times 1vp2 \times 880} \qquad \text{Eq. (14)}$$

Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas por estudo de repetibilidade e reprodutibilidade (**Tabela 6**), pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 7**) e por simulações de Monte Carlo, empregando-se 50.000 simulações (**Figura 10**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha e de Monte Carlo foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

Tabela 6. Fontes de variabilidade para o estudo de repetibilidade e reprodutibilidade (RR) utilizado para a estimativa da incerteza de medição.

Fontes de variabilidade	Equação	Variância (Contribuição %)	Desvio padrão
Medição	$s_M^2 = \frac{\sum_{j=1}^{k}\sum_{i=1}^{n}(xij - \bar{x}j)^2}{(n-1)(k-1)}$	1,33 (13%)	1,15
Processo	$s_P^2 = s_T^2 - s_M^2$	8,88 (87%)	2,98
Total	$s_T^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(xi - \bar{x})^2}{n-1}$	10,21 (100%)	3,20

Adaptado de [19].

Tabela 7. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de paracetamol em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

Fontes de incerteza (Amostra A)		u_A 0,0036	u_{1vp1} 0,0017	u_{200vf} 0,35	u_{1vp2} 0,0017	u_{100vf} 0,17
A	0,9265	0,9301	0,9265	0,9265	0,9265	0,9265
$1vp1$	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000	1,0000	1,0000
$200vf$	200,00	200,00	200,00	200,35	200,00	200,00
$1vp2$	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,17
%	210,57	211,38	210,20	210,93	210,20	210,93
Fontes de incerteza (Amostra B)		u_A 0,0036	u_{1vp1} 0,0017	u_{200vf} 0,35	u_{1vp2} 0,0017	u_{100vf} 0,17
A	0,9280	0,9316	0,9280	0,9280	0,9280	0,9280
$1vp1$	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000	1,0000	1,0000
$200vf$	200,00	200,00	200,00	200,35	200,00	200,00
$1vp2$	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,17
%	210,91	211,72	210,54	211,27	210,54	211,27
Fontes de incerteza (Amostra C)		u_A 0,0036	u_{1vp1} 0,0017	u_{200vf} 0,35	u_{1vp2} 0,0017	u_{100vf} 0,17
A	0,9440	0,9476	0,9440	0,9440	0,9440	0,9440
$1vp1$	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000	1,0000	1,0000
$200vf$	200,00	200,00	200,00	200,35	200,00	200,00
$1vp2$	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,17
%	214,55	215,36	214,17	214,92	214,17	214,92
Fontes de incerteza (Amostra D)		u_A 0,0036	u_{1vp1} 0,0017	u_{200vf} 0,35	u_{1vp2} 0,0017	u_{100vf} 0,17
A	0,9390	0,9426	0,9390	0,9390	0,9390	0,9390
$1vp1$	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000	1,0000	1,0000
$200vf$	200,00	200,00	200,00	200,35	200,00	200,00
$1vp2$	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,17
%	213,41	214,22	213,04	213,78	213,04	213,78
Fontes de incerteza (Amostra E)		u_A 0,0036	u_{1vp1} 0,0017	u_{200vf} 0,35	u_{1vp2} 0,0017	u_{100vf} 0,17
A	0,9065	0,9101	0,9065	0,9065	0,9065	0,9065
$1vp1$	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000	1,0000	1,0000
$200vf$	200,00	200,00	200,00	200,35	200,00	200,00
$1vp2$	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0017	1,0000
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,17
%	206,02	206,84	205,67	206,38	205,67	206,38

Adaptado de [19].

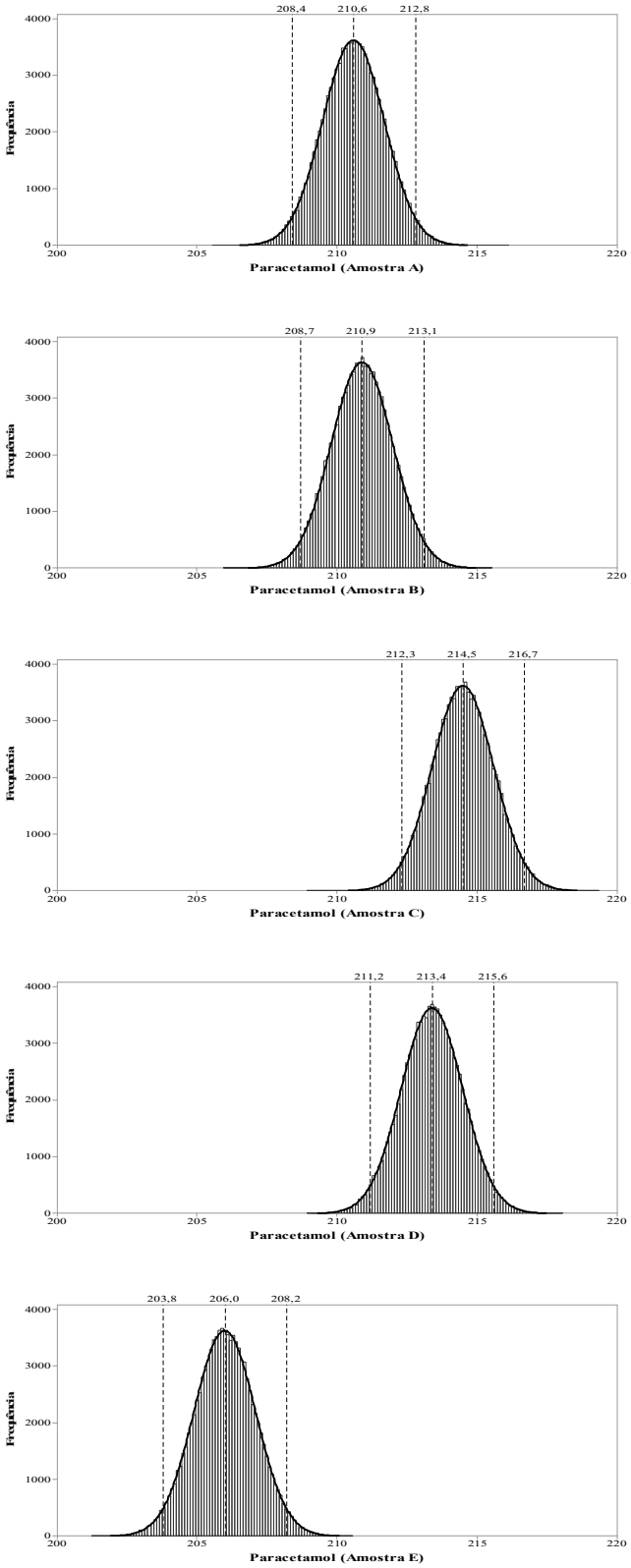


Figura 10. Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de paracetamol (amostras A, B, C, D e E, de diferentes fabricantes) por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [19].

De acordo com os resultados, todas as quatro abordagens para estimativa da incerteza de medição podem ser empregadas em análises de rotina, com algumas vantagens e limitações. A incerteza de medição pode ser estimada por estudos de repetibilidade e reprodutibilidade (RR) e é a forma mais simples de estimar a incerteza. Entretanto, fornece informações limitadas quanto a contribuição de cada fonte de incerteza.

Por outro lado, a lei da propagação de incertezas e o método da planilha de Kragten são recomendados quanto se pretende ter um estudo mais aprofundado sobre quanto cada fonte de incerteza contribui para a incerteza total. Estas abordagens são convenientes para identificação as fontes de incerteza mais relevantes, o que pode ser útil quando se busca estratégias para reduzir a incerteza total ou para simplificar o procedimento de cálculo da incerteza combinada.

O emprego das abordagens da lei da propagação de incertezas e do método da planilha de Kragten depende no conhecimento prévio sobre como o resultado analítico (variável dependente) é afetado pelas condições analíticas (variáveis independentes). Mesmo se a função matemática utilizada para o cálculo do resultado analítico estiver bem estabelecida, pode ser difícil e dispendioso a realização de estudos para estimar a incerteza combinada segundo estas abordagens.

Nestes casos, a incerteza de medição pode ser estimada empregando-se simulações de Monte Carlo, baseado num grande número de simulações (usualmente maior que 50.000 simulações). Além disso, o método de Monte Carlo pode ser utilizado em funções matemáticas não-lineares ou obtidas a partir de análise de regressão múltipla (*Multiple Regression Analysis* – MRA), metodologia de superfície resposta (*Response Surface Methodology* - RSM) ou planejamento de experimentos (*Design of Experiments* - DoE) [38, 39, 40].

4.1.3. Quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas por UV

Takano e colaboradores [15] realizaram estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas à quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

A quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível ajustado à 282 nm, empregando-se tampão fosfato pH 3,0

como branco. As soluções padrão e amostra foram diluídas em tampão fosfato pH 3,0 até concentração de 10 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 11** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

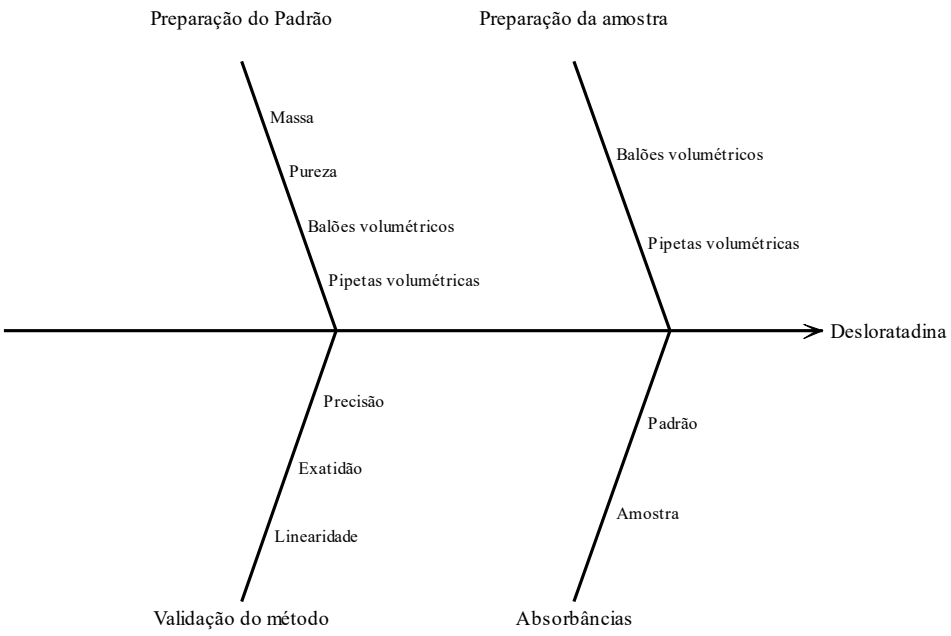


Figura 11. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [15].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 8** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 8. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	25,0 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cs} conforme Eq. (15)	Pureza do padrão de referência	Pot	0,998	0,002*	0,0008
	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf1$	25,0 mL	0,03 mL**	0,017 mL
	Pipeta volumétrica de 500 µL	$500vp1$	500 µL	3,2 µL**	1,8 µL
	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf2$	25,0 mL	0,03 mL**	0,017 mL
Preparação da solução amostra	Massa da amostra	wu	512,0 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cu} conforme Eq. (16)	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf3$	25,0 mL	0,03 mL**	0,017 mL
	Pipeta volumétrica de 500 µL	$500vp2$	500 µL	3,2 µL**	1,8 µL
	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf4$	25,0 mL	0,03 mL**	0,017 mL
Absorbâncias	Da solução padrão	As	0,5829	0,0010	0,0005
u_A conforme Eq. (17)	Da solução amostra	Au	0,5734	0,0010	0,0005

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular, **distribuição triangular. Adaptado de [15].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}) e das absorbâncias medidas (u_A) estão apresentas nas equações (15), (16) e (17), respectivamente. As incertezas intermediárias foram combinadas na incerteza final conforme a equação (18).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf1}}{25vf1}\right)^2 + \left(\frac{u_{500vp1}}{500vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf2}}{25vf2}\right)^2} \qquad \text{Eq. (15)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{wu}}{wu}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf3}}{25vf3}\right)^2 + \left(\frac{u_{500vp2}}{500vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf4}}{25vf4}\right)^2} \qquad \text{Eq. (16)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (17)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2} \qquad \text{Eq. (18)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 8** nas equações (15) a (18), podemos calcular que a quantidade de linezolida na forma farmacêutica foi de 98,2 ± 1,1% do valor rotulado, empregando-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. A incerteza de medição também foi calculada a partir dos dados de validação, empregando-se a equação (19).

$$u_{\%V} = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{{u_{Lin}}^2 + {u_{Pr}}^2 + \left(\frac{u_{Acc}}{Acc}\right)^2} \qquad \text{Eq. (19)}$$

As incertezas associadas a preparação da solução padrão e preparação da solução amostra constituíram-se as principais fontes de incerteza, contribuindo com cerca de 54,7% e 40,9% da incerteza total, respectivamente. A contribuição da incerteza associada a pureza do padrão de desloratadina foi reduzida, uma vez que foi empregado USP desloratadina RS (Pot = 0,998 e u_{Pot} = 0,0008) em substituição ao padrão secundário (Pot = 0,990 e u_{Pot} = 0,004), inicialmente utilizado no estudo. As contribuições das diferentes fontes de incerteza estão apresentadas na **Figura 12**.

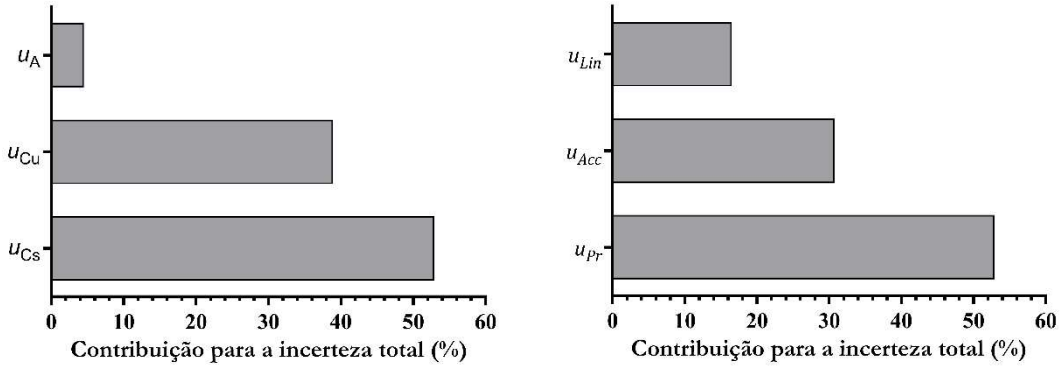


Figura 12. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de desloratadina em formas farmacêuticas por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [15].

Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 9**), por simulações de Monte Carlo, empregando-se 100.000 simulações (**Figura 13**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha (98,2 ± 1,1%), de Monte Carlo (98,2 ± 1,1%) e a partir dos dados de validação (98,2 ± 1,2%)

foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

A incerteza total para quantificação de desloratadina (1,1%) foi similar àquelas obtidas para quantificação de codeína fosfato (1,2%) e linazolida (2,1%), em ambos os casos empregando espectrofotometria de absorção no UV. Além disso, as incertezas associadas à quantificação por espectrofotometria de absorção no UV foram menores que àquelas obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE).

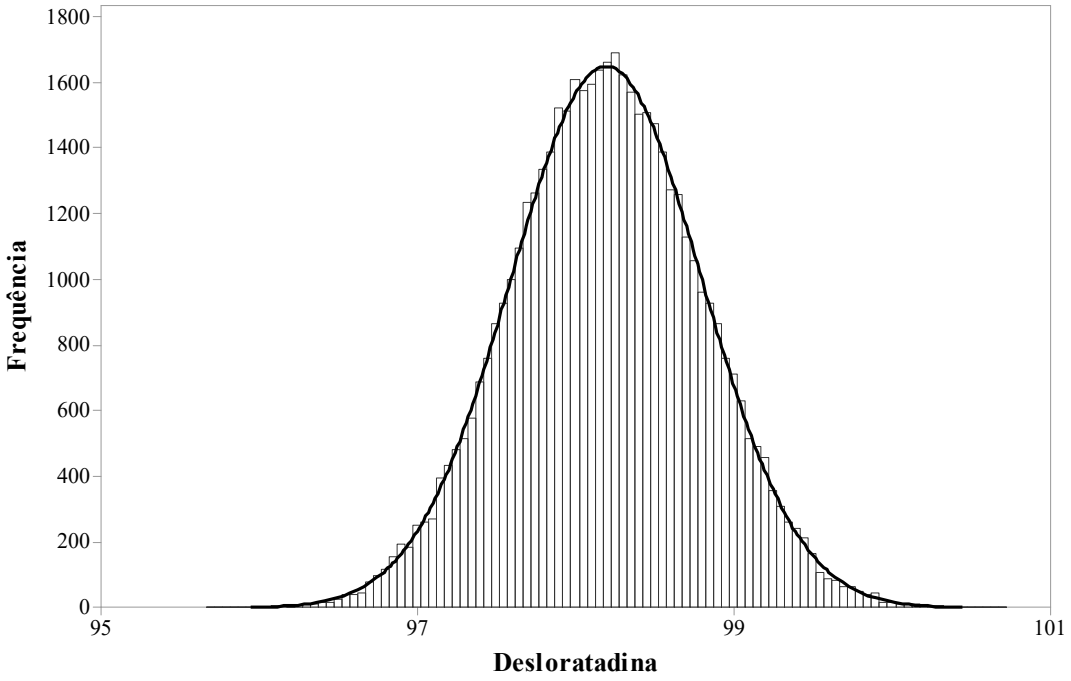


Figura 13. Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de desloratadina por espectrofotometria de absorção no UV. Adaptado de [15].

Tabela 9. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de desloratadina por espectrofotometria de absorção no UV.

Valores \ Incertezas		u_{ws}	u_{Pot}	u_{100vf}	u_{5vp}	u_{50vf}	u_{1vp}	u_{200vf}	u_{As}	u_{Au}	u_{Lin}	u_{Acc}	u_{Pr}
		0,05	0,0029	0,1	0,01	0,05	0,002	0,2	0,0006	0,0006	0,0062	0,0026	0,006
ws	10,10	10,15	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
Pot	0,9950	0,9950	0,9979	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950	0,9950
$100vf$	100,0	100,0	100,0	100,1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
$5vp$	5,00	5,00	5,00	5,00	5,01	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
$50vf$	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,05	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
$1vp$	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,002	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
$200vf$	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,2	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
As	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540	0,5546	0,5540	0,5540	0,5540	0,5540
Au	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5170	0,5176	0,5170	0,5170	0,5170
Lin	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0062	1,0000	1,0000
Acc	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	0,9985	1,0011	0,9985
Pr	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0060
	93,92	94,39	94,20	93,83	94,11	93,83	93,74	94,02	93,82	94,03	94,51	93,68	94,49
		0,46	0,27	-0,09	0,19	-0,09	-0,19	0,09	-0,10	0,11	0,58	-0,24	0,56
	1,13	0,22	0,07	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,34	0,06	0,32
$u =$	1,06		$k =$	2,00		$U =$	2,1						

Adaptado de [15].

4.2.Métodos cromatográficos

A cromatografia à líquido de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) é uma das técnicas mais utilizada no controle de qualidade de medicamentos, por ser versátil, de aplicação abrangente e apresentar boa reprodutibilidade. É uma técnica de separação de substâncias que tem aplicação analítica interessante, pois possibilita a análise qualitativa e quantitativa de misturas complexas.

No contexto da estimativa da incerteza de medição, diversas fontes de incerteza relacionadas a quantificação de fármacos por HPLC podem ser identificadas, tais como as incertezas de balanças analíticas, balões e pipetas volumétricas, a variabilidade das áreas dos picos cromatográficos utilizados para quantificação, dentre outras. A estimativa da incerteza de medição exige um estudo detalhado de todas as possíveis fontes de incerteza, entretanto é importante que o esforço despendido não seja desproporcional, o que pode inviabilizar a estimativa da incerteza de medição na rotina laboratorial.

4.2.1. Quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UPLC

Saviano e colaboratores [12] realizaram estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas à quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UPLC (*Ultra-high Performance Liquid Chromatography*).

A quantificação de linezolida em formas farmacêuticas foi realizada em cromatógrafo equipado com bomba binária, injetor automático, coluna cromatográfica Hypersil GOLD C18 de 5,0 cm de comprimento e 1,0 mm de diâmetro empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano (1,9 µm de tamanho de partícula) e detector UV-Visível ajustado à 254 nm. A fase móvel foi constituída de mistura de acetonitrila, água ultra-purificada e ácido trifluoracético (10:90:1). Foi empregado fluxo de 0,5 mL/min. As soluções padrão e amostra foram diluídas em água ultrapurificada até concentração de 10 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 14** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

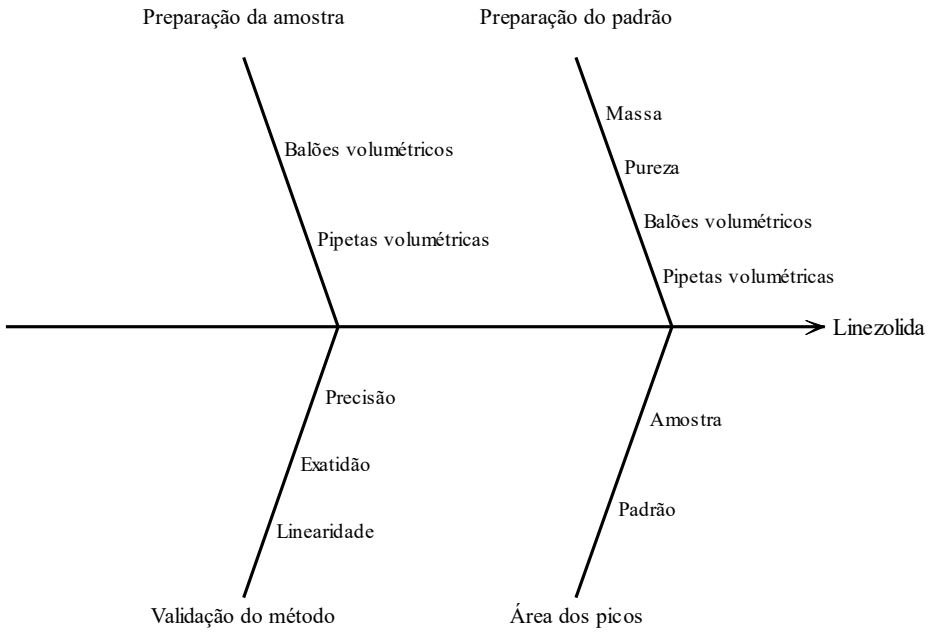


Figura 14. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC. Adaptado de [12].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 10** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 10. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por UPLC.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	10,1 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cs} conforme Eq. (20)	Pureza do padrão de referência	Pot	0,995	0,005*	0,0029
	Balão volumétrico de 100 mL	$100vf$	100,0 mL	0,2 mL	0,1 mL
	Pipeta volumétrica de 5 mL	$5vp$	5,00 mL	0,02 mL	0,01 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	$50vf$	50,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
Preparação da solução amostra	Pipeta volumétrica de 1 mL	$1vp$	1,000 mL	0,004 mL	0,002 mL
u_{Cu} conforme Eq. (21)	Balão volumétrico de 200 mL	$200vf$	200,0 mL	0,4 mL	0,2 mL
Área dos picos	Da solução padrão	As	1.826.426	-	9.055
u_A conforme Eq. (22)	Da solução amostra	Au	1.705.013	-	1.235
Validação do método	Linearidade	Lin	1,000	-	0,0069
u_V conforme Eq. (23)	Exatidão	Acc	0,9862	-	0,0036
	Precisão	Pr	1,0000	-	0,0066

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular. Adaptado de [12].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}), das áreas dos picos dos cromatogramas (u_A) e da validação do método (u_V) estão apresentas nas equações (20), (21), (22) e (23), respectivamente. As incertezas intermediárias foram combinadas na incerteza final conforme a equação (24).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{100vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{5vp}}{5v}\right)^2 + \left(\frac{u_{50vf}}{50vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (20)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{1vp}}{1vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{200vf}}{200vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (21)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (22)}$$

$$u_V = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{{u_{Lin}}^2 + {u_{Pr}}^2 + \left(\frac{u_{Acc}}{Acc}\right)^2} \qquad \text{Eq. (23)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + {u_V}^2} \qquad \text{Eq. (24)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 10** nas equações (20) a (24), podemos calcular que a quantidade de linezolida na forma farmacêutica foi de 95,1 ± 2,5% do valor rotulado, empregando-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 11**) e por simulações de Monte Carlo, empregando-se 100.000 simulações (**Figura 15**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha e de Monte Carlo foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

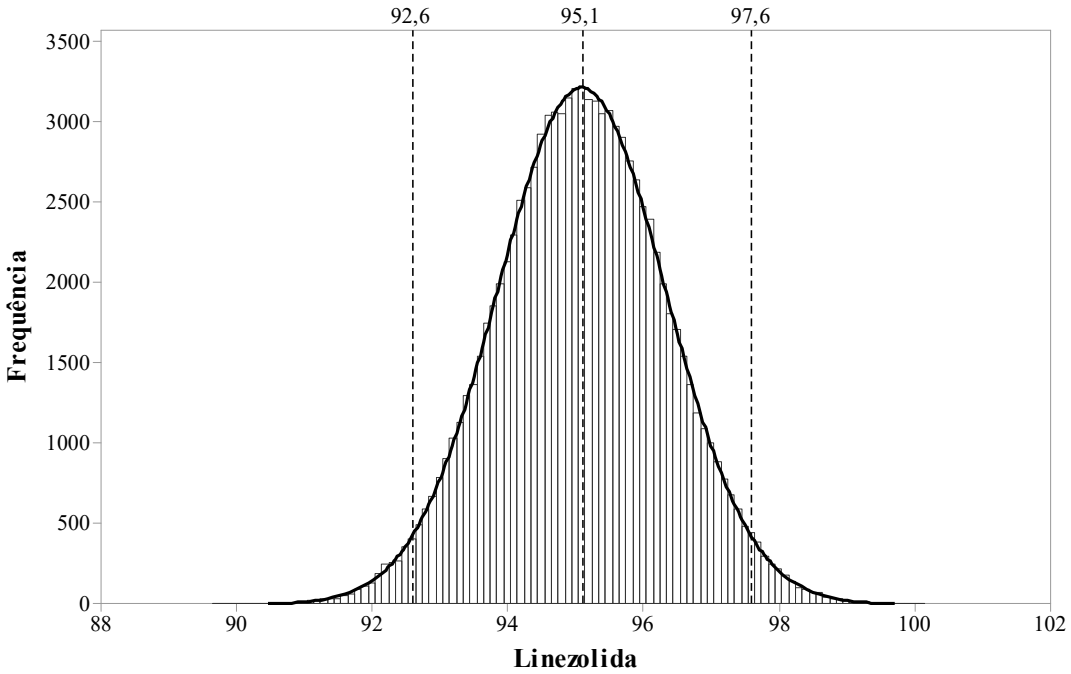


Figura 15. Histograma obtido para as 100.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC. Adaptado de [12].

Tabela 11. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de linezolida por UPLC.

Valores \ Incertezas		u_{ws}	u_{Pot}	u_{100vf}	u_{5vp}	u_{50vf}	u_{1vp}	u_{200vf}	u_{As}	u_{Au}	u_{Lin}	u_{Acc}	u_{Pr}
		0,05	0,0029	0,1	0,01	0,05	0,002	0,2	9.055	1.235	0,0069	0,0036	0,0066
ws	10,1	10,15	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1
Pot	0,995	0,995	0,9979	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995	0,995
$100vf$	100,0	100	100	100,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$5vp$	5,00	5	5	5	5,01	5	5	5	5	5	5	5	5
$50vf$	50,0	50	50	50	50	50,1	50	50	50	50	50	50	50
$1vp$	1,000	1	1	1	1	1	1,002	1	1	1	1	1	1
$200vf$	200,0	200	200	200	200	200	200	200,2	200	200	200	200	200
As	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.835.481	1.826.426	1.826.426	1.826.426	1.826.426
Au	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.705.013	1.706.248	1.705.013	1.705.013	1.705.013
Lin	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0069	1,0000	1,0000
Acc	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9862	0,9898	0,9862
Pr	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0066
	95,13	95,60	95,40	95,03	95,32	95,03	94,94	95,22	94,66	95,20	95,78	94,78	95,76
		0,47	0,28	-0,10	0,19	-0,10	-0,19	0,10	-0,47	0,07	0,66	-0,35	0,63
	1,57	0,22	0,08	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,22	0,00	0,43	0,12	0,39
$u =$	1,25		$k =$	2,00		$U =$	2,5						

Adaptado de [12].

A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 16**. As incertezas associadas a linearidade, precisão, exatidão e massa do padrão de referência constituíram-se nas principais fontes de incerteza, contribuindo com cerca de 72% da incerteza total. A contribuição da incerteza associada a massa do padrão de referência de linezolida pode ser reduzida através do aumento da massa do mesmo (por exemplo, para 25,0 mg). As demais fontes de incerteza tiveram pequena contribuição para a incerteza final.

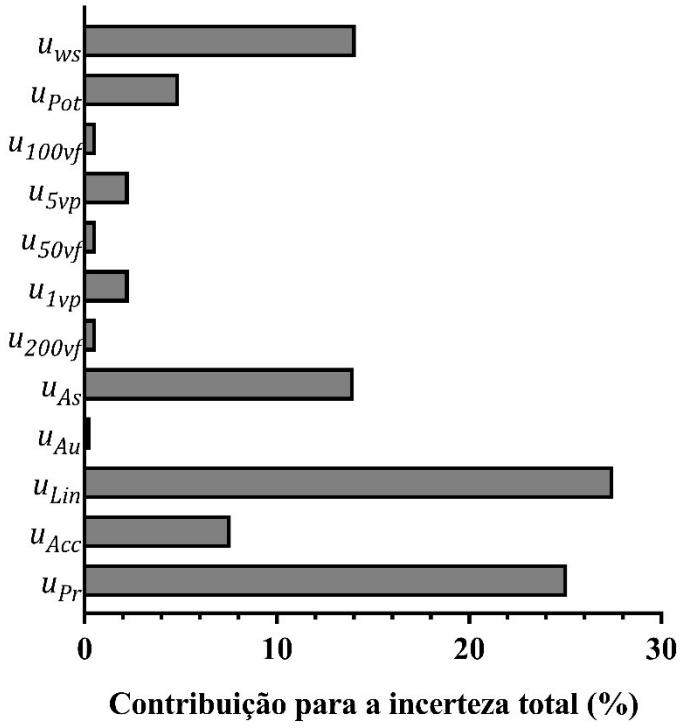


Figura 16. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de linezolida por UPLC. Adaptado de [12].

4.2.2. Quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas por HPLC

Okamoto e colaboradores [13] identificaram as principais fontes de incerteza e propuseram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada a quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas por HPLC.

A quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas foi realizada em cromatógrafo equipado com bomba quaternária, injetor automático, coluna cromatográfica Zorbax C18 de 25,0 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro

empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano (5 µm de tamanho de partícula) e detector de foto-diodo (*Photo-Diodo Array Detector* - PDA) ajustado à 320 nm. A fase móvel foi constituída de mistura de fosfato de potássio monobásico a 0,073% e metanol (93:7) com pH ajustado para 4,0 ± 0,5. Foi empregado fluxo de 2 mL/min. As soluções padrão e amostra foram diluídas até concentração de 200 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 17** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

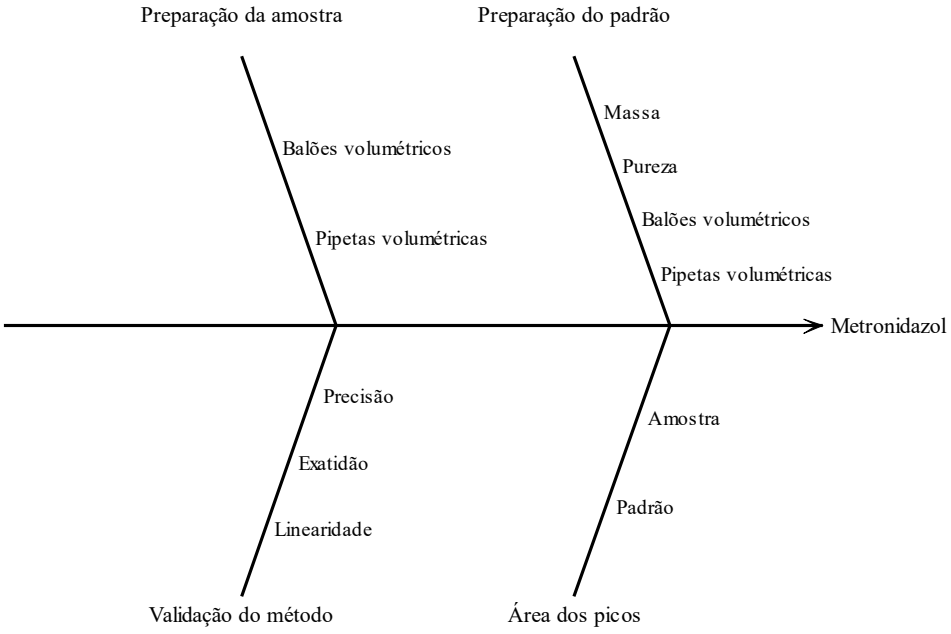


Figura 17. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de metronidazol por HPLC. Adaptado de [13].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 12** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 12. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas por HPLC.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	20,9 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cs} conforme Eq. (25)	Pureza do padrão de referência	Pot	0,999	0,001*	0,0004
	Balão volumétrico de 20 mL	$20vf$	20,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
	Pipeta volumétrica de 2 mL	$2vp1$	2,00 mL	0,01 mL	0,005 mL
	Balão volumétrico de 10 mL	$10vf1$	10,0 mL	0,04 mL	0,01 mL
Preparação da solução amostra	Pipeta volumétrica de 5 mL	$5vp$	5,00 mL	0,015 mL	0,0075 mL
u_{Cu} conforme Eq. (26)	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf$	25,0 mL	0,1 mL	0,05 mL
	Pipeta volumétrica de 2 mL	$2vp2$	2,00 mL	0,01 mL	0,005 mL
	Balão volumétrico de 10 mL	$10vf2$	10,0 mL	0,04 mL	0,02 mL
Área dos picos	Da solução padrão	As	64.82.229	-	30.935
u_A conforme Eq. (27)	Da solução amostra	Au	63.75.664	-	25.423
Validação do método	Linearidade	Lin	1,000	-	0,0022
u_V conforme Eq. (28)	Precisão	Pr	1,0000	-	0,0080
	Exatidão	Acc	0,9563	-	0,0106

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular. Adaptado de [13].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}), das áreas dos picos dos cromatogramas (u_A) e da validação do método (u_V) estão apresentas nas equações (25), (26), (27) e (28), respectivamente. As incertezas intermediárias foram combinadas na incerteza final conforme a equação (29).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{20vf}}{20vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2vp1}}{2vp1}\right)^2 + \left(\frac{u_{10vf}}{10vf1}\right)^2} \qquad \text{Eq. (25)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{5vp}}{5vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf}}{25vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2vp2}}{2vp2}\right)^2 + \left(\frac{u_{10vf2}}{10vf2}\right)^2} \qquad \text{Eq. (26)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (27)}$$

$$u_V = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{{u_{Lin}}^2 + {u_{Pr}}^2 + \left(\frac{u_{Acc}}{Acc}\right)^2} \qquad \text{Eq. (28)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + {u_V}^2} \qquad \text{Eq. (29)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 12** nas equações (25) a (29), podemos calcular que a quantidade de metronidazol na forma farmacêutica foi de 107,4 ± 3,5% do valor rotulado, empregando-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 13**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha de Kragten foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 18**. As incertezas associadas a precisão, exatidão e as áreas dos picos (padrão e amostra) constituíram-se as principais fontes de incerteza, contribuindo com cerca de 84% da incerteza total. As demais fontes de incerteza tiveram pequena contribuição para a incerteza final.

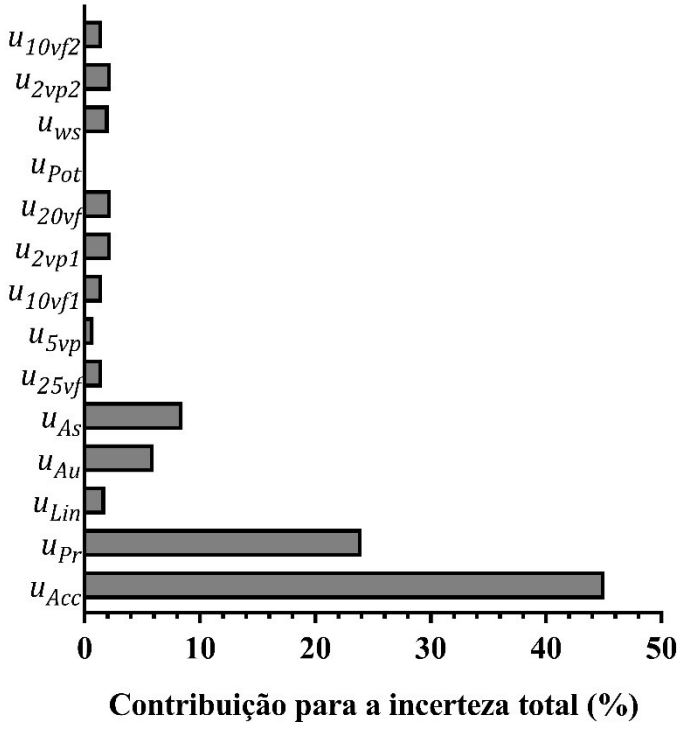


Figura 18. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de metronidazol por HPLC. Adaptado de [13].

Tabela 13. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de metronidazol por HPLC.

Valores \ Incertezas		u_{ws}	u_{Pot}	u_{20vf}	u_{2vp1}	u_{10vf1}	u_{5vp}	u_{25vf}	u_{2vp2}	u_{10vf2}	u_{As}	u_{Au}	u_{Lin}	u_{Pr}	u_{Acc}
		0,05	0,0004	0,05	0,005	0,02	0,0075	0,05	0,005	0,02	30.935	25.423	0,0022	0,0080	0,0106
ws	20,90	20,95	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90	20,90
Pot	0,9990	0,9990	0,9994	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990	0,9990
$20vf$	20,00	20,00	20,00	20,05	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
$2vp1$	2,000	2,000	2,000	2,000	2,005	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
$10vf1$	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,02	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
$5vp$	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0075	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000
$25vf$	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,05	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
$2vp2$	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,005	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
$10vf2$	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,02	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
As	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.513.164	6.482.229	6.482.229	6.482.229	6.482.229
Au	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.375.664	6.401.087	6.375.664	6.375.664	6.375.664
Lin	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0022	1,0000	1,0000
Pr	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0080	1,0000
Acc	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9563	0,9669
	107,37	107,63	107,41	107,10	107,64	107,16	107,21	107,59	107,10	107,59	106,86	107,80	107,61	108,23	106,19
		0,26	0,04	-0,27	0,27	-0,21	-0,16	0,21	-0,27	0,21	-0,51	0,43	0,24	0,86	-1,18
	3,07	0,07	0,00	0,07	0,07	0,05	0,03	0,05	0,07	0,05	0,26	0,18	0,06	0,74	1,39
$u =$	1,75		$k =$	2,00		$U =$	3,5								

Adaptado de [13].

4.2.3. Quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por UPLC

Ghisleni e colaboratores [11] realizaram estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas à quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por UPLC-PDA.

A quantificação de metronidazol em formas farmacêuticas foi realizada em cromatógrafo equipado com bomba binária, injetor automático, coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT de 10,0 cm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano (1,8 µm de tamanho de partícula) e detector de foto-diodo (*Photo-Diodo Array Detector* - PDA) ajustado à 220 nm. A fase móvel empregada foi em gradiente de eluição envolvendo trietilamina 0,1% com pH ajustado para 2,5 e mistura de ácido fosfórico e acetonitrila. Foi empregado fluxo de 0,6 mL/min. As soluções padrão e amostra foram diluídas até concentração de 50 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 19** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

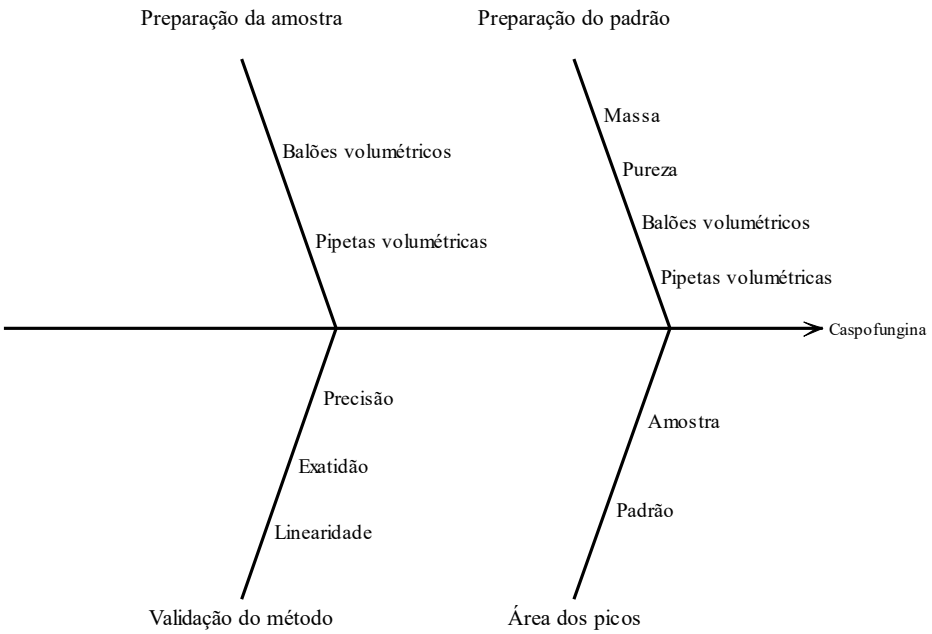


Figura 19. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de caspofungina por UPLC-PDA. Adaptado de [11].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 14** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 14. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por UPLC-PDA.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	31,6 mg*	0,2 mg	0,1 mg
u_{Cs} conforme Eq. (30)	Balão volumétrico de 50 mL	$50vf1$	50,0 mL	0,3 mL	0,15 mL
	Pipeta volumétrica de 5 mL	$5vp$	5,00 mL	0,03 mL	0,015 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	$50vf2$	50,0 mL	0,3 mL	0,15 mL
Preparação da solução amostra	Balão volumétrico de 100 mL	$100vf$	100,0 mL	0,6 mL	0,3 mL
u_{Cu} conforme Eq. (31)	Pipeta volumétrica de 2,5 mL	$2{,}5vp$	2,50 mL	0,015 mL	0,0075 mL
	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf$	25,0 mL	0,15 mL	0,075 mL
Área dos picos	Da solução padrão	As	1.491.595	-	746
u_A conforme Eq. (32)	Da solução amostra	Au	1.574.029	-	4.158
Validação do método	Linearidade	Lin	1,0000	-	0,0037
u_V conforme Eq. (33)	Exatidão	Acc	0,9862	-	0,0069
	Precisão	Pr	1,0000	-	0,0080

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *correspondente a aproximadamente 25,0 mg (fator de conversão da forma acetato para forma base anidra = 0,762). Adaptado de [11].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}), das áreas dos picos dos cromatogramas (u_A) e da validação do método (u_V) estão apresentas nas equações (30), (31), (32) e (33), respectivamente. As incertezas intermediárias foram combinadas na incerteza final conforme a equação (34).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{50v}}{50vf1}\right)^2 + \left(\frac{u_{5vp}}{5vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{50vf2}}{50vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (30)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{100vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2,5vp}}{2,5vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{25vf}}{25vf}\right)^2} \qquad \text{Eq. (31)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (32)}$$

$$u_V = \left(\frac{1}{Acc}\right) \times \sqrt{{u_{Lin}}^2 + {u_{Pr}}^2 + \left(\frac{u_{Acc}}{Acc}\right)^2} \qquad \text{Eq. (33)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + {u_V}^2} \qquad \text{Eq. (34)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 14** nas equações (30) a (34), podemos calcular que a quantidade de caspofungina na forma farmacêutica foi de 102,9 ± 2,9% do valor rotulado, empregando-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas por simulações de Monte Carlo, empregando-se 50.000 simulações (**Figura 20**). Os valores obtidos pelo método de Monte Carlo foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

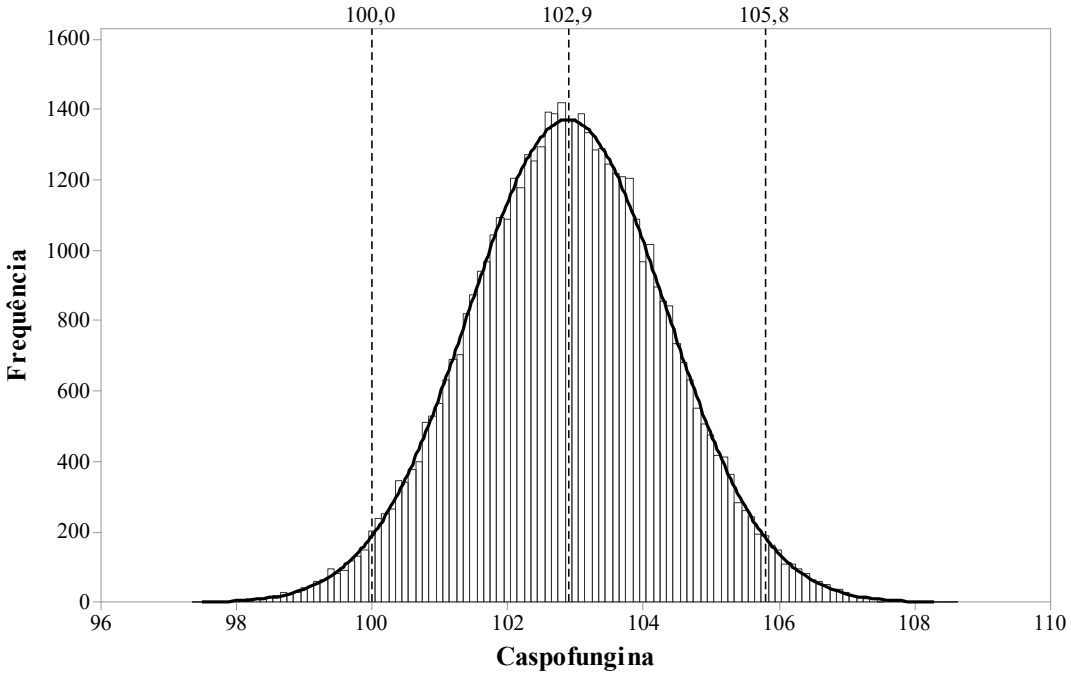


Figura 20. Histograma obtido para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de caspufungina por UPLC-PDA. Adaptado de [11].

A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 21**. As incertezas associadas a precisão e exatidão constituíram-se as principais fontes de incerteza, contribuindo com cerca de 57% da incerteza total. Por outro lado, as incertezas associadas às áreas dos picos (padrão e amostra) foram insignificantes.

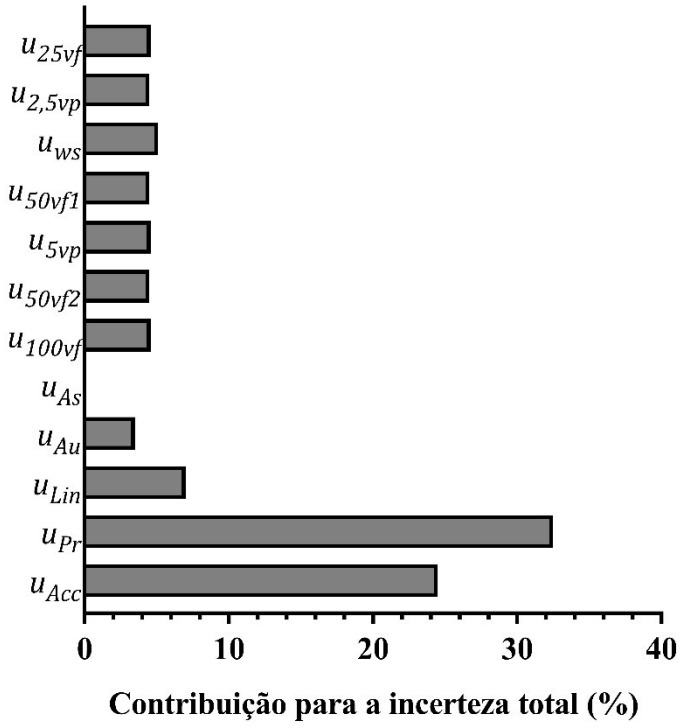


Figura 21. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de caspofungina por UPLC-PDA. Adaptado de [11].

4.2.4. Quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas por HPLC

Separovic e colaboratores [41] realizaram estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas à quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas por HPLC.

A quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas foi realizada em cromatógrafo equipado com bomba quaternária, injetor automático, coluna cromatográfica de 25,0 cm de comprimento e 5,0 mm de diâmetro empacotada com sílica quimicamente ligada à grupo octadecilsilano (C18) e detector de UV-Visível ajustado à

230 nm. A fase móvel empregada foi composta por mistura de tampão fosfato pH 5,0 e acetonitrila (96:4). Foi empregado fluxo de 1,0 mL/min. As soluções padrão e amostra foram diluídas até concentração de 1,2 µg/mL.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 22** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

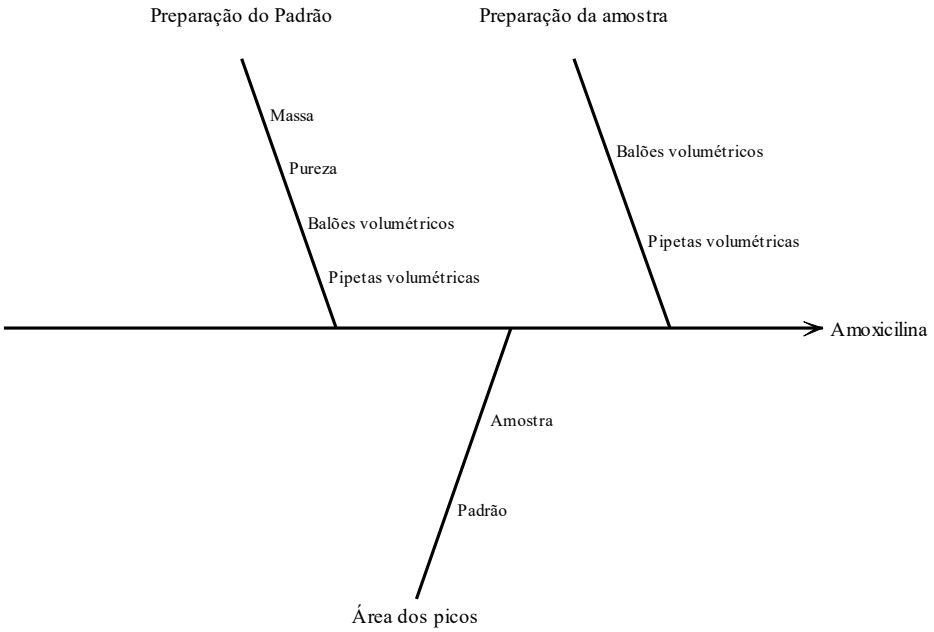


Figura 22. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de amoxicilina por HPLC. Adaptado de [41].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 15** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 15. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a quantificação de amoxicilina em formas farmacêuticas por HPLC.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação da solução padrão	Massa do padrão de referência	ws	12,0 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cs} conforme Eq. (35)	Pureza do padrão de referência	Pot	0,995	0,005*	0,002
	Balão volumétrico de 100 mL	$100vf$	100,0 mL	0,08 mL**	0,05 mL
	Pipeta volumétrica de 2 mL	$2vp1$	5,00 mL	0,006 mL**	0,006 mL
	Balão volumétrico de 200 mL	$200vf1$	200,0 mL	0,10 mL**	0,06 mL
Preparação da solução amostra	Massa da amostra	wu	72,0 mg	0,1 mg	0,05 mg
u_{Cu} conforme Eq. (36)	Peso médio do comprimido	PM	600,5 mg	-	2,9 mg
	Balão volumétrico de 500 mL	$500vf$	500,0 mL	0,15 mL	0,09 mL
	Pipeta volumétrica de 2 mL	$2vp2$	5,00 mL	0,006 mL**	0,006 mL
	Balão volumétrico de 200 mL	$200vf2$	200,0 mL	0,10 mL**	0,06 mL
Área dos picos	Da solução padrão	As	185.971	-	1.020
u_A conforme Eq. (37)	Da solução amostra	Au	185.624	-	1.018

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular, **distribuição triangular. Adaptado de [41].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação da solução padrão (u_{Cs}), preparação da solução amostra (u_{Cu}) e das áreas dos picos dos cromatogramas (u_A) estão apresentas nas equações (35), (36) e (37), respectivamente. As incertezas intermediárias são combinadas na incerteza final conforme a equação (38).

$$u_{Cs} = Cs \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{10vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2vp}}{2vp1}\right)^2 + \left(\frac{u_{200vf1}}{200vf1}\right)^2} \qquad \text{Eq. (35)}$$

$$u_{Cu} = Cu \times \sqrt{\left(\frac{u_{wu}}{wu}\right)^2 + \left(\frac{u_{PM}}{PM}\right)^2 + \left(\frac{u_{10vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2vp2}}{2vp2}\right)^2 + \left(\frac{u_{200vf2}}{200vf2}\right)^2} \qquad \text{Eq. (36)}$$

$$u_A = \left(\frac{Au}{As}\right) \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2} \qquad \text{Eq. (37)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2} \qquad \text{Eq. (38)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 15** nas equações (35) a (38), podemos calcular que as incertezas combinada e expandida da quantidade de amoxicilina na forma farmacêutica foram de 1,0% e 2,1% do valor rotulado, respectivamente. Empregou-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança. Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas pelo método da planilha de Kragten (**Tabela 16**). Os valores obtidos pelos métodos da planilha de Kragten foram de semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.

A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 23**. As incertezas associadas repetibilidade do sistema cromatográfico (27,2% 2 27,0% para amostra e padrão, respectivamente), peso médio dos comprimidos (20,4%) e a massa do padrão de amoxicilina (15,6%) foram as mais significativas, contribuindo com 90,1% da incerteza total. Por outro lado, as incertezas associadas as vidrarias volumétricas contribuíram com apenas 5,8% da incerteza total.

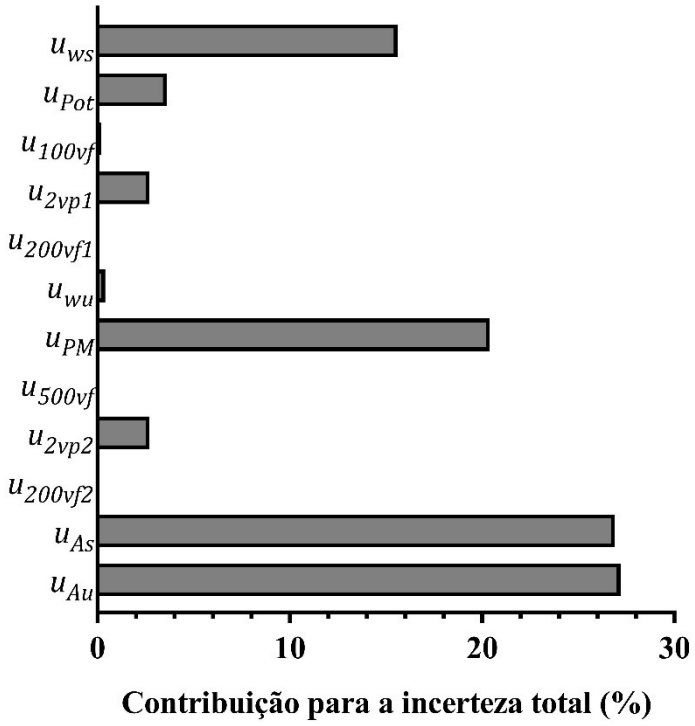


Figura 23. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de amoxicilina por HPLC. Adaptado de [41].

Tabela 16. Método da planilha de Kragten para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de amoxicilina por HPLC.

Valores \ Incertezas		u_{ws}	u_{Pot}	u_{100vf}	u_{2vp1}	u_{200vf1}	u_{wu}	u_{PM}	u_{500vf}	u_{2vp2}	u_{200vf2}	u_{As}	u_{Au}
		0,01	0,2	0,06	0,003	0,06	0,05	2,9	0,09	0,003	0,06	1.020	1.018
ws	12,00	12,05	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Pot	99,5	99,5	99,7	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5
$100vf$	100,00	100,00	100,00	100,05	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
$2vp1$	2,000	2,000	2,000	2,000	2,003	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
$200vf1$	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,06	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
wu	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,05	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00	72,00
PM	600,5	600,5	600,5	600,5	600,5	600,5	600,5	603,4	600,5	600,5	600,5	600,5	600,5
$500vf$	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00	500,09	500,00	500,00	500,00	500,00
$2vp2$	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,003	2,000	2,000	2,000
$200vf2$	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00	200,06	200,00	200,00
As	185.971	185971	185971	185971	185971	185971	185971	185971	185971	185971	185971	186991	185971
Au	185.624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	185624	186642
%	100,2	99,8	100,0	100,3	100,1	100,3	100,3	99,8	100,2	100,4	100,2	99,7	100,8
		-0,4	-0,2	0,0	-0,2	0,0	0,1	-0,5	0,0	0,2	0,0	-0,5	0,5
	1,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
$u =$	1,0		$k =$	2,00		$U =$	2,1						

Adaptado de [41].

4.3.Métodos eletroforéticos

A eletroforese capilar tem sido empregada para a análise de fármacos e medicamentos devido suas características. As vantagens da eletroforese capilar em comparação a outras técnicas analíticas abrangem sua rapidez, facilidade na implementação, baixo consumo de solventes e reagentes e emprego de pequenas quantidades de amostra.

Adicionalmente, a eletroforese capilar pode empregar diferentes modos de separação, tais como a eletroforese capilar em solução livre, eletrocromatografia capilar micelar, eletroforese capilar com focalização isoelétrica e isotacoforese capilar. A versatilidade de eletroforese capilar permite a separação de uma ampla variedade de substâncias, desde pequenos íons até macromoléculas.

4.3.1. Quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por CE

Ghisleni e colaboratores [34] identificaram as principais fontes de incerteza e propuseram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada a quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas por eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis* - CE).

A quantificação de caspofungina em formas farmacêuticas foi realizada em equipamento de eletroforese capilar equipado com capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies) com comprimento total de 50 cm, comprimento efetivo de 40 cm e diâmetro interno de 75 µm e detector tipo PDA. A solução de eletrólito empregada foi constituída de trietilamina 0,2% com pH ajustado a 2,50 ± 0,05. Foi empregada tensão de 25 kV. As soluções padrão e amostra foram diluídas até concentração de 50 µg/mL, contendo padrão interno (loratadina).

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 24** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

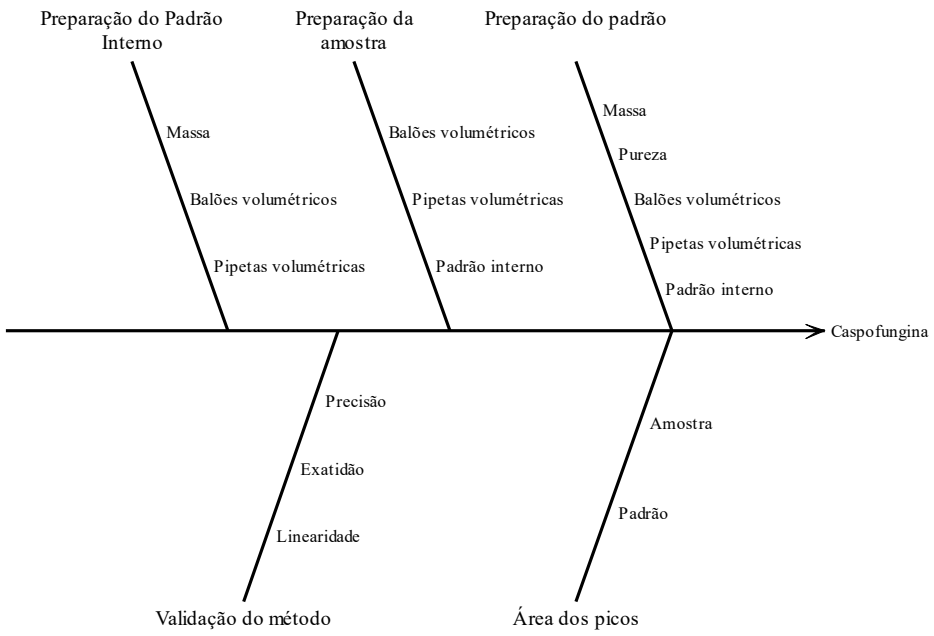


Figura 24. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação de caspofungina por CE-PDA. Adaptado de [34].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. Apesar das incertezas associadas à preparação do padrão interno estarem listadas no diagrama de causa-efeito (**Figura 24**), é importante destacar que estas incertezas serão anuladas, uma vez que o padrão interno estará presente na solução padrão e na solução amostra.

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas individuais possibilitou a descrição das equações (39) e (40), com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente.

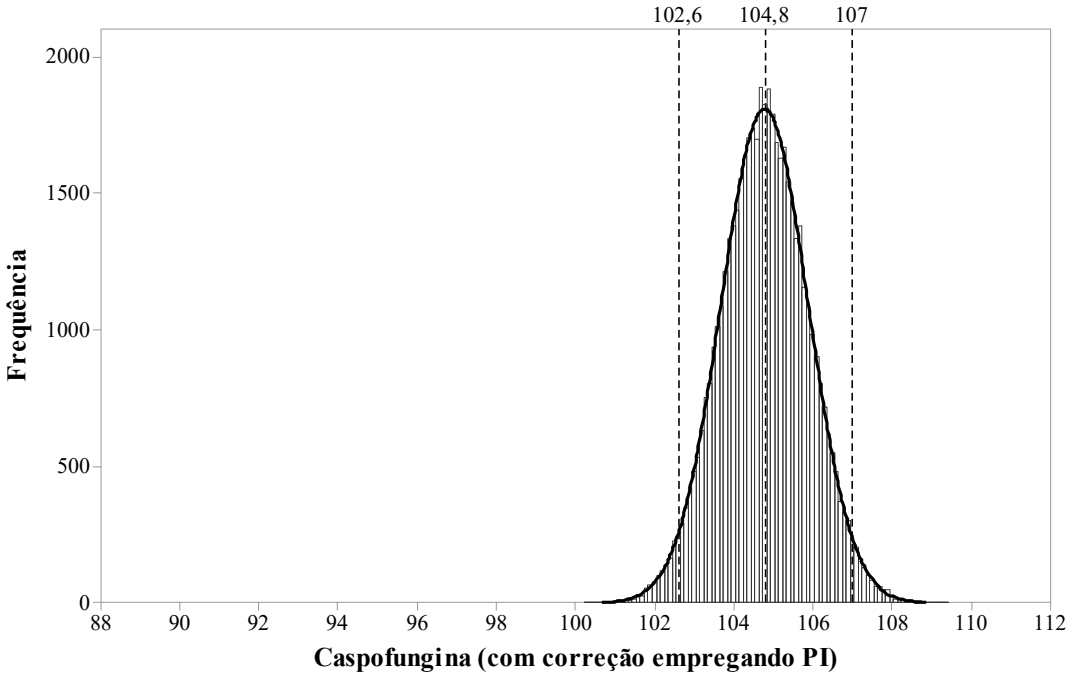
$$u_{\%} = \frac{Au^*}{As^*} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au^*}}{Au^*}\right)^2 + \left(\frac{u_{As^*}}{As^*}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + u_V{}^2} \qquad \text{Eq. (39)}$$

$$u_{\%} = \frac{Au}{As} \times \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cs}}{Cs}\right)^2 + \left(\frac{u_{Cu}}{Cu}\right)^2 + u_V{}^2} \qquad \text{Eq. (40)}$$

Onde: Cs e Cu são as concentrações de caspofungina na solução padrão e amostra, respectivamente; u_{Cs} e u_{Cu} são as incertezas combinadas intermediárias associadas as concentrações de caspofungina na solução padrão e amostra, respectivamente; As^* e Au^* são as razões das áreas de caspofungina e padrão interno nas soluções padrão e amostra, respectivamente; u_{As^*} e u_{Au^*} são as incertezas (desvios-padrão) das razões das áreas de caspofungina e padrão interno nas soluções padrão e amostra, respectivamente; As e Au são as áreas de caspofungina nas soluções padrão e amostra, respectivamente; u_{As} e u_{Au} são as incertezas (desvios-padrão) das áreas de caspofungina nas soluções padrão e amostra, respectivamente; e u_V é incerteza combinada intermediária associada as etapas de validação do método (linearidade, precisão e exatidão).

Aplicando-se as equações (39) a (40), podemos calcular que a quantidade de caspofungina na forma farmacêutica foi de 104,8 ± 2,5% e 101,6 ± 4,8% do valor rotulado, considerando-se as equações com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente. Empregou-se fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança.

Alternativamente, as incertezas combinadas e expandidas foram estimadas por simulações de Monte Carlo, empregando-se 50.000 simulações (**Figura 25**). Os valores obtidos pelo método de Monte Carlo foram semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.



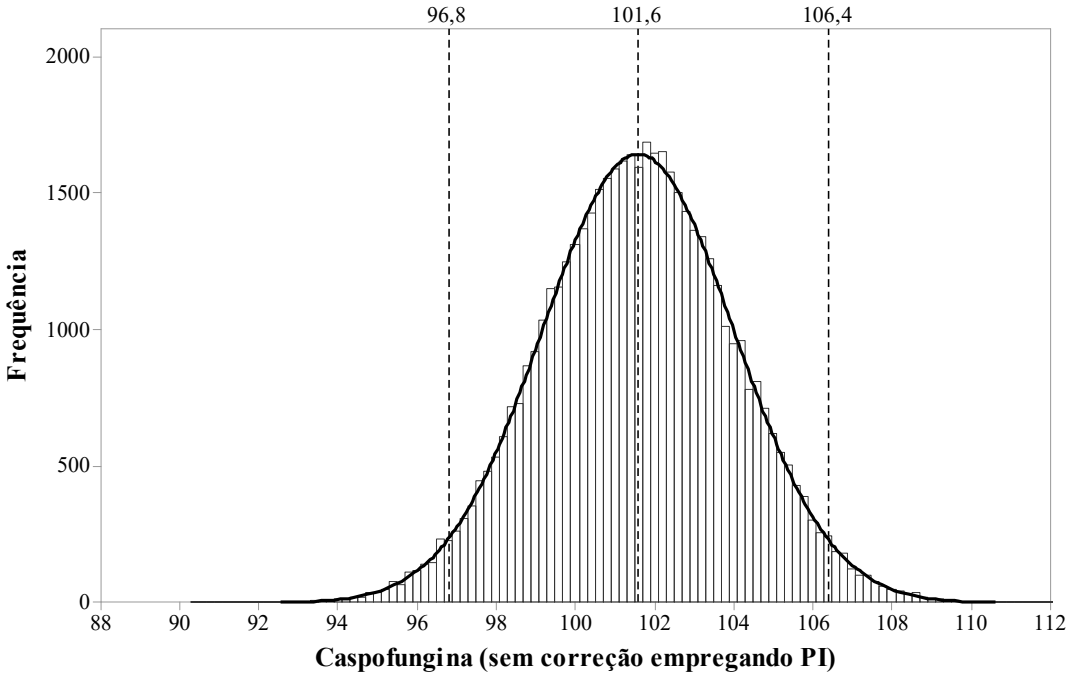


Figura 25. Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a determinação de caspufungina por CE-PDA, com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente. Adaptado de [34].

Empregando a correção com o padrão interno, a incerteza associada a exatidão foi a mais relevante, contribuindo com 46% da incerteza total. A contribuição das incertezas associadas as razões das áreas dos picos de caspofungina e padrão interno para as soluções padrão e amostras foi de 39% da incerteza total. Por outro lado, sem a correção com o padrão interno, quase toda a incerteza total está associada as incertezas das áreas dos picos de caspofungina para as soluções padrão e amostras (quase 90% da incerteza total). As contribuições individuais de cada fonte de incerteza estão apresentadas na **Figura 26**.

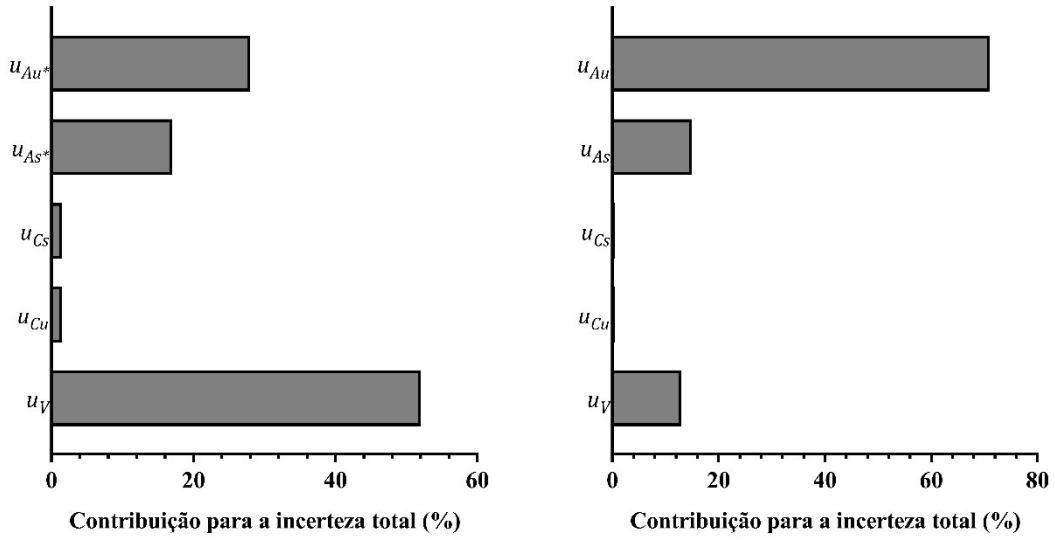


Figura 26. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação de caspufungina por CE-PDA, com e sem correção das áreas dos eletroferogramas com o padrão interno, respectivamente. Adaptado de [34].

De acordo com os resultados, empregando-se a correção com padrão interno, a incerteza total é significativamente reduzida (cerca de metade da incerteza de medição obtida sem correção com padrão interno). Estes resultados podem ser explicados devido a alta variabilidade do volume de injeção no sistema eletroforético. Utilizando padrão interno, a variabilidade das respostas é reduzida, uma vez que se utiliza a razão das áreas de caspofungina e padrão interno obtidos no mesmo eletroferograma.

4.4. Ensaio de dissolução de formas farmacêuticas sólidas

O teste de dissolução é um procedimento oficialmente estabelecido nas farmacopeias de vários países, que expressa a quantidade de substância dissolvida em função do tempo, utilizando um meio de dissolução com pH, temperatura e volume especificados. As monografias farmacopeicas indicam o dispositivo (cesto, pás ou outros) e as condições apropriadas de ensaio de dissolução de cada composto.

Os interesses da comunidade farmacêutica pelo teste da dissolução começaram após a percepção que o perfil da desintegração da forma farmacêutica não explica os perfis da biodisponibilidade. Quando a absorção gastrointestinal é rápida, então a dissolução da forma farmacêutica é etapa limitante a biodisponibilidade do fármaco [42]. Os efeitos da dissolução sobre a biodisponibilidade de fármacos e o impacto das formulações sobre a biodisponibilidade foram amplamente estudados [42], sendo estabelecida a correlação entre mudanças nos perfis de dissolução e falta de segurança e eficácia de medicamentos.

Há diversos trabalhos que descrevem o impacto das formulações e do processo produtivo no resultado do teste de dissolução, porém existem poucos trabalhos que estudaram o impacto das condições analíticas no resultado do teste de dissolução e sua incerteza de medição.

4.4.1. Dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas sólidas

Romero e Lourenço [43] descreveram um procedimento simples que pode ser usado para a estimativa da incerteza de medição associada com o teste de dissolução de comprimidos contendo paracetamol baseado em simulações de Monte Carlo.

O teste de dissolução foi realizado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (REF). Um planejamento fatorial fracionato 2_{IV}^{4-1} foi empregado para avaliar como o tempo de dissolução (A, de 20 a 40 minutos), volume de meio de dissolução (B, de 800 a 1000 mL), pH do meio de dissolução (C, de 2 a 6,8) e a velocidade de rotação (D, de 40 a 60 rpm) afetam a quantidade de paracetamol dissolvido (Y). Todos os testes foram realizados empregando aparato 2 (pás) e foram realizados em triplicata. A quantidade de paracetamol dissolvida foi determinada por espectrofotometria de absorção no UV a 243 nm.

Um modelo de regressão foi ajustado para explicar a quantidade de paracetamol dissolvido em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D). Uma combinação de termos lineares, quadráticos e de interação foi escolhida para permitir uma alta capacidade de predição do modelo. Foi empregada transformação Box-Cox ($ln(Y)$) para garantir a homocedasticidade e distribuição normal dos resíduos.

Os resultados de análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizado para explicar a quantidade de paracetamol dissolvido em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D) estão apresentados na **Tabela 17**. Os gráficos 3D que explica a quantidade de paracetamol dissolvido em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D) estão apresentados na **Figura 27**. A equação de regressão, assim como os coeficientes de determinação estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental utilizado para explicar a quantidade de paracetamol dissolvido em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D).

Fontes	g.l.	SQ	QM	F	p-valor
Regressão	5	0,026204	0,026204	26,55	0,000**
Termos lineares	4	0,024847	0,024847	31,47	0,000**
A	1	0,002836	0,002836	14,37	0,001**
B	1	0,000311	0,000311	1,58	0,219
C	1	0,000432	0,000432	2,19	0,150
D	1	0,021268	0,021268	107,75	0,000**
Interações	1	0,001180	0,001180	5,98	0,021*
CD	1	0,001180	0,001180	5,98	0,021*
Erro	30	0,005921	0,000197		
Total	35	0,032125			

Legenda: g.l.: graus de Liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: quadrado médio, F: teste F calculado e p-valor: significância para o teste F. *significante (p-valor < 0,05) e **muito significante (p-valor < 0,01). Adaptado de [43].

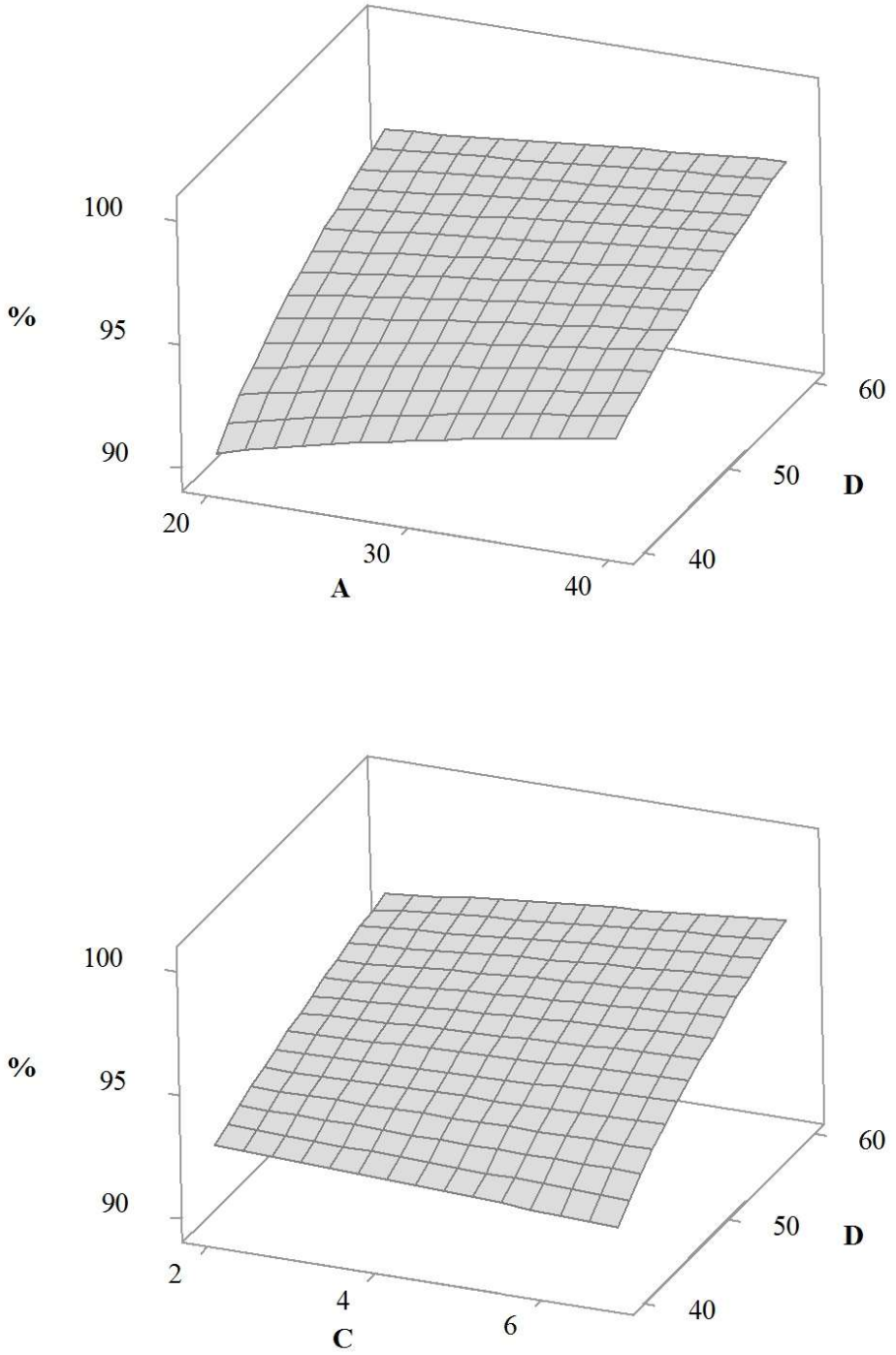


Figura 27. Gráficos 3D da quantidade de paracetamol dissolvido (%) em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D). Adaptado de [43].

Tabela18. Equação de regressão e coeficientes de determinação para a quantidade de paracetamol dissolvido (Y) em função do tempo de dissolução (A), do volume de meio de dissolução (B), do pH do meio de dissolução (C) e da velocidade de rotação (D).

Equação de regressão	R^2	R^2adj	R^2pred
$ln(Y) = -0{,}2132 + 0{,}001087A + 0{,}000029B - 0{,}01284C + 0{,}001146D + 0{,}000292CD$	81,57%	78,50%	73,22%

Adaptado de [43].

Simulações de Monte Carlo foram realizadas a partir de 20.000 valores gerados aleatoriamente para o tempo de dissolução (5.000 valores com distribuição $N(30, 1^2)$), volume de meio de dissolução (5.000 valores com distribuição $N(900, 5^2)$), pH do meio de dissolução (5.000 valores com distribuição $N(5{,}80, 0{,}05^2)$) e da velocidade de rotação (5.000 valores com distribuição $N(50, 2^2)$).

A partir dos resultados simulados da quantidade de paracetamol dissolvida (Y), obtivemos o histograma apresentado na **Figura 28**, com distribuição normal caracterizada por sua média (95,2%) e desvio padrão (0,5%). A incerteza de medição pode ser obtida multiplicando-se o desvio padrão ($u = 0{,}5\%$) pelo fator de abrangência ($k = 2$), o que corresponde a intervalo com 95% de confiança (94,2 a 96,2%).

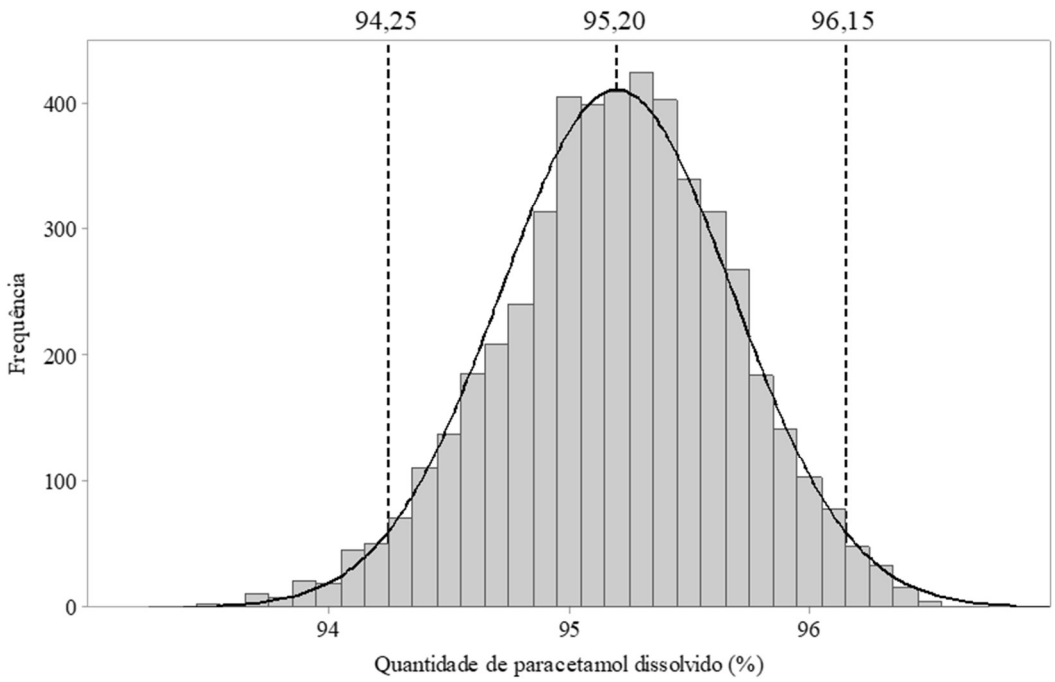


Figura 28. Histograma obtido para as simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada ao teste de dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas de liberação imediata. Adaptado de [43].

Os resultados da ANOVA (**Tabela 17**) indicam que o tempo de dissolução (A), a velocidade de rotação (D) e a interação entre o pH do meio de dissolução e a velocidade de rotação (CD) são os termos mais significativos da equação de regressão. Entretanto, considerando-se a contribuição individual de cara fonte de incerteza, a velocidade de rotação foi a fonte de incerteza mais relevante, contribuindo com cerca de 96,2% da incerteza total (**Figura 29**). As demais fontes de incerteza apresentam pequena contribuição para a incerteza total. É importante destacar que a incerteza de medição calculada reflete apenas as variações ocorridas deliberadamente durante a execução do teste de dissolução, e não consideram as variações decorrentes da formulação e do conteúdo de paracetamol na forma farmacêutica [44].

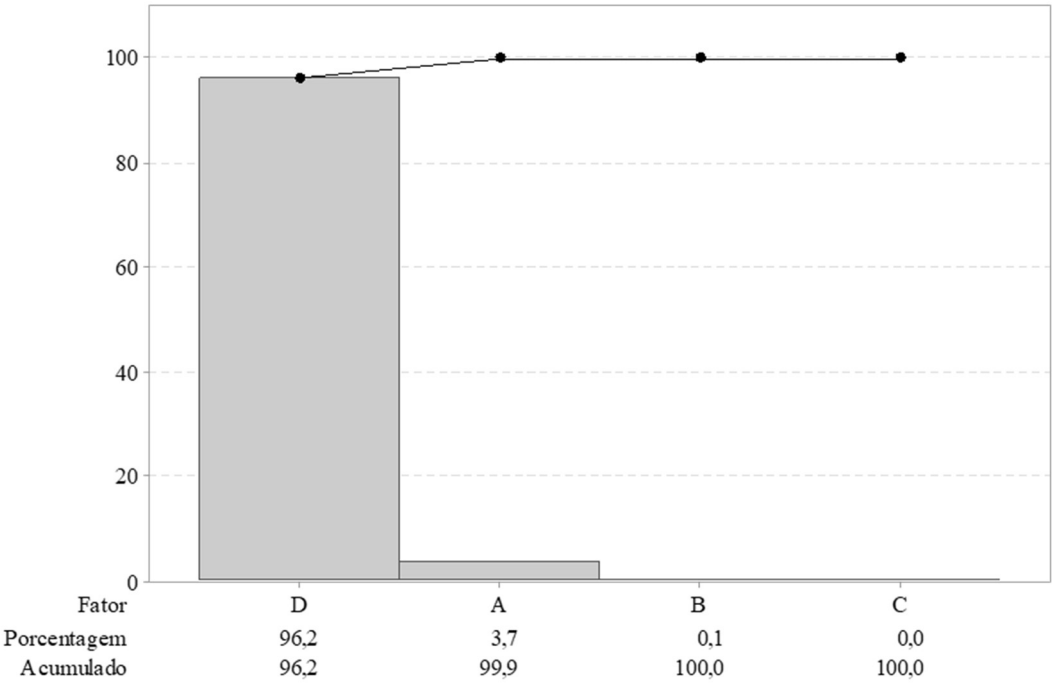


Figura 29. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada ao teste de dissolução de paracetamol em formas farmacêuticas de liberação imediata. Adaptado de [43].

4.5.Teste de gotejamento

A eficácia terapêutica de preparações farmacêuticas oftálmicas depende do tempo de contato do fármaco com a superfície ocular, da dose de fármaco efetivamente administrada e das propriedades farmacológicas do fármaco. O tempo de contato da solução oftálmica é curto, devido a dinâmica do sistema lacrimal, e a quantidade de fármaco absorvida usualmente é uma pequena fração da quantidade administrada. Usualmente, excipientes são empregados para aumentar a viscosidade das preparações farmacêuticas oftálmicas, aumentando o tempo de contato do fármaco com a superfície ocular e, consequentemente, aumentando a eficácia terapêutica.

Devido a capacidade limitada do olho reter preparações líquidas e semi-sólidas, as aplicações oculares são administradas em pequenas quantidades na forma de gotas ou em finas camadas de pomadas na margem das pálpebras. Uma gota de solução oftálmica usualmente contem cerca de 50 μL, entretanto este volume pode variar dependendo da densidade e da viscosidade da preparação farmacêutica.

A dose de fármaco efetivamente administrada está diretamente relacionada à concentração (dose) do fármaco na preparação farmacêutica e com o volume administrado por gota. Fatores como a densidade, viscosidade e características do frasco e do dispositivo de dosagem podem impactar na dose de fármaco efetivamente administrada.

A Farmacopéia Brasileira descreve um procedimento, denominado teste de gotejamento, para determinar a relação entre o número de gotas por mililitros (gotas/mL) e a concentração do fármaco por gota (mg de fármaco/gota) para preparações farmacêuticas oftálmicas.

4.5.1. Dose efetiva de ciprofloxacino em formas farmacêuticas oftálmicas

Francisco e colaboradores [33] descreveram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição para o teste de gotejamento realizado em preparações farmacêuticas oftálmicas contendo ciprofloxacino.

A quantificação de ciprofloxacino na preparação farmacêutica oftálmica foi realizar em cromatógrafo equipado com bomba binária, injetor automático, coluna cromatográfica Gemini C18 110A de 25,0 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro empacotada com sílica quicamente ligada à grupo octadecilsilano (5 µm de tamanho de partícula) e detector tipo PDA ajustado para 280 nm. A fase móvel empregada foi composta por mistura de fosfato de tetrabutilamônio 0,05 M e metanol (75:25). As soluções padrão e amostra foram diluídas até concentração de 12 µg/mL. Adicionalmente, determinou-se a densidade e a massa média da gota (determinado a partir da média de 10 frasco, sendo determinadas as massas de 20 gotas por frasco) das preparações farmacêuticas oftálmicas testadas.

As fontes de incerteza consideradas no estudo foram aquelas associadas a quantificação de ciprofloxacino, a densidade (gravidade específica) e a massa média da gota (posteriormente convertida para volume médio da gota) das preparações farmacêuticas oftálmicas. O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 30** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

Figura 30. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada a determinação da dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas. Adaptado de [33].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 19** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 19. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada a dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Quantificação de	Massa do padrão de referência	ws	15,6 mg	0,1 mg	0,05 mg
fármaco	Pureza do padrão de referência	Pot	0,998	0,002*	0,0008
$u_{\%}$ conforme Eq. (41)	Balão volumétrico de 100 mL	$100vfs$	100,0 mL	0,3 mL**	0,17 mL
	Pipeta volumétrica de 2 mL	$2vpu$	2,000 mL	0,006 mL**	0,0035 mL
	Balão volumétrico de 100 mL	$50vfu$	50,0 mL	0,15 mL**	0,087 mL
	Área do padrão de referência	As	40.015.177	-	494.606
	Área da amostra (Produto A)	Au^A	39.336.502	-	90.591
	Área da amostra (Produto B)	Au^B	39.127.635	-	248.416
Densidade	Volume do picnômetro	$Vpic$	5,548 mL	0,017 mL**	0,0096 mL
(gravidade específica)	Massa do picnômetro vazio	$wpic$	11,4059 g	-	0,00014 g
u_ρ conforme Eq. (42)	Massa do picnômetro cheio (Produto A)	wu^A	17,0390 g	-	0,00106 g
	Massa do picnômetro cheio (Produto B)	wu^B	16,9787 g	-	0,00049 g
Massa média da gota	Variabilidade entre frascos (produto A)	wg^A	185.971	-	1.020
u_{wg} conforme Eq. (43)	Variabilidade entre frascos (produto B)	wg^A	185.624	-	1.018

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente, *distribuição retangular, **distribuição triangular. Adaptado de [33].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à quantificação de fármaco ($u_{\%}$), a densidade ou gravidade específica (u_ρ) e a massa média da gota (u_{wg}) estão apresentas nas equações (41), (42) e (43), respectivamente. A incerteza combinada da dose efetiva (u_D) pode ser calculada conforme a equação (44), onde n é o número indicado de gotas por dose.

$$u_{Cs} = \% \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{Pot}}{Pot}\right)^2 + \left(\frac{u_{100vf}}{100vf}\right)^2 + \left(\frac{u_{2vp}}{2vp}\right)^2 + \left(\frac{u_{50vf1}}{50vf1}\right)^2 + \left(\frac{u_{As}}{As}\right)^2 + \left(\frac{u_{Au}}{Au}\right)^2} \quad \text{Eq. (41)}$$

$$u_\rho = \rho \times \sqrt{\left(\frac{u_{Vpic}}{Vpic}\right)^2 + \left(\frac{u_{wpic}}{wpic}\right)^2 + \left(\frac{u_{wu}}{wu}\right)^2} \quad \text{Eq. (42)}$$

$u_g = s_g$, sendo s_g o desvio padrão obtido para 20 frascos Eq. (43)

$$u_D = \frac{\% \times wg \times n}{\rho} \times \sqrt{\left(\frac{u_{\%}}{\%}\right)^2 + \left(\frac{u_\rho}{\rho}\right)^2 + \left(\frac{u_{wg}}{wg}\right)^2} \quad \text{Eq. (44)}$$

Aplicando-se os valores apresentados na **Tabela 19** nas equações (41) a (44), podemos calcular que as incertezas expandidas da dose de ciprofloxacino efetivamente administrada foram 0,238 ± 0,018 mg de ciprofloxacino/dose e 0,354 ± 0,026 mg de ciprofloxacino/dose para os produtos A e B, respectivamente. Empregou-se um fator de abrangência $k = 2$ para 95% de confiança.

A incerteza associada a variabilidade da massa média da gota entre os 20 frascos foi a mais relevante, contribuindo com 81,7% da incerteza total. Por outro lado, a incerteza associada a densidade (gravidade específica) teve pequena contribuição para a incerteza total. A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 31**.

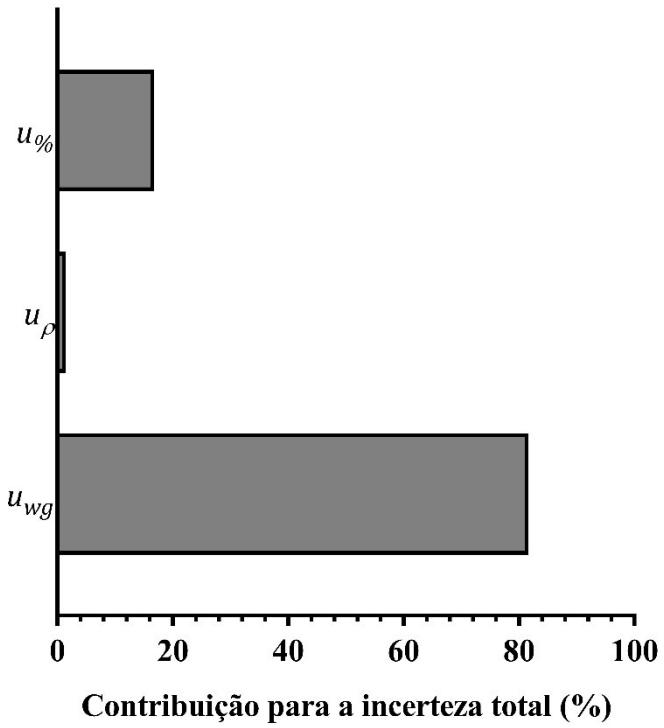
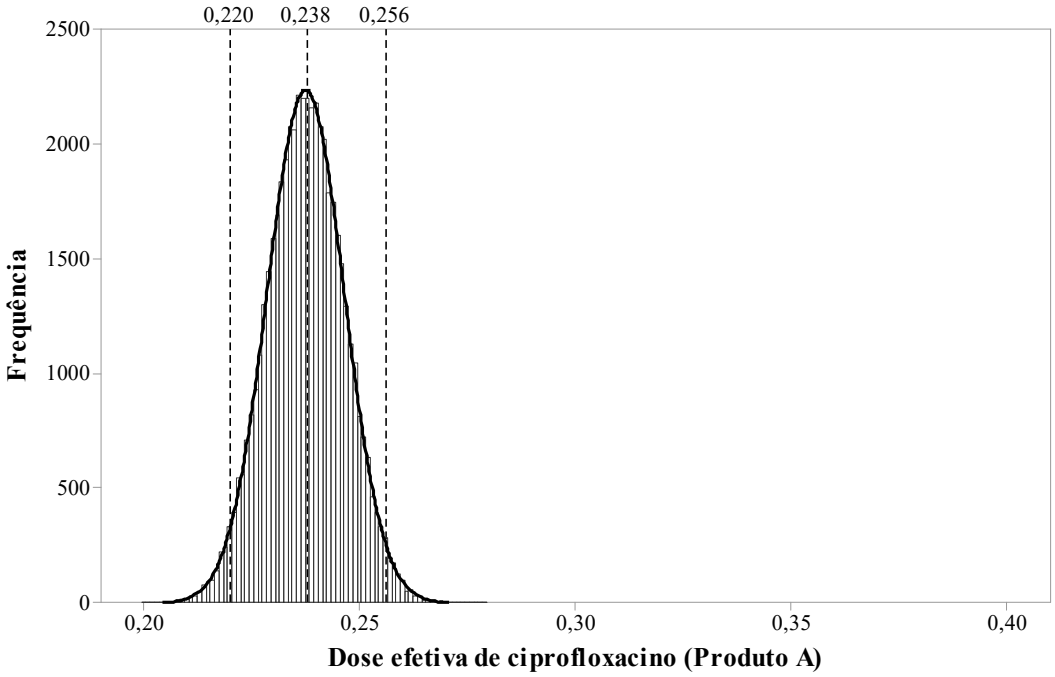


Figura 31. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada a determinação da dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas. Adaptado de [33].

Alternativamente, as incertezas expandidas foram estimadas por simulações de Monte Carlo, empregando-se 50.000 simulações (**Figura 32**). Os valores obtidos pelo método de Monte Carlo foram semelhantes aos obtidos pelas equações propostas aplicando-se a lei das propagações das incertezas.



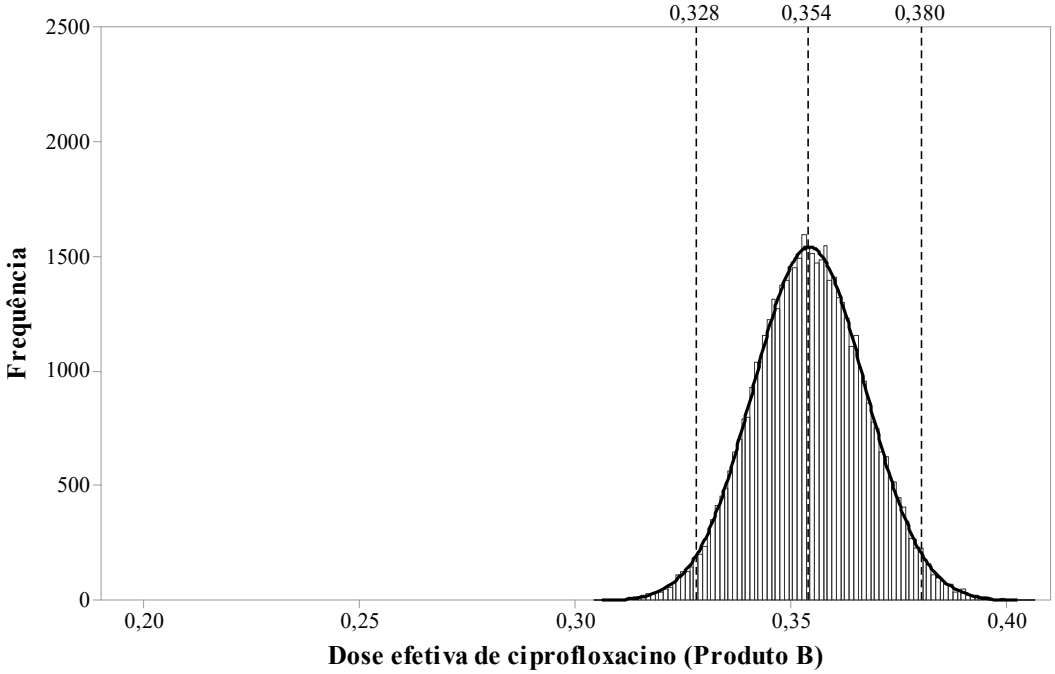


Figura 32. Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição associada a dose de ciprofloxacino efetivamente administrada em preparações farmacêuticas oftálmicas (Produtos A e B). Adaptado de [33].

4.6.Doseamento microbiológico por difusão em agar

A atividade ou potência relativa de antibióticos, antimicrobianos e antifúngicos pode ser demonstrada, em condições analíticas apropriadas, por seu efeito de inibição do crescimento microbiano. Uma redução da atividade antimicrobiana pode indicar alterações não detectadas em métodos químicos, particularmente para antibióticos compostos por misturas de componentes.

O doseamento microbiológico por difusão em agar é um método recomendado em diversas farmacopeias e compêndios oficiais para a avaliação da potência relativa de antibióticos a partir das medidas dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento. A formação dos halos de inibição de crescimento depende de dois fenômenos: a) a difusão do antibiótico; e b) o crescimento microbiano. De acordo com a lei de difusão de Fick, a concentração de antibiótico (C_T), após um determinado tempo (T), pode ser estimada em função da concentração inicial (C_0) e da constante de difusão (D). Por outro lado, a carga microbiana (N_2), após um determinado tempo de incubação (T), é função da carga microbiana inicial (N_0), do tempo de fase estacionária lag (L) e da velocidade de geração (G) do microrganismo. Considerando que o ensaio seja conduzido em condições analíticas adequadas e constantes, o tamanho dos halos de inibição de crescimento é proporcional à concentração de antibiótico.

Devido a variabilidade inerente ao método microbiológico, é importante que a determinação da potência relativa da amostra seja realizada em comparação com substância química de referência com atividade antibicrobiana conhecida. Adicionalmente, é recomendável que seja adotado um delineamento experimental que garanta a validade do resultado analítico (potência relativa) obtido.

4.6.1. Doseamento microbiológico de vancomicina em formas farmacêuticas

Lourenço e colaboradores [45] propuseram um procedimento para a estimativa de incerteza de medição para o doseamento microbiológico de vancomicina, com base nos resultados de validação do método.

O doseamento microbiológico de vancomicina foi realizado empregando-se um delineamento experimental 5x1. As placas de Petri foram preparadas adicionando-se 10 mL de meio de cultura antibiótico nº 8 pH 5,9 ± 0,1 como camada base, e 4 mL do meio

de cultura previamente inoculado com 0,5% de suspensão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Discos de papel de filtro (12,8 mm) previamente imersos em soluções padrão (concentrações de 6,4, 8,0, 10,0, 12,5 e 15,6 µg/mL) ou amostra (concentração de 10,0 µg/mL) foram distribuídos na superfície das placas de Petri. As placas foram incubadas a 37,0 ± 1,0ºC por 18 h. Os tamanhos dos halos de inibição foram medidos em leitor de halos e utilizados para cálculo da potência relativa de vancomicina na forma farmacêutica.

O doseamento microbiológico de vancomicina foi validado quanto aos parâmetros de linearidade, especificidade, exatidão e precisão. A linearidade foi avaliada pela análise de regressão dos tamanhos dos halos de inibição em função do logaritmo das concentrações das soluções-teste. A especificidade foi avaliada comparando-se a inclinação das curvas obtidas com as soluções amostras e aquelas obtidas com USP vancomicina RS, avaliando-se assim o efeito da matriz. A exatidão foi avaliada pela recuperação de quantidades de USP vancomicina RS adicionadas às amostras (8 determinações). A precisão foi avaliada em condições de precisão intermediária (dias diferentes) nos níveis de 80, 100 e 120% da concentração mediana (12 determinações). Um resumo dos resultados de validação do método está apresentado na **Tabela 20**.

Tabela 20. Resumo dos resultados de validação de método para o doseamento microbiológico de vancomicina em formas farmacêuticas.

Parâmetro	Critério	Resultado
Linearidade	r ≥ 0,98	r = 0,9896
Especificidade	Específico	Específico
Exatidão (recuperação)	95% < Rec < 105%	Rec = 109,8% (2,3%)
Precisão	RSD ≤ 5,0%	RSD = 1,8%

Adaptado de [45].

A incerteza de medição pode ser expressa como uma combinação dos erros sistemáticos (exatidão) e aleatórios (precisão). A incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico de vancomicina foi estimada a partir das incertezas da exatidão ($u_{Rec} = s_{Rec}$, com 7 graus de liberdade) e da precisão ($u_{Pr} = s_{Pr}$, com 11 graus de liberdade), conforme apresentado na equação (45).

$$u_{\%} = \frac{1}{Rec} \times \sqrt{\left(\frac{s_{Rec}}{n}\right)^2 + {s_{Pr}}^2} \qquad \text{Eq. (45)}$$

A partir dos valores de exatidão e precisão apresentados na **Tabela 20** aplicados à equação (45), as incertezas combinada e expandida para o doseamento microbiológico de vancomicina foram 2,0% e 4,3%. Empregou-se um fator de abrangência $k = 2{,}1$ (para 15 graus de liberdade efetivo) para 95% de confiança. A incerteza associada a precisão contribuiu com cerca de 80% da incerteza total, enquanto que a incerteza associada a exatidão contribuiu com apenas cerca de 20% da incerteza total.

4.6.2. Doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas

Lourenço [10] realizou estudo para identificar e quantificar as principais fontes de incerteza associadas doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas.

O doseamento microbiológico de apramicina foi realizado empregando-se um delineamento experimental 3x1, proposto por Lourenço e colaboradores [9]. As placas de Petri foram preparadas adicionando-se 21 mL de meio de cultura antibiótico nº 2 pH 8,0 como camada base, e 4 mL do meio de cultura previamente inoculado com 0,5% de suspensão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Discos de papel de filtro (6 mm) previamente imersos em soluções padrão (concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 µg/mL) ou amostra (concentração de 2,0 µg/mL) foram distribuídos na superfície das placas de Petri. As placas foram incubadas a 37,0 ± 1,0ºC por 24 h. Os tamanhos dos halos de inibição foram medidos em leitor de halos e utilizados para cálculo da potência relativa de apramicina na forma farmacêutica [46].

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 33** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

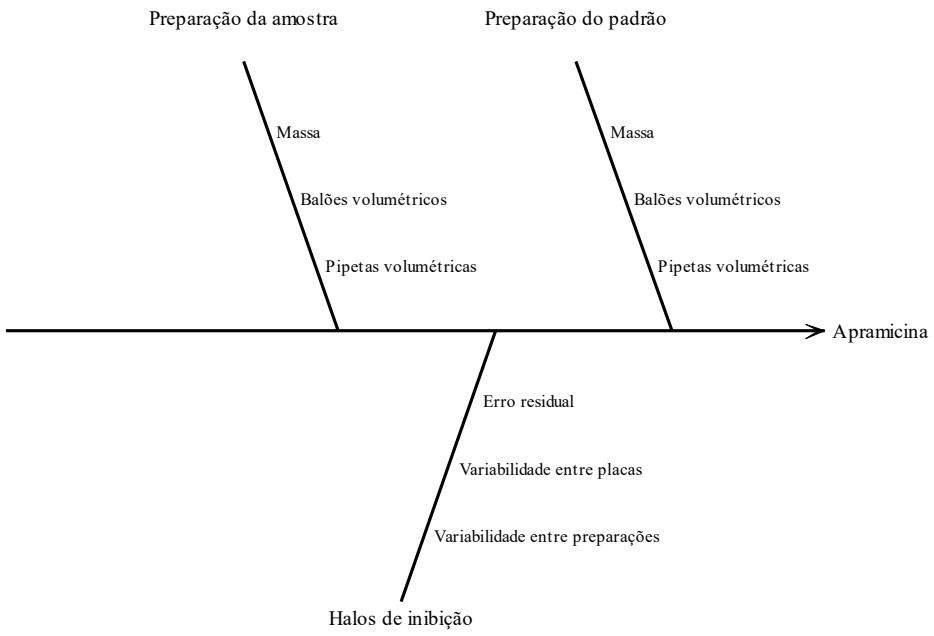


Figura 33. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas. Adaptado de [10].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A **Tabela 21** apresenta a relação dos valores dos componentes de incertezas estudados. As fontes de incerteza foram convertidas em incerteza padrão para, em seguida, serem combinadas empregando a lei de propagação das incertezas.

Tabela 21. Fontes de incerteza, componentes de incerteza, valores, incertezas expandidas e incertezas padrão utilizadas na estimativa da incerteza combinada associada ao doseamento microbiológico de apramicina em formas farmacêuticas.

Fonte de incerteza	Componente de incerteza	i	Valor	U	u_i
Preparação das soluções padrão e amostra, conforme Eq. (46)	Massa (balança analítica	ws e wu	5-1.000 mg	0,1 mg	0,05 mg
	Balão volumétrico de 25 mL	$25vf$	25,0 mL	0,075 mL	0,0375 mL
	Balão volumétrico de 50 mL	$50vf$	50,0 mL	0,015 mL	0,075 mL
	Balão volumétrico de 100 mL	$100vf$	100,0 mL	0,3 mL	0,15 mL
	Balão volumétrico de 250 mL	$250vf$	250,0 mL	0,75 mL	0,375 mL
	Pipeta volumétrica de 1,0 mL	$1vp$	1,0 mL	0,006 mL	0,003 mL
	Pipeta volumétrica de 5,0 mL	$2{,}5vp$	2,5 mL	0,015 mL	0,0075 mL
	Pipeta volumétrica de 10,0 mL	$5vp$	5,0 mL	0,03 mL	0,015 mL
	Pipeta volumétrica de 1,0 mL	$10vp$	10,0 mL	0,06 mL	0,03 mL

U = incerteza expandida, u_i = incerteza padrão para o i-éssimo componente. Adaptado de [10].

A aplicação da lei da propagação das incertezas para a estimativa das incertezas intermediárias associadas à preparação das soluções padrão e amostra (u_D) e aos tamanhos dos halos de inibição (u_M) estão apresentas nas equações (45) e (47), respectivamente.

$$u_D = \frac{Cs}{Cu} \times \sqrt{\left(\frac{u_{ws}}{ws}\right)^2 + \left(\frac{u_{wu}}{wu}\right)^2 + 3\left(\frac{u_{25vf}}{25}\right)^2 + \left(\frac{u_{250vf}}{250}\right)^2 + 4\left(\frac{u_{1v}}{1}\right)^2 + 4\left(\frac{u_{100vf}}{100}\right)^2 + 2\left(\frac{u_{5v}}{5}\right)^2 + \left(\frac{u_{2,5vp}}{2,5}\right)^2 + \left(\frac{u_{5vp}}{5}\right)^2 + \left(\frac{u_{10vp}}{10}\right)^2 + \left(\frac{u_{50vf}}{50}\right)^2} \quad \text{Eq. (46)}$$

$$u_M = \sqrt{\frac{{s_E}^2}{b^2} \times \left(\frac{2}{3 \times n}\right)}, \text{ onde } b = \frac{(S4 - S1)}{2 \times log(2)} \text{ e } n \text{ é o número de placas} \quad \text{Eq. (47)}$$

O valor de ${s_E}^2 = SQ_E / gl_E$ é obtido a partir da análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento, conforme a **Tabela 22**. O valor de $b = \frac{(S3 - S1)}{2} \times log(2)$ é a inclinação da curva padrão.

Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) para as estimativas das incertezas associadas ao tamanho dos halos de inibição.

Fonte	gl	SQ	QM	F
Preparações (T)	$p-1$	$\sum P^2/n - (\sum Y)^2/np$	SQ_T/gl_T	QM_T/QM_E
Placas (B)	$n-1$	$\sum B^2/p - (\sum Y)^2/np$	SQ_B/gl_B	QM_B/QM_E
Erro (E)	$(n-1)(p-1)$	$SQ_{Total} - SQ_B - SQ_T$	SQ_E/gl_E	
Total ($Total$)	$np-1$	$\sum Y^2 - (\sum Y)^2/np$		

Legenda: gl = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, F = teste F calculado, p = número de preparações (usualmente 4 a 6 para o delineamento 3x1), n = número de placas (usualmente 6), P = soma do tamanho dos halos de inibição para cada preparação, B = soma do tamanho dos halos de inibição para cada placa, Y = tamanho dos halos de inibição. Adaptado de [10].

A potência relativa de apramicina pode ser calculada conforme a equação (48). A incerteza combinada do doseamento microbiológico de apramicina pode ser calculada conforme a equação (49).

$$M = \frac{(A-S2)}{(S4-S1)} \times 2 \times log(2) \qquad \text{Eq. (48)}$$

$$IC_{95\%} = 10^{M \pm t_{5\%,gl_E} \times s_M} \qquad \text{Eq. (49)}$$

A partir das equações (48) e (49), podemos calcular as potências relativas de apramicina em formas farmacêuticas e suas respectivas incertezas expandidas para 3 amostras diferentes: 98,9% ± 7,1% (amostra A), 99,9% ± 7,1% (amostra B) e 96,2% ± 6,9% (amostra A).

A incerteza associada ao tamanho dos halos de inibição de crescimento contribuiu com 96,3% da incerteza total. Por outro lado, as incertezas associadas as preparações das soluções padrão e amostra contribuíram com apenas 3,7% da incerteza total.

4.6.3. Doseamento microbiológico de caspofungina formas farmacêuticas

Ghisleni e colaboradores [8] propuseram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico de caspofungina em formas farmacêuticas.

O doseamento microbiológico de caspofungina foi realizado empregando-se um delineamento experimental 3x3. As placas de Petri foram preparadas em sistema de monocamada com 25 mL de meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar (SDA) previamente inoculado com 1,0% de suspensão de *Candida albicans* (ATCC 10231) ajustada para 25 ± 1% de transmitância a 580 nm. Cilindros de aço-inox foram distribuídos na superfície das placas de Petri e adicionou-se 100 µL de soluções padrão (concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 µg/mL) ou amostra (concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 µg/mL) no interior dos cilindros. As placas foram incubadas a 32,0ºC por 24 h. Os tamanhos dos halos de inibição foram medidos em leitor de halos e utilizados para cálculo da potência relativa de caspofungina na forma farmacêutica.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 34** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo. As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A incerteza associada ao tamanho dos halos de inibição de crescimento (u_M) contribuiu com cerca de 87% da incerteza total. Por outro lado, as incertezas associadas as preparações das soluções padrão (u_{Cs}) e amostra (u_{Cu}) contribuíram com apenas cerca de 13% da incerteza total. A contribuição das diferentes fontes de incerteza está apresentada na **Figura 35**.

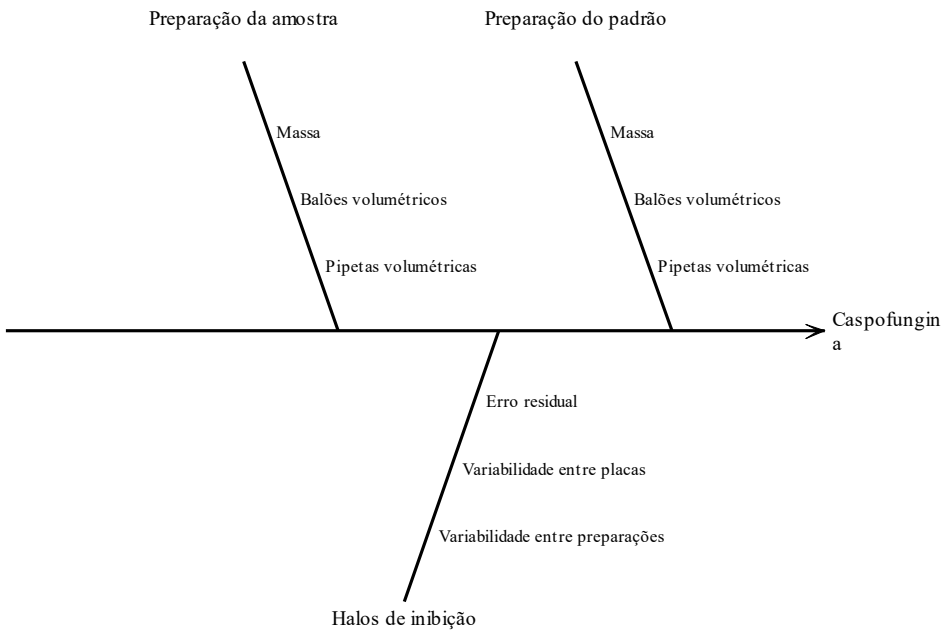


Figura 34. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada doseamento microbiológico de caspofungina em formas farmacêuticas. Adaptado de [8].

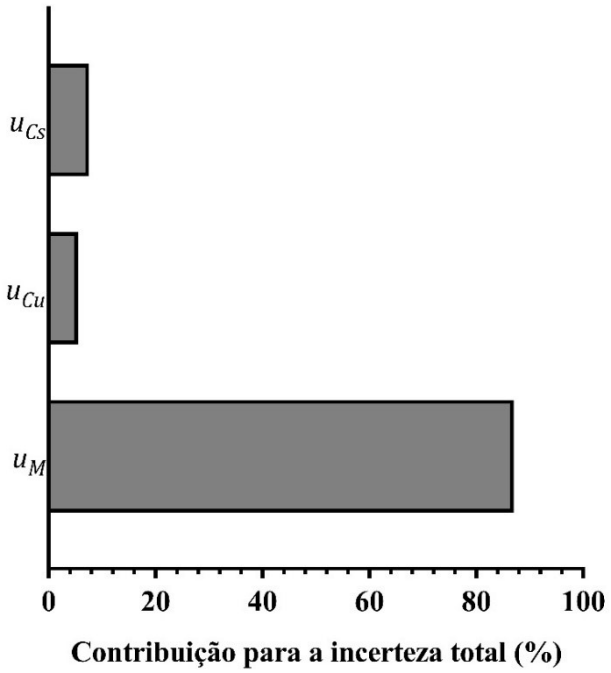


Figura 35. Contribuição das fontes de incerteza individuais para estimativa da incerteza de medição total associada ao doseamento microbiológico de caspofungina em formas farmacêuticas. Adaptado de [8].

Considerando-se que a incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico (tanto de caspofungina como de apramicina, em estudo anterior) pode ser majoritariamente estimada em função da variabilidade do tamanho dos halos de inibição, propôs-se a simplificação do procedimento de cálculo da incerteza total, excluindo-se as incertezas associadas às preparações das soluções padrão e amostra.

Desta forma, a potência relativa de caspofugina e sua incerteza de medição foram calculadas de acordo com as equações (50) e (51), respectivamente

$$M = \frac{4\times(A3+A2+A1-S3-S2-S1)}{3\times(A3-A1+S3-S1)} \times log(2) \qquad \text{Eq. (50)}$$

$$IC_{95\%} = 10^{M \pm t_{5\%,gl_E} \times \sqrt{{s_E}^2/b^2}} \qquad \text{Eq. (51)}$$

O valor de ${s_E}^2 = SQ_E/gl_E$ é obtido a partir da análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento. O valor de $b = \frac{(A3-A1+S3-S1)}{4} \times log(2)$ é a inclinação combinada das curvas padrão e amostra. A partir das equações (50) e (51), a potência relativa de caspofungina e sua respectiva incerteza expandida foi de 103,0% ± 1,7%.

4.6.4. Doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas

Saviano e colaboradores [47] desenvolveram, otimizaram e validaram o procedimento para o doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas.

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 com a finalidade de identificar os fatores mais relevantes para o tamanho dos halos de inibição de crescimento. Foram estudados 4 fatores: tipo de microrganismo-teste (*Kocuria rhizophila* ou *Staphylococcus aureus*), tipo de meio de cultura (meio de cultura antibiótico nº 1 ou *Tryptic Soy Agar* – TSA), volume da camada inoculada (4,0 ou 5,0 mL) e proporção de inóculo (1,0 ou 2,0%). De acordo com o gráfico de Pareto (**Figura 36**), o tipo de microrganismo e a concentração de linezolida foram os fatores que apresentaram maior influência no tamanho dos halos de inibição de crescimento. Os gráficos de efeitos principais para cada fator estudado estão apresentados na **Figura 37**.

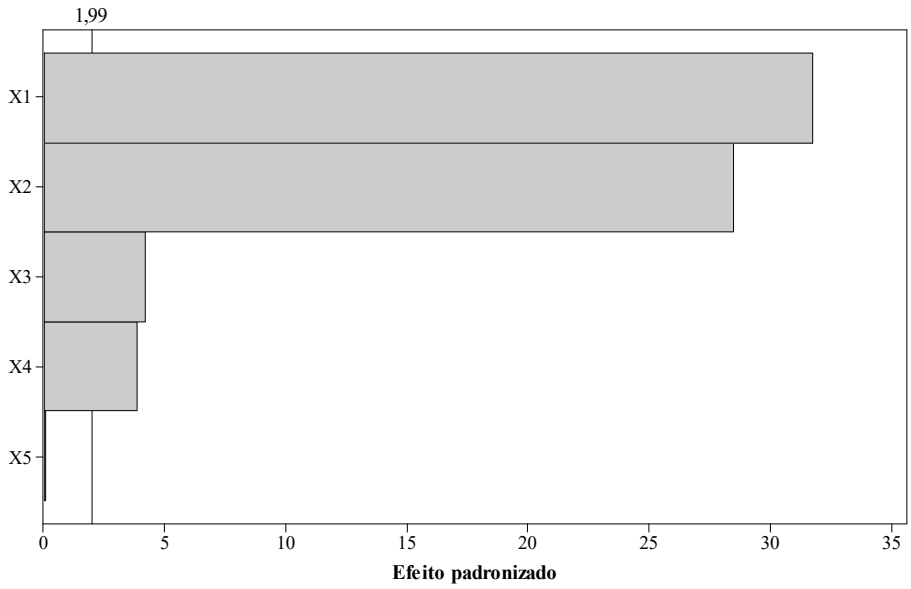


Figura 36. Gráfico de Pareto mostrando a influência do tipo de microrganismo (X1), concentração de linezolida (X2), proporção de inóculo (X3), volume de camada inoculada (X4) e tipo de meio de cultura (X5) no tamanho dos halos de inibição de crescimento. Adaptado de [47].

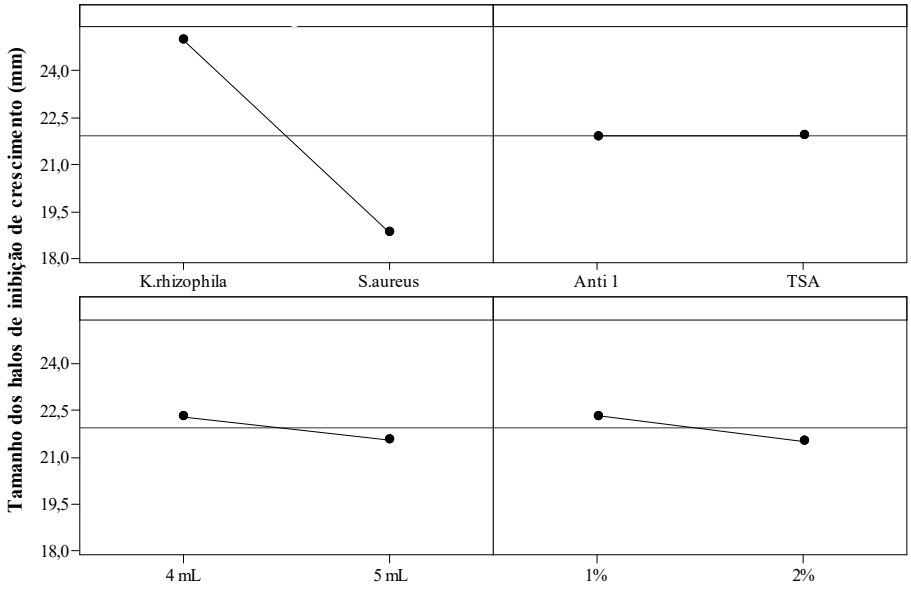


Figura 37. Gráficos de efeitos principais mostrando a influência do tipo de microrganismo, tipo de meio de cultura, volume de camada inoculada e proporção de inóculo no tamanho dos halos de inibição de crescimento. Adaptado de [47].

O microrganismo-teste (*Staphylococcus aureus*) e o meio de cultura (Anti 1) foram adotados a partir dos resultados do planejamento fatorial. Em seguida, foi realizado um planejamento de compósito central (*Central Composite Design* – CCD) para otimizar o volume de meio de cultura, a proporção de inóculo e as concentrações de linezolida. Os gráficos 3D que explicam o tamanho dos halos de inibição de crescimento em função do volume de meio de cultura, da proporção de inóculo e das concentrações de linezolida estão apresentados na **Figura 38**.

O doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas foi definido conforme as seguintes condições analíticas otimizadas: 1) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como microrganismo-teste; 2) meio de cultura antibiótico nº 1; 3) sistema de bicamanda com 21 mL de camada base e 4 mL de camada inoculada; 4) proporção de inóculo de 1%; 5) incubação a 37 ± 1ºC por 18-24 h; e 6) concentrações de linezolida de 25, 50 e 100 µg/mL.

A principal fonte de incerteza de medição do doseamento microbiológico está associada a variabilidade do tamanho dos halos de inibição (entre e dentre placas). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a potência relativa de linezolida e sua respectiva incerteza expandida foi de 102,7 ±3,1%. Este valor de incerteza é comparável com os valores obtidos para doseamento microbiológico de apramicina (6,9 a 7,1%), caspofungina (1,7%) e vancomicina (4,3%). Também é comparável com os valores de incerteza para a quantificação de linezolida por espectrofotometria de absorção no UV (2,1%) e por UPLC (2,5%).

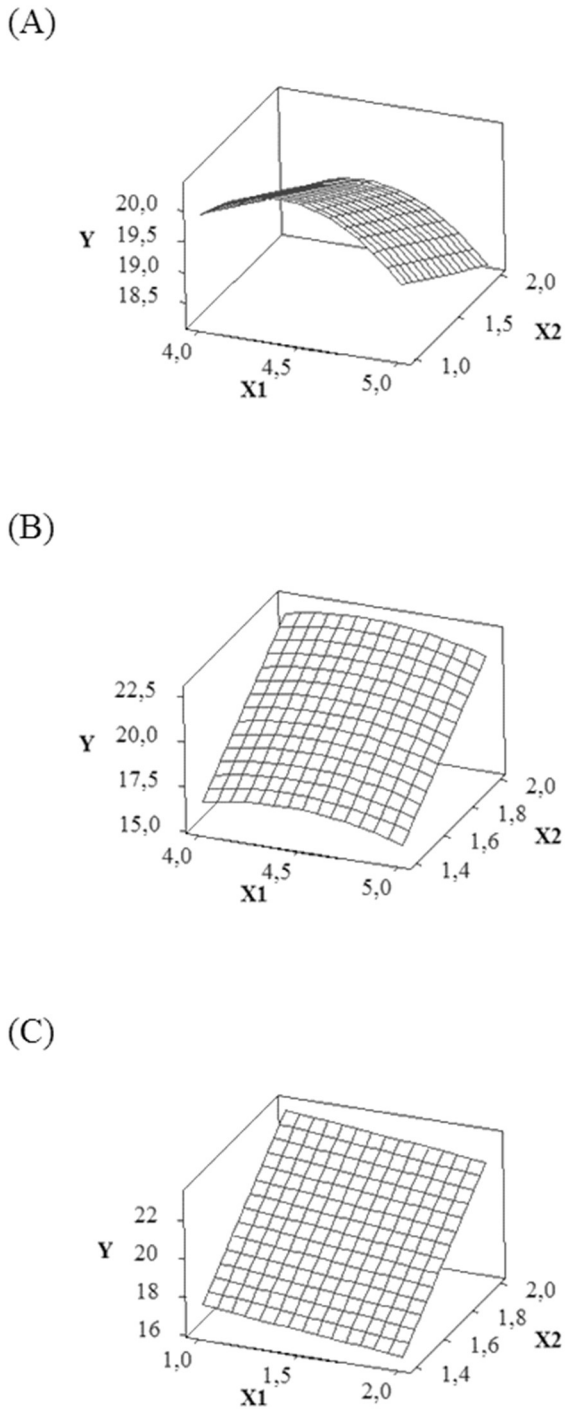


Figura 38. Gráficos 3D que explicam o tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y). (A) Y em função do volume do meio de cultura (X1) e da proporção de inóculo (X2); (B) Y em função do volume de meio de cultura (X1) e das concentrações de linezolida (X2); e (C) Y em função da proporção de inóculo (X1) e das concentrações de linezolida (X2). Adaptado de [47].

Usualmente, o tamanho dos halos de inibição é definido após um curto período de incubação, entretanto os halos de inibição podem ser visualizados somente após o crescimento microbiano por cerca de 18-24h. Galvão e colaboradores [48] propuseram método microbiológico rápido (*Rapid Microbiological Method* – RMM) para a determinação da potência de linezolida empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como corante vital.

Por meio da determinação e otimização dos parâmetros críticos do doseamento microbiológico, foi possível elucidar o mecanismo de formação dos halos de inibição de crescimento nas condições analíticas empregadas. Desta forma, foi possível reduzir o tempo de incubação de cerca de 18-24 horas para apenas 6 horas. Estudos adicionais ainda precisam ser conduzidos para avaliado o impacto da redução do tempo de incubação na incerteza associada ao método microbiológico rápido.

4.6.5. Doseamento microbiológico de cefalosporinas em formas farmacêuticas

Uma das limitações do doseamento microbiológico diz respeito a alta variabilidade inerente às respostas biológicos. De acordo com resultados obtidos em estudos anteriores, a principal fonte de incerteza relacionada ao doseamento microbiológico está associada a variabilidade do tamanho dos halos de inibição de crescimento, correspondendo a até cerca de 98% da incerteza total.

A formação dos halos de inibição de crescimento baseia-se em dois fenômenos: 1) a difusão do antibiótico ou antimicrobiano; e 2) o crescimento microbiano. Diversos fatores afetam a difusão do antibiótico ou antimicrobiano e/ou o crescimento microbiano e, consequentemente afetam o tamanho dos halos de inibição de crescimento. Dentre estes fatores, podemos destacar a composição e pH do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação, período de pré-incubação ou pré-difusão, escolha do microrganismo-teste e proporção de inóculo empregado durante o ensaio, dentre outros.

Saviano e Lourenço [49] estudaram como a composição do meio de cultura, proporção do inóculo, período de pré-incubação e concentração de antibiótico afetam o tamanho dos halos de inibição, com a finalidade de identificar e quantificar as principais fontes de incertezas associadas ao doseamento microbiológico.

Foram realizadas análises de regressão múltipla (*Multiple Regression Analysis* – MRA), considerando-se 4 variáveis: 1) concentração de antibiótico (cefazolina: 26, 52,

105 e 210 µmol/L; cefuroxima: 29, 59, 118 e 236 µmol/L; ceftriaxona: 23, 45, 90 e 180 µmol/L; e cefepima: 22, 44, 87 e 175 µmol/L); 2) proporção de inóculo (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0%, equivalente a $1{,}8 \times 10^6$, $3{,}6 \times 10^6$, $7{,}3 \times 10^6$ e $1{,}4 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente), 3) período de pré-incubação (0, 2, 4 e 6 h); e 4) variação da composição do meio de cultura Müller Hinton Agar (MHA) (variações das quantidades de amino ácidos, extrato de carne e agar).

As equações de regressão do tamanho dos halos de inibição de crescimento em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) e seus respectivos coeficientes de determinação estão apresentados na **Tabela 23**. Os resultados de análise de variância (ANOVA) estão apresentados na **Tabela 24**.

Tabela 23. Equações de regressão e coeficientes de determinação dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento (Y)em função da composição do meio de cultura ($X1$ = amino ácidos, $X2$ = extrato de carne e $X3$ = agar), concentração de antibiótico ($X4$ = ln(Co)), proporção de inóculo ($X5$ = log2(No)) e período de pré-incubação ($X6$ = h).

Antibióticos	Equações de regressão	R^2	R^2aj	R^2pred
Cefazolina	$Y = 31{,}46 - 0{,}2323 \times X1 + 1{,}867 \times X2 - 0{,}001 \times X3 + 0{,}68 \times X4 - 1{,}032 \times X5 - 3{,}504 \times X6 - 0{,}01125 \times X3^2 + 0{,}408 \times X4^2 + 0{,}0238 \times X6^2 + 0{,}0836 \times X1 \times X4 - 0{,}461 \times X2 \times X4 + 0{,}0697 \times X2 \times X6 + 0{,}01373 \times X3 \times X5 + 0{,}1888 \times X4 \times X6 + 0{,}0768 \times X5 \times X6$	95,90%	95,70%	95,47%
Cefuroxima	$Y = 85{,}4 + 0{,}606 \times X1 + 1{,}55 \times X2 + 1{,}308 \times X3 + 3{,}696 \times X4 - 7{,}53 \times X5 + 4{,}091 \times X6 + 0{,}1838 \times X5^2 - 0{,}1765 \times X6^2 + 0{,}3381 \times X1 \times X2 - 0{,}0434 \times X1 \times X5 - 0{,}171 \times X2 \times X5 - 0{,}1201 \times X2 \times X6 - 0{,}0636 \times X3 \times X5 - 0{,}01071 \times X3 \times X6 - 0{,}4010 \times X3 \times X6 - 0{,}1458 \times X5 \times X6$	92,95%	92,50%	91,78%
Ceftriaxona	$Y = 80{,}3 + 0{,}8952 \times X1 - 0{,}023 \times X2 - 0{,}1619 \times X3 + 7{,}00 \times X4 - 7{,}27 \times X5 - 0{,}412 \times X6 - 0{,}02637 \times X1^2 + 0{,}1607 \times X5^2 - 0{,}0377 \times X6^2 + 0{,}00466 \times X1 \times X3 + 0{,}01518 \times X3 \times X6 - 0{,}1521 \times X4 \times X5 - 0{,}2177 \times X4 \times X6$	91,02%	90,70%	90,30%
Cefepima	$Y = 28{,}74 - 0{,}223 \times X1 - 0{,}417 \times X2 - 0{,}314 \times X3 + 1{,}942 \times X4 - 1{,}147 \times X5 - 1{,}022 \times X6 + 0{,}279 \times X4^2 - 0{,}0244 \times X6^2 + 0{,}01240 \times X1 \times X5 - 0{,}00874 \times X1 \times X6 + 0{,}1807 \times X2 \times X6 - 0{,}02275 \times X3 \times X4 + 0{,}01314 \times X3 \times X5 - 0{,}2615 \times X4 \times X6 + 0{,}0535 \times X5 \times X6$	94,08%	93,76%	93,38%

Legenda: R^2aj = R^2ajustado / R^2pred = R^2 de predição. Adaptado de [49].

Tabela 24. Análise de variância (ANOVA) dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = $\log_2$(No)) e período de pré-incubação (X6 = h).

Fontes	Cefazolina			Cefuroxima			Ceftriaxona			Cefepima		
	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor
Regressão	15	7409,37	0,000	16	6807,54	0,000	13	5365,03	0,000	15	3025,01	0,000
X1	1	22,83	0,000	1	9,76	0,031	1	197,19	0,000	1	2,18	0,075
X2	1	14,46	0,000	1	0,82	0,528	1	0,06	0,840	1	6,42	0,002
X3	1	0,00	0,997	1	42,70	0,000	1	54,95	0,000	1	3,84	0,018
X4	1	0,44	0,515	1	887,11	0,000	1	26,46	0,000	1	3,48	0,025
X5	1	54,65	0,000	1	7,51	0,058	1	9,76	0,011	1	37,06	0,000
X6	1	44,18	0,000	1	38,53	0,000	1	6,62	0,035	1	3,19	0,031
$X1^2$							1	207,17	0,000			
$X3^2$	1	28,17	0,000									
$X4^2$	1	12,48	0,001							1	5,03	0,007
$X5^2$				1	8,97	0,038	1	9,57	0,011			
$X6^2$	1	2,89	0,097	1	99,26	0,000	1	8,35	0,018	1	2,67	0,049
X1×X2				1	234,63	0,000						
X1×X3							1	14,42	0,002			
X1×X4	1	57,14	0,000									
X1×X5				1	25,36	0,001				1	3,39	0,027
X1×X6										1	4,21	0,014
X2×X4	1	18,19	0,000									
X2×X5				1	5,19	0,114						
X2×X6	1	4,98	0,029	1	8,34	0,016				1	19,30	0,000
X3×X4										1	4,78	0,009
X3×X5	1	4,36	0,042	1	50,79	0,000				1	3,58	0,023
X3×X6				1	4,63	0,135	1	23,98	0,000			
X4×X5							1	6,26	0,041			
X4×X6	1	34,64	0,000	1	98,91	0,000	1	48,07	0,000	1	46,56	0,000
X5×X6	1	11,80	0,001	1	26,16	0,000				1	4,87	0,008
Erro	304	316,39		250	516,38		357	529,12		279	190,34	
Total	319	7725,77		266	7323,93		370	5894,15		294	3215,36	

Adaptado de [49].

Através dos modelos matemáticos obtidos na análise de regressão múltipla, foram construídos gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimentos em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para cada antibiótico: cefazolina (**Figura 39**), cefuroxima (**Figura 40**), ceftriaxona (**Figura 41**) e cefepima (**Figura 42**).

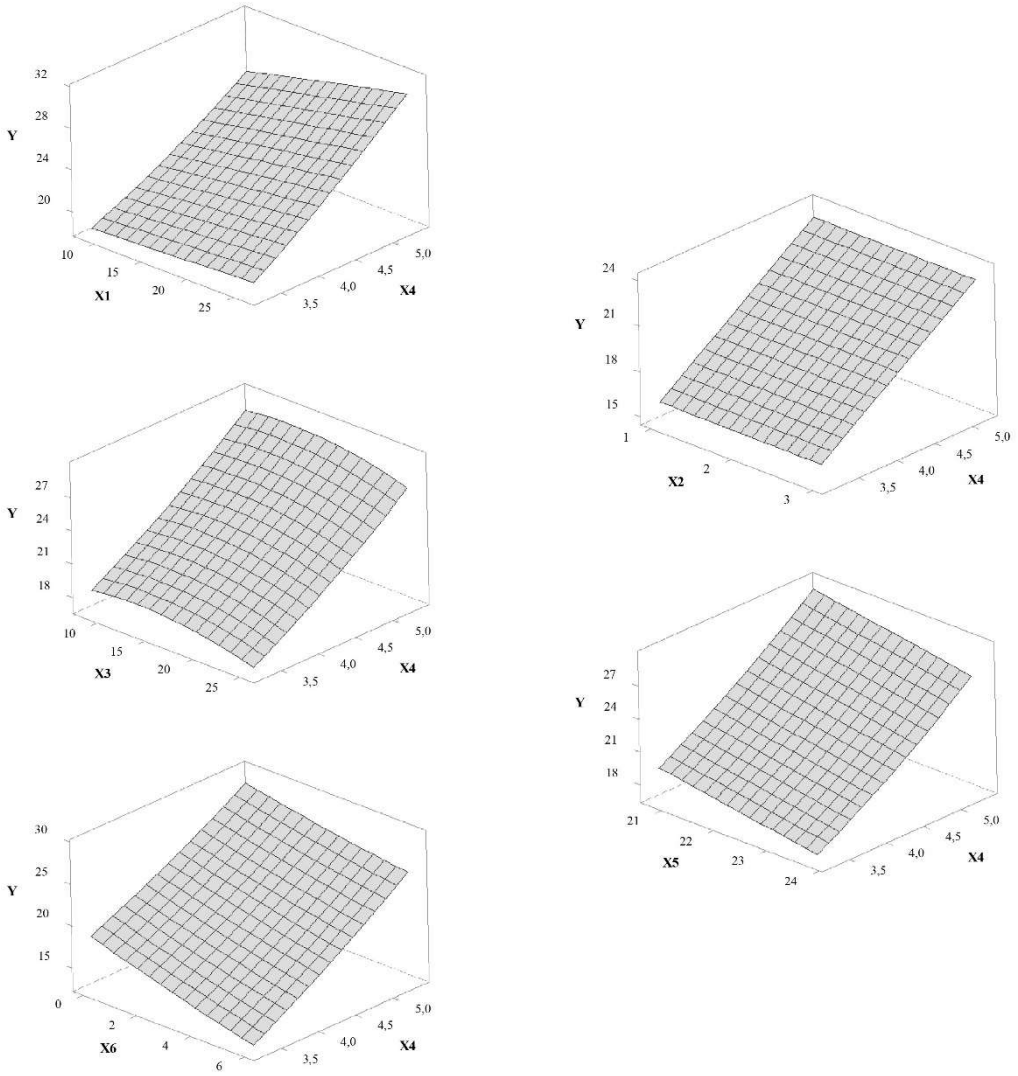


Figura 39. Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para cefazolina. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h. Adaptado de [49].

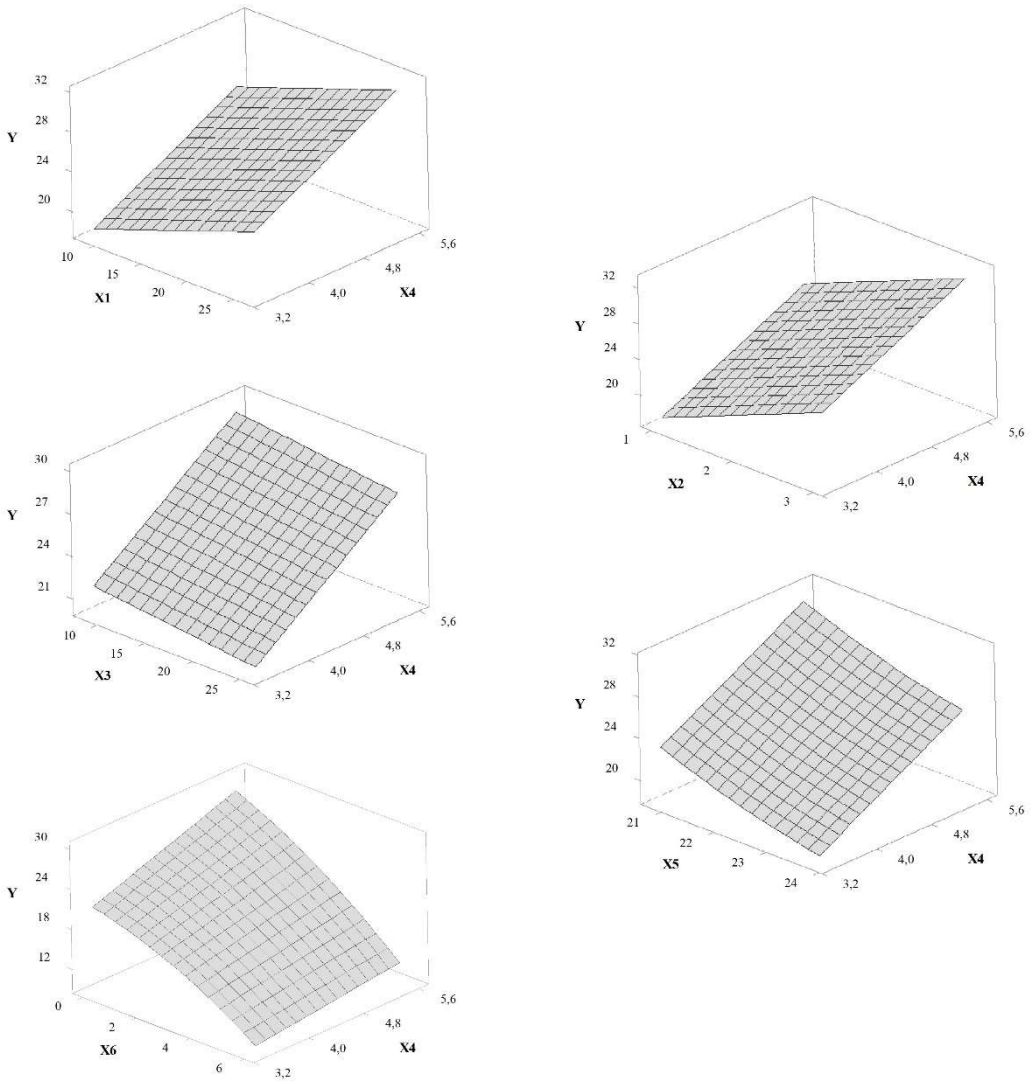


Figura 40. Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para Cefuroxima. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h. Adaptado de [49].

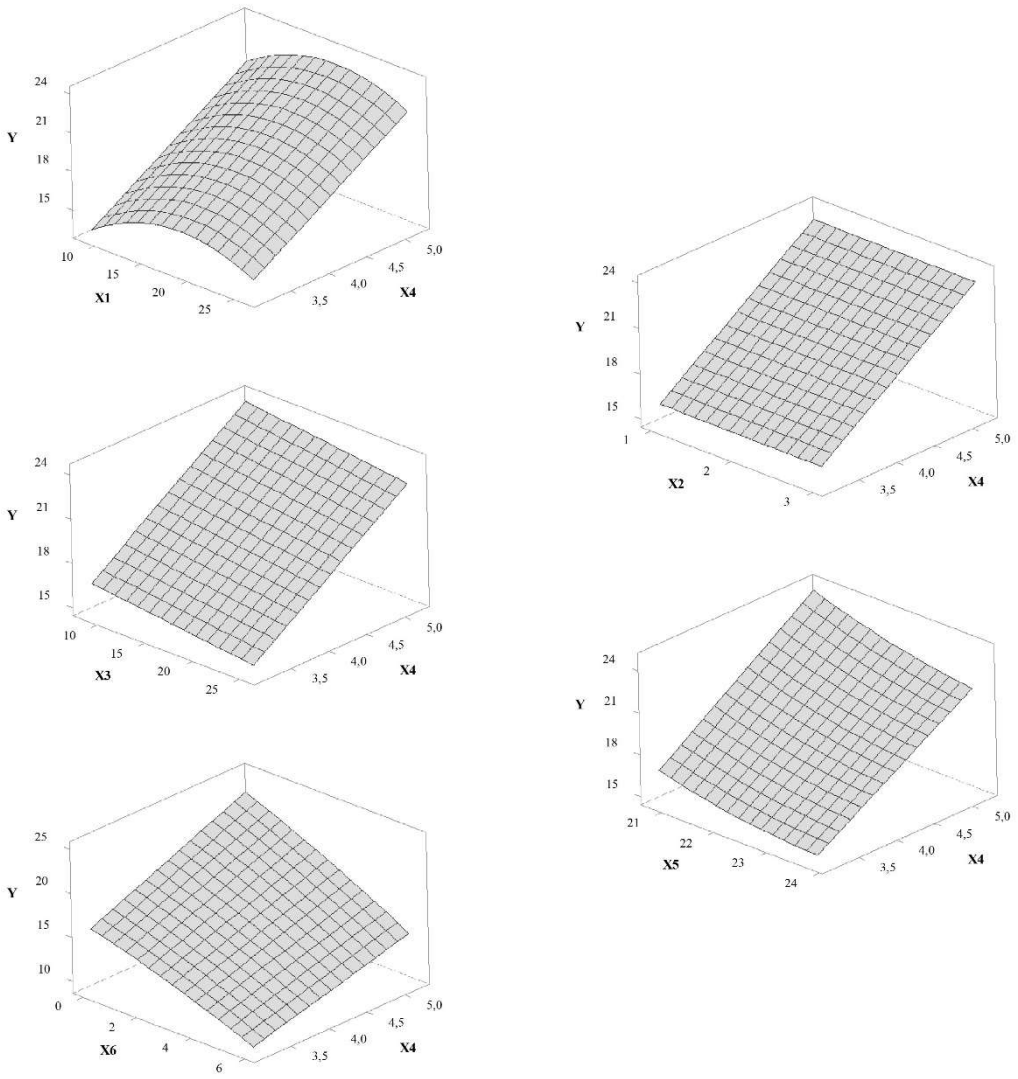


Figura 41. Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para ceftriaxona. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h. Adaptado de [49].

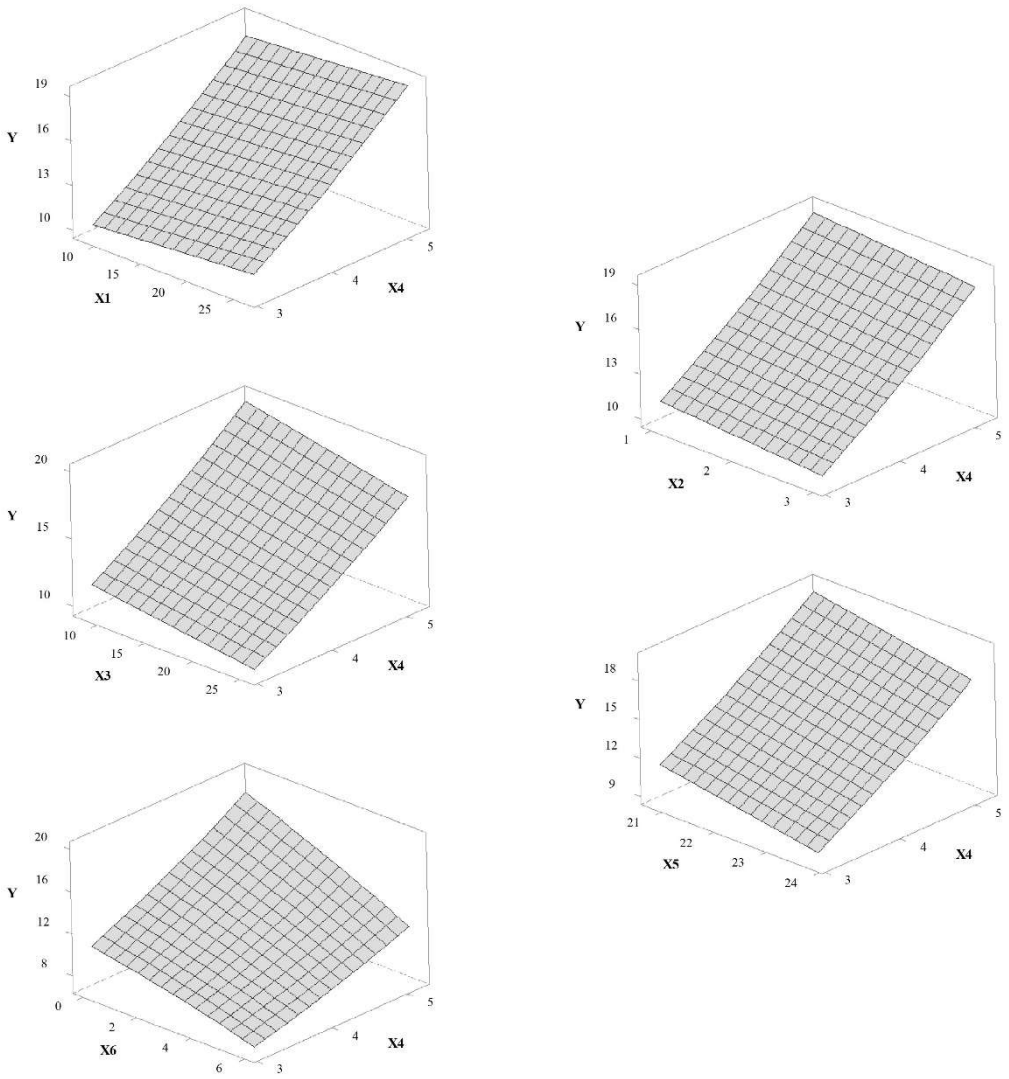


Figura 42. Gráficos 3D do tamanho dos halos de inibição de crescimento (Y) em função da composição do meio de cultura (X1 = amino ácidos, X2 = extrato de carne e X3 = agar), concentração de antibiótico (X4 = ln(Co)), proporção de inóculo (X5 = log2(No)) e período de pré-incubação (X6 = h) para cefepima. Valores fixados em: X1 = 17,5%, X2 = 2,0%, X3 = 17,0%, X5 = 1% e X6 = 0 h. Adaptado de [49].

Os modelos matemáticos foram utilizados para as simulações de Monte Carlo, com a geração de 100.000 valores aleatórios dos fatores de entrada (X1 a X6). As funções de densidade de probabilidades (*Probability Density Functions* - PDFs) usadas para cada fator de entrada, bem como seus parâmetros, foram listadas na **Tabela 25**. As incertezas dos fatores de entrada foram estabelecidas com base na literatura científica e na nossa experiência prévia em relação ao ensaio microbiológico de difusão de ágar.

Tabela 25. Funções de densidade de probabilidades (PDFs) de cada fator de entrada, assim como seus parâmetros, utilizados nas simulações de Monte Carlo para os tamanhos dos halos de inibição de crescimento.

Fator de entrada	PDF	Parâmetro
X1	Normal	Média = 17,50% / Desvio padrão = 1,75%
X2	Normal	Média = 2,0% / Desvio padrão = 0,2%
X3	Normal	Média = 17,0% / Desvio padrão = 1,7%
X4	Normal	Média = 50,00 µmol/L/ Desvio padrão = 0,25 µmol/L
X5	Triangular	Mínimo = $1{,}8 \times 10^6$ UFC/mL / Moda = $3{,}6\times 10^6$ UFC/mL / Máximo = $7{,}3\times 10^7$ UFC/mL
X6	Retangular	Mínimo = 0 h / Máximo = 1 h

Legenda: X1 = amino ácidos; X2 = extrato de carne; X3 = agar; X4 = concentração de antibiótico; X5 = proporção de inóculo; e X6 = período de pré-incubação. Adaptado de [49].

Os tamanhos de halos de inibição de crescimento foram calculados com base nas equações de regressão previamente estabelecidas e nos 100.000 valores de entrada gerados aleatoriamente. O tamanho dos halos de inibição de crescimento e suas respectivas incertezas expandidas obtidos pelas simulações de Monte Carlo foram: 1) cefazolina: 20,80 ± 0,90 mm; 2) cefuroxima: 22,23 ± 2,42 mm; 3) ceftriaxona: 18, 7 ± 0,94 mm; e 4) cefepima: 13,13 ± 0,80 mm. Empregou-se fator de abrangência $k = 1{,}96$ para um intervalo de confiança de 95%. As funções de densidade de probabilidades (PDF) da saída estão apresentadas na **Figura 43**.

As fontes de incertezas relacionadas com o tamanho dos halos de inibição de crescimento estudadas neste trabalho foram os componentes do meio de cultura MHA (X1 = extrato de carne, X2 = ácidos casamino e X3 = ágar), concentrações de antibióticos (X4 = LN (co)), o inóculo de microrganismos percentagens (X5 = log2No) e tempo de precubação (X6 = h). Segundo os gráficos de Pareto apresentados na **Figura 44**, a proporção do inóculo (X5 = log2(No)) foi a principal fonte de incerteza, contribuindo com cerca de 67,8 a 80,4% da incerteza total. No caso da cefuroxima, as quantidades de extrato de carne e de amino ácidos no meio de cultura foram as fontes que colaboraram com cerca de 25,6% de incerteza, o que pode ser explicado pela influência destes componentes na difusão do antibiótico ou no crescimento microbiano.

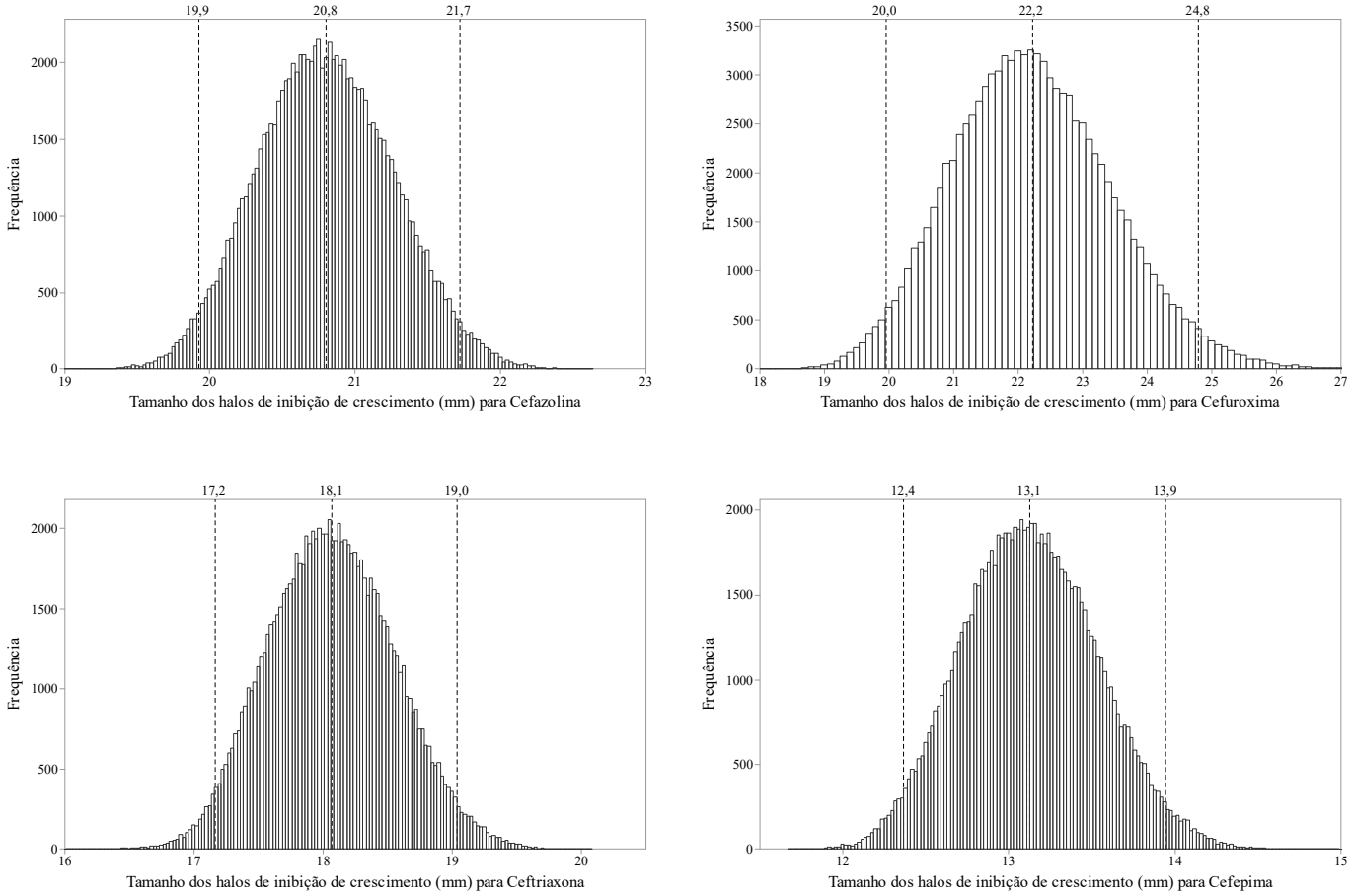


Figura 43. Histogramas dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento obtidos a partir das 100.000 simulações de Monte Carlo e das equações de regressão para cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima. Adaptado de [49].

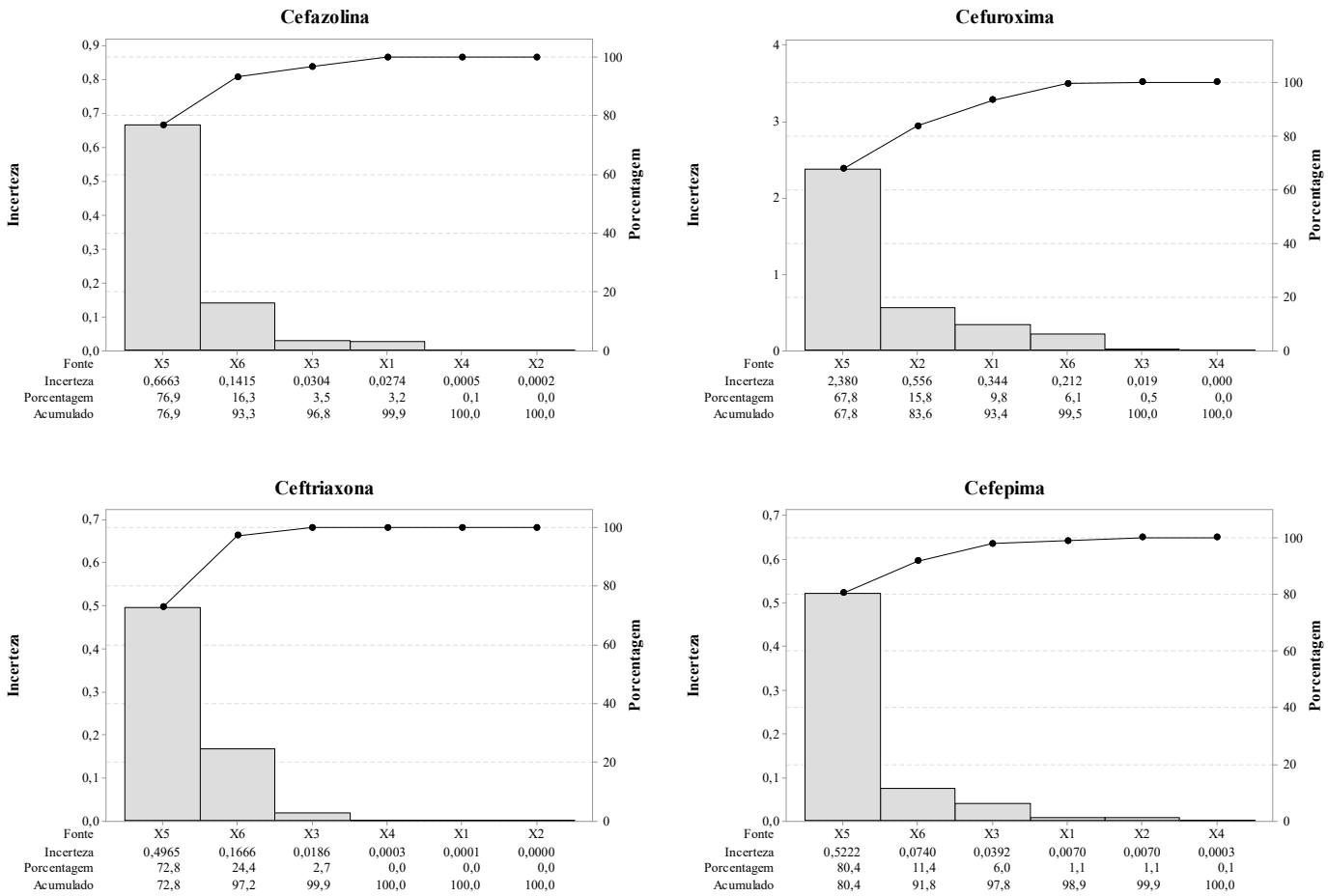


Figura 44. Gráficos de Pareto das fontes de incerteza associadas aos tamanhos dos halos de inibição de crescimento para cefazolina, cefuroxime, ceftriaxone e cefepime. Legenda: X1 = amino ácidos; X2 = extrato de carne; X3 = agar; X4 = concentração de antibiótico; X5 = proporção de inóculo; e X6 = período de pré-incubação. Adaptado de [49].

Saviano e Lourenço [50] propuseram método microbiológico rápido (*Rapid Microbiological Method* – RMM) para a determinação da potência de cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona e cefepima empregando cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como corante vital.

Empregando metodologia de superfície resposta (*RSM*), foi possível reduzir o tempo de incubação para apenas 5 horas e 30 minutos. Estudos adicionais ainda precisam ser conduzidos para avaliar o impacto da redução do tempo de incubação na incerteza associada ao método microbiológico rápido.

4.7.Doseamento microbiológico turbidimétrico/colorimétrico em microplacas

O doseamento microbiológico turbidimétrico para determinação da potência relativa de antibióticos é um ensaio que emprega tubos de ensaios contendo meio de cultura líquido previamente inoculado com microrganismo-teste, aos quais são adicionadas soluções padrão ou amostra de antibiótico em diferentes concentrações. Após incubação em condições adequadas, o crescimento microbiano ocorre inversamente proporcional a concentração de antibiótico, ou seja, quanto maior a concentração de antibiótico menor o crescimento microbiano.

A potência relativa do antibiótico na amostra é determinada a partir das medidas espectrofotométricas (usualmente entre 530 e 600 nm) de absorbância ou transmitância resultantes do crescimento microbiana nos tubos contendo soluções padrão e amostra. O emprego de indicadores de viabilidade microbiana, tais como o cloreto de trifeniltetrazólio, possibilitam que a detecção colorimétrica do crescimento microbiano, o que permite a redução do tempo de incubação necessário para obtenção das respostas [51, 52].

Alternativamente, o ensaio turbidimétrico pode ser realizado em microplacas, o que apresenta vantagens quanto ao reduzido volume de meio de cultura e soluções necessárias e, consequentemente ao reduzido volume de resíduos gerados, além da facilidade operacional e da leitura espectrofotométria pelo uso de leitoras/incubadoras de microplacas computadorizadas [53, 54, 55].

4.7.1. Doseamento microbiológico de linezolida em formas farmacêuticas

Saviano e colaboradores [56] propuseram um procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico colorimétrico em microplacas de linezolida em formas farmacêuticas.

O doseamento microbiológico de linezolida foi realizado empregando-se um delineamento experimental 3x3. As microplacas foram preparadas adicionando-se 20 µL de solução padrão (concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 µg/mL) ou solução amostra (concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 µg/mL) e 180 µL de médio de cultura nº3 inoculado com 10% de suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As microplacas foram incubadas a 37,0 ± 10ºC por 6 h. Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL de solução de cloreto de trifeniltetrzólio (TTC) a 0,5% (v/v). Após cerca de 10-15 minutos de agitação e incubação, as abosrbâncias foram medidas em 630 nm e os valores utilizados para cálculo da potência relativa de linezolida na forma farmacêutica.

O diagrama de causa-efeito apresentado na **Figura 45** relaciona as principais fontes de incerteza identificadas e utilizadas no estudo.

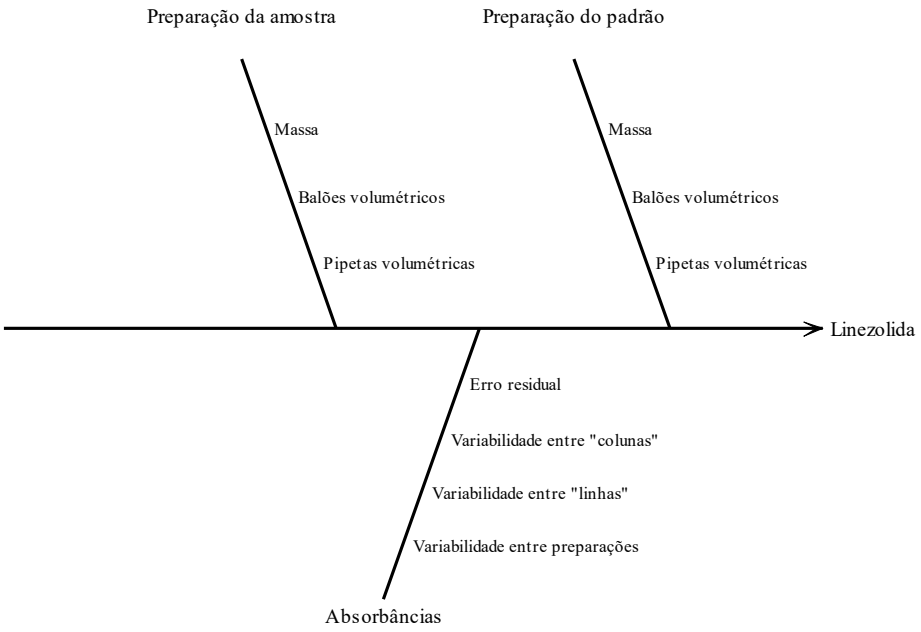


Figura 45. Diagrama de causa-efeito para identificação das fontes de incerteza de medição associada ao doseamento microbiológico colorimétrico em microplacas de linezolida em formas farmacêuticas. Adaptado de [56].

As fontes de incerteza foram quantificadas a partir dos certificados de calibração dos equipamentos utilizados ou determinadas experimentalmente como o desvio padrão de ensaios repetidos. A incerteza associada a variabilidade da resposta microbiológico, expressa como a incerteza associada as absorbâncias (u_M) contribuiu com cerca de 96% da incerteza total. Para simplificar o procedimento de cálculo da incerteza de medição associada a potência relativa de linezolida, as fontes de incerteza associadas as preparações das soluções padrão e amostra foram desconsideradas.

Desta forma, a potência relativa de linezolida e sua incerteza de medição foram calculadas de acordo com as equações (52) e (53), respectivamente

$$M = \frac{4\times(A3+A2+A1-S3-S2-S1)}{3\times(A3-A1+S3-S1)} \times log(2) \qquad \text{Eq. (52)}$$

$$IC_{95\%} = 10^{M \pm t_{5\%,gl_E} \times \sqrt{{s_E}^2/b^2}} \qquad \text{Eq. (53)}$$

O valor de ${s_E}^2 = SQ_E/gl_E$ é obtido a partir da análise de variância dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento. O valor de $b = \frac{(A3-A1+S3-S1)}{4} \times log(2)$ é a inclinação combinada das curvas padrão e amostra. A partir das equações (52) e (53), a potência relativa de caspofungina e sua respectiva incerteza expandida foi de 91,8% ± 8,2%.

4.8.Ensaio de LAL para detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas

As endotoxinas bacteriana são lipopolissacarídoes (LPS) provenientes de bactérias Gram negativas e se constituem na principal fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica. Sua presença em água de uso farmacêutico, matérias-primas, produtos parenterais e artigos médico-hospitalares é uma preocupação para as indústrias farmacêuticas, assim como para as agências regulatórias.

A detecção/quantificação de endotoxinas bacterianas em produtos farmacêuticos e biológicos pode ser realizada empregando-se métodos *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vivo* é um ensaio-limite que utiliza o coelho como modelo animal e baseia-se no efeito pirogênico (elevação de temperatura) dos LPS. Os métodos *in vitro* baseiam-se na

atividade de coagulação do lisato dos amebócitos do caranguejo Limulus (LAL), em função da presença de LPS. Podem ser empregados como ensaios qualitativos (do tipo "passa/não passa") ou quantitativos, dependendo do tipo de LAL empregado.

4.8.1. Detecção de LPS por gelificação de ponto final (*gel-clot*)

O procedimento mais simples e amplamente utilizado para a detecção de endotoxinas bacterianas é o teste LAL (*Limulis amebocyte lysate*) de gelificação de ponto final. As endotoxinas bacterianas ativam uma cascata enzimática que resulta na formação de gel. Neste teste, volume iguais de reagente LAL e solução amostra são misturados em tubos apirogênicos. Após incubação os tubos são avaliados quanto a presença (resposta positiva) ou ausência (resposta negativa) de formação de gel que se mantem após o tubo ser invertido a 180º.

O teste LAL é um ensaio qualitativo, do tipo "passa/não passa", sendo que a formação de gel indicar resposta positiva para a presença de endotoxinas bacterianas na amostra contendo quantidade igual ou superior à sensibilidade do reagente LAL (λ). A estimativa da incerteza para ensaios qualitativos é usualmente reportada como a probabilidade de resposta falsa, particularmente falsos-positivos e falsos-negativos [57].

Lourenço e colaboradores [58] estabeleceram procedimento para a estimativa de incerteza para o teste LAL de gelificação de ponto final, a partir dos resultados de validação do teste.

A validação do teste LAL foi realizada através da avaliação do efeito da amostra em inibir ou potencializar a reação de formação de gel, analisando-se soluções de amostras intencionalmente contaminadas com endotoxinas bacterianas na faixa de concentração entre 0,25λ e 4λ. Para o teste ser considerado válido, a média geométrica das concentrações de ponto final (concentração mais baixa em que houve formação de gel) deve estar em 0,5λ e 2λ. Adicionalmente, foram realizados testes para a confirmação da sensibilidade (λ) do reagente LAL.

Quando há inibição da formação de gel, ou seja, quando há endotoxinas bacterianas em quantidade suficiente para ocorrer a formação de gel, porém a amostra impede sua formação, tem-se um resultado falso-negativo. Por outro-lado, quando há potencialização da formação de gel, ou seja, quando ocorre formação de gel mesmo sem

haver quantidade suficiente de endotoxinas bacterianas, tem-se um resultado falso-positivo.

Além disso, o teste LAL de gelificação de ponto final foi avaliado quanto a sua sensibilidade (habilidade de detectar uma amostra contaminada com endotoxinas bacterianas como resposta positiva) e especificidade (habilidade de detectar uma amostra não contaminada com endotoxina como resposta negativa). Os dados para a estimativa das probabilidades de resultados falso-positivos e falso-negativos, assim como os valores de sensibilidade e especificidade estão apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26. Tabela de contingência com os dados para a estimativa das probabilidades de resultados falso-positivos, falso-negativos, valores de sensibilidade e especificidade.

Teste LAL \ Amostra	Presença de endotoxina $(+)$	Ausência de endotoxina $(-)$	Total
Teste LAL positivo $(+)$	A	B	$A+B$
Teste LAL positivo $(-)$	C	D	$C+D$
Total	$A+C$	$B+D$	$A+B+C+D$

Adaptado de [58].

Com base nos dados da **Tabela 26**, é possível determinar as probabilidades de resultados falso-positivos (P_{F+}), falso-negativos (P_{F-}), valores de sensibilidade (S) e especificidade (E), de acordo com o teorema de Bayes, pelas equações (54), (55), (56) e (57), respectivamente.

$$P_{F+} = \frac{B}{A+B} \qquad \text{Eq. (54)}$$

$$P_{F-} = \frac{C}{C+D} \qquad \text{Eq. (55)}$$

$$S = \frac{A}{A+C} \qquad \text{Eq. (56)}$$

$$E = \frac{D}{B+D} \qquad \text{Eq. (57)}$$

A partir dos dados de confirmação da sensibilidade do reagente LAL e da validação do teste LAL quanto ao efeito da amostra na inibição ou potencialização da formação do gel, e empregando-se as equações (45) a (48), foram determinados os resultados das probabilidades de resultados falso-positivos (P_{F+}), falso-negativos (P_{F-}), valores de sensibilidade (S) e especificidade (E), apresentados na **Tabela 27**.

Tabela 27. Resultados das probabilidades de resultados falso-positivos (P_{F+}), falso-negativos (P_{F-}), valores de sensibilidade (S) e especificidade (E) para a confirmação da sensibilidade do reagente LAL e para a validação do teste LAL.

	P_{F+}	P_{F-}	S	E
Confirmação da sensibilidade do LAL	0,11	0,00	1,00	0,88
Validação do teste LAL	0,00	0,08	0,97	1,00

Adaptado de [58].

Considerando a confirmação da sensibilidade do LAL e a validação do teste LAL, a probabilidade de um resultado estar errado corresponde a soma das probabilidades de respostas falso-positivas e falso-negativas. Levando-se em conta que, durante a aplicação do teste LAL na rotina, cada solução usualmente é testada em duplicata, as probabilidades de respostas falso-positivas e falso-negativas devem ser elevadas ao quadrado. Portanto, a incerteza do teste LAL pode ser estimada conforme a equação (58).

$$U = \left({P_{F+/\lambda}}^2 + {P_{F-/\lambda}}^2 + {P_{F+/V}}^2 + {P_{F-/V}}^2\right) \times 100 \qquad \text{Eq. (58)}$$

Aplicando-se os dados da **Tabela 27** na equação (58), temos que a incerteza para o teste LAL foi de 1,8%, ou seja, existem uma probabilidade de 1,8% do resultado do teste estar errado. Considerando-se o valor da incerteza total (1,8%), cerca de 67,6% (equivalente a 1,2%) corresponde à confirmação da sensibilidade do reagente LAL, enquanto que validação do teste LAL correspondeu a 32,4% (equivalente a 0,6%) da incerteza total. A maior contribuição da etapa de confirmação de sensibilidade do LAL deve-se ao número reduzido de réplicas (total de 16 tubos) em comparação à validação do teste LAL (total 48 tubos).

O teste LAL requer condições ótimas de pH (entre 6,0 e 8,0), temperatura (37 ± 1ºC) e tempo de incubação (60 ± 2 min). Alterações de pH podem afetar a estrutura

tridimensional das enzimas constituintes do reagente LAL, o que pode levar a perda de sua atividade enzimática. Alterações de temperatura podem resultar em diferentes efeitos, como alterar a energia envolvida nas colisões moleculares, alterar o número de colisões, assim como pode levar a uma diminuição da atividade enzimática. O tempo de incubação pode também afetar a formação do gel, uma vez que o teste LAL é baseado numa reação enzimática.

Lourenço e colaboradores [59] estudaram como as alterações de pH (entre 6,0 e 8,0), temperatura (entre 36 e 38ºC) e tempo de incubação (entre 58 e 62 min) afetam a ocorrência de respostas falso-positivas e falso-negativas no teste LAL de gelificação de ponto final.

As probabilidades de respostas falso-positivas obtidas em condições alteradas de pH (6,0 ou 8,0), temperatura de incubação (36 ou 38ºC) e tempo de incubação (58 ou 62 min) foram comparadas com àquelas obtidas em condições ideais (pH 7,0, 37ºC, 60 min). Os riscos relativos foram calculados a partir destas probabilidades. Notou-se que pequenas mudanças de pH reduzem em cinco vezes a frequência de respostas positivas verdadeiras. Este fato pode ser explicado devido ao efeito do pH na estrutura tridimensional das enzimas constituintes do reagente LAL. Diluições e neutralização ácida/alcalina podem ser empregadas para resolver este problema. A temperatura e tempo de incubação parecem afetar a frequência de respostas positivas verdadeiras de forma menos significativa, apresentando riscos relativos de 1,5 e 1,0, respectivamente.

As alterações de pH, temperatura e tempo de incubação afetam as probabilidades de resultados falso-positivos e falso-negativos e, consequentemente afetam a incerteza do teste LAL. De acordo com nossos resultados, pequenas diferentes no pH (entre 6,0 e 8,0) aumentaram a incerteza do teste LAL para 7,6%. As incertezas obtidas em condições alteradas de temperatura (incerteza de 2,0%) e tempo de incubação (incerteza de 1,0%), foram similares àquela obtidas em condições ideais (incerteza de 1,0%).

4.8.2. Quantificação de LPS pelo método cromogênico de ponto final

Embora o teste LAL de gelificação de ponto final seja o mais comumente utilizado, sendo adotado como teste de referência, outros métodos para a quantificação de endotoxinas bacterianas baseadas na ativação da cascata enzimática do LAL podem ser empregados, tais como os métodos turbidimétricos e cromogênicos.

O método cromogênico baseia-se na clivagem de substrato cromogênico em função da ação amidase da enzima de coagulação ativada. A clivagem do substrato cromogênico leva a formação de p-nitroanilina, substância de coloração amarela, proporcionalmente a concentração de endotoxina bacteriana. Desta forma, é possível quantificar as endotoxinas bacterianas por meio da formação de p-nitroanilina, quantificada por absorbância em 405 nm.

No teste cromogênico de ponto final, volumes iguais de reagente LAL e solução amostra são misturados e pré-incubados por 10 minutos a 37ºC. Em seguida, adiciona-se solução de substrato cromogênico e a mistura é incubada por 6 minutos. A reação é interrompida e a densidade óptica é medida em 405 nm. As leituras de densidade óptica da solução amostra são interpoladas contra uma curva-padrão com concentrações de endotoxina bacteriana na faixa de 0,1 a 1 EU/mL. Amostram intencionalmente contaminadas com quantidade conhecida de endotoxina são utilizadas para verificar a validade do teste. Controle negativo também deve ser empregado.

Ostronoff e Lourenço [60] estudaram o efeito do tempo de incubação na liberação de p-nitroanilina no teste LAL cromogênico de ponto final e, consequentemente, como a incerteza de medição do teste LAL é afetada por estes fatores.

Metodologia de superfície resposta (RSM) foi utilizada para se estabelecer como as absorbâncias medidas em decorrência da liberação de p-nitroanilina (Y1) foram afetadas pelo tempo de incubação após a adição reagente LAL (X1, entre 8 e 12 min) e pelo tempo de incubação após a adição de solução de substrato cromogêncio (X2, entre 5 e 7 min). O gráfico 3D que explica a quantidade de liberação de p-nitroanilina (Y1) em função do tempo de incubação após a adição reagente LAL (X1) e do tempo de incubação após a adição de solução de substrato cromogêncio (X2) está apresentado na **Figura 46**.

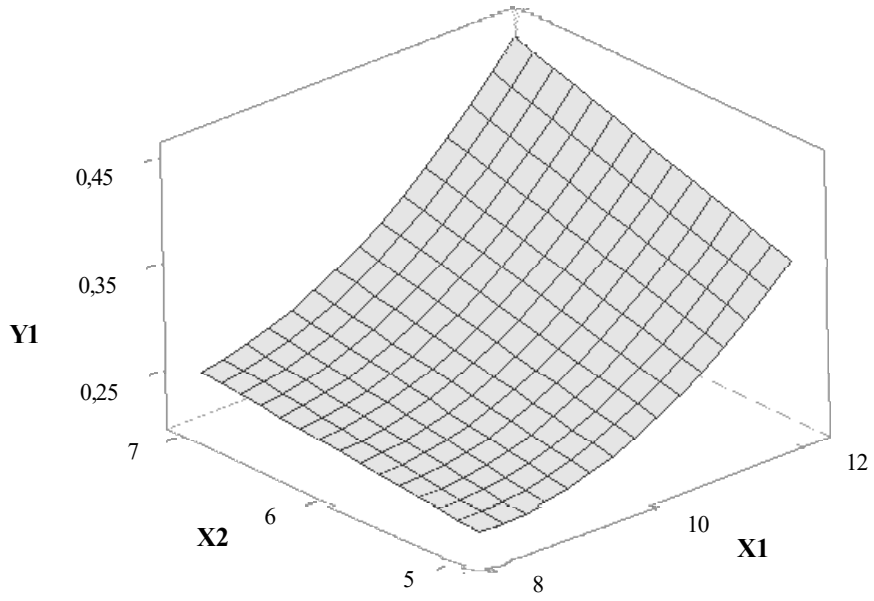


Figure 46. Gráfico 3D que explica a quantidade de liberação de p-nitroanilina (Y1) em função do tempo de incubação após a adição de reagente LAL (X1) e do tempo de incubação após a adição de solução de substrato cromogêncio (X2) para o teste LAL cromogênico de ponto final. Adaptado de [60].

Quantidades significativamente aumentadas de p-nitroanilina liberada (Y1) foram observados quando o tempo de incubação após a adição do LAL (X1) é aumentado (**Figure 46**). Semelhantemente, o aumento no tempo de incubação após a adição do substrato cromogênico (X2) também provoca um aumento significativo na quantidade de p-nitroanilina liberada (Y1) (**Figure 46**). Adicionalmente, pode-se notar uma leve interação entre os tempos de incubação após a adição do LAL (X1) e após a adição do substrato cromogênico (X2) (**Figure 46**).

Simulações de Monte Carlo (50.000 simulações) foram realizadas para estimar a incerteza de medição associada ao teste LAL cromogênico de ponto final, com base nos resultados da metodologia de superfície resposta (RSM). Com base em nossa experiência do tempo necessário para a adição do reagente LAL e da adição da solução de substrato cromogênico, a incerteza padrão associada ao tempo de incubação foi considerada como sendo cerca de 1 min. Optou-se por expressar a incerteza de medição como intervalo de confiança, uma vez que os dados obtidos na simulação de Monte Carlo apresentaram distribuição assimétrica, não ajustada a distribuição normal. A incerteza de medição

(intervalo com 95% de confiança) para o resultado do teste LAL cromogênico de ponto final foi entre 0,105 e 0,141 UE/mL ou de 90 a 120% do valor central (0,116 UE/mL).

4.8.3. Quantificação de LPS pelo método cromogênico cinético

O ensaio cromogênico para quantificação de endotoxinas bacterianas pode ser realizado como um ensaio cinético, no qual as medidas de densidade óptica são avaliadas continuamente ao longo do tempo de reação. O tempo de reação indica o tempo necessário para liberação de p-nitroanilina em quantidade suficiente para que ocorra um incremento de densidade óptica. O tempo de reação é inversamente proporcional a concentração de endotoxina, ou seja, quanto maior a concentração de endotoxinas bacterianas menor o tempo de reação.

Volumes iguais (100 µL) de soluções-teste (padrão de endotoxinas bacterianas ou amostra) e reagente LAL são adicionados à microplaca, que será incubada a 37ºC por cerca de 40 a 60 minutos. A incubação ocorre em equipamento que permita a leitura das absorbâncias a cada 2 min. O tempo de reação de cada solução-teste é determinado como o tempo necessário para que ocorra um incremento de 0,200 UA em função da liberação de p-nitroanilina. Uma curva-padrão é obtida plotando-se os tempos de reação em função das concentrações de endotoxinas bacterianas na faixa de 0,05 a 50 EU/mL. As concentrações de endotoxinas bacterianas das amostras são determinadas pela interpolação dos tempos de reação das soluções-teste frente a curva-padrão obtida.

Ostronoff e Lourenço [60] estudaram o efeito dos volumes de solução-teste e de reagente LAL na liberação de p-nitroanilina no teste LAL cinético cromogênico e, consequentemente, como a incerteza de medição do teste LAL é afetada por estes fatores.

Metodologia de superfície resposta (RSM) foi utilizada para se estabelecer como os tempos de reação para liberação de p-nitroanilina (Y2) foram afetados pelo volume de solução-teste (X3, entre 85 e 115 µL) e pelo volume de reagente LAL (X4, entre 85 e 115 µL). O gráfico 3D que explica o tempo de reação (Y2) em função do volume de solução-teste (X3) e do volume de reagente LAL (X4) está apresentado na **Figura 47**.

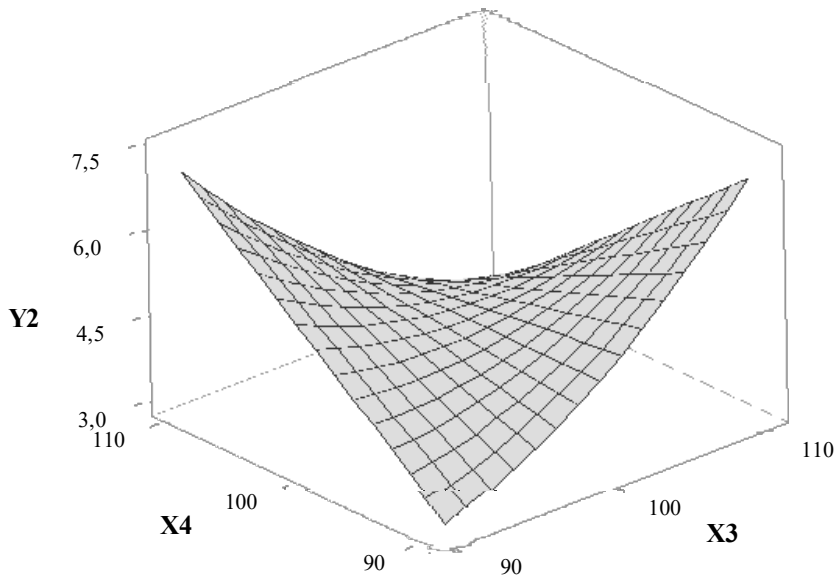


Figure 47. Gráfico 3D que explica o tempo de reação (Y2) em função do volume de solução-teste (X3) e do volume de reagente LAL (X4) para o teste LAL cinético cromogênico. Adaptado de [60].

Aparentemente, parece que o tempo de reação (Y2) não é significativamente afetado pelos volumes de solução-teste (X3) e de reagente LAL (X4), quando avaliados isoladamente (**Figure 47**). Entretanto, existe forte interação entre estas variáveis (X3 e X4), que afeta significativamente o tempo de reação (**Figure 47**). Estes resultados indicam que a proporção entre os volumes de solução-teste (X3) e de reagente LAL afetam significativamente o tempo de reação e, consequentemente, a quantificação de endotoxinas bacterianas pelo teste LAL cinético cromogênico.

No teste LAL cinético cromogênico, a liberação de p-nitroanilina será mais rápida quanto maior for a concentração de endotoxinas bacterianas na solução-teste. A quantificação de endotoxinas bacterianas é baseada no tempo de reação da solução amostra em comparação aos tempos de reação da curva-padrão. Misturando-se volumes iguais de solução-teste (X3) e de reagente LAL (X4), a liberação de p-nitroanilina terá uma determinada velocidade que não é afetada pelo volume total. Entretanto, se volumes diferentes são empregados, a velocidade de liberação de p-nitroanilina será afetada (**Figure 47**).

Simulações de Monte Carlo (50.000 simulações) foram realizadas para estimar a incerteza de medição associada ao teste LAL cromogênico de ponto final, com base nos resultados da metodologia de superfície resposta (RSM). Com base nos certificados de calibração das micropipetas utilizadas no estudo, as incertezas padrão associadas aos volumes de solução-teste e de reagente LAL foram consideradas como sendo cerca de 1 μL. Optou-se por expressar a incerteza de medição como intervalo de confiança, uma vez que os dados obtidos na simulação de Monte Carlo apresentaram distribuição assimétrica, não ajustada a distribuição normal. A incerteza de medição (intervalo com 95% de confiança) para o resultado do teste LAL cromogênico cinético foi entre 0,49 e 0,69 UE/mL ou de 90 a 127% do valor central (0,54 UE/mL).

5. Aplicações da incerteza de medição

5.1. Gerenciamento de risco de decisões quanto à conformidade

Muitas decisões importantes na indústria farmacêutica são baseadas nos resultados analíticos obtidos pelo laboratório de controle de qualidade. A incerteza de medição é um bom indicador da qualidade destes resultados analíticos e deve ser considerada na comparação do mesmo contra as especificações. Quando o resultado analítico estiver próximo ao limite de especificação, a decisão quanto à avaliação de conformidade (ou não-conformidade) pode ser afetada pela incerteza de medição [61, 62, 63].

Usualmente, devemos considerar quatro situações distintas: a) quando e resultados analítico e sua incerteza de medição estiverem dentro do intervalo de especificação (**Figura 48A**); b) quando o resultado analítico estiver dentro do intervalo de especificação, porém o intervalo da incerteza de medição ultrapassa o limite de especificação (**Figura 48B**); c) quando o resultado analítico estiver fora do intervalo de especificação, porém o intervalo da incerteza está dentro do intervalo de especificação (**Figura 48C**); e d) quando o resultado analítico e sua incerteza de medição estiverem fora do intervalo de especificação (**Figura 48D**).

Nas situações representadas nas **Figura 48 A** e **D**, as decisões de conformidade e não-conformidade as especificações, respectivamente, são evidentes. Porém, nas situações representadas nas **Figura 48 B** e **C**, a decisão quanto à conformidade envolve o risco de aprovar um lote fora de especificação (risco do consumidor) ou reprovar um lote dentro de especificação (risco do produtor).

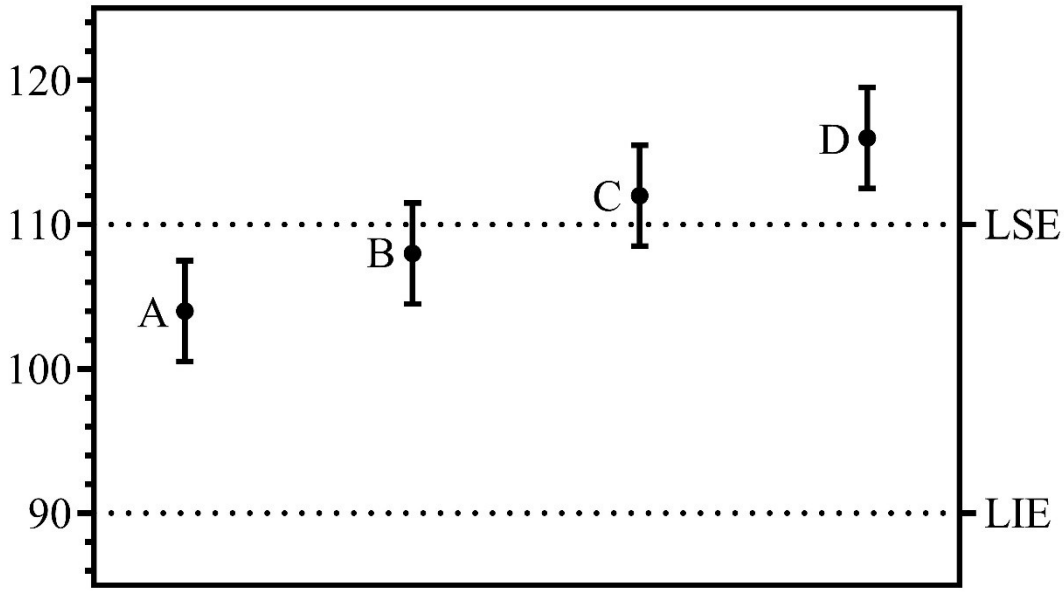


Figure 48. Decisão quanto à avaliação de conformidade (ou não-conformidade) com base na incerteza de medição, considerando-se quatro situações distintas: (A) conforme; (B) risco do consumidor (aprovar um lote fora de especificação); (C) risco do produtor (reprovar um lote dentro de especificação); e (D) não-conforme. Legenda: LIE = limite inferior de especificação e LSE = limite superior de especificação. Adaptado de [16].

A incerteza de medição é uma ferramenta útil para auxiliar na tomada de decisão quando a conformidade ou não-conformidade de produtos farmacêuticos em processo ou terminados. A incerteza de medição não substitui a validação do método analítico, mas fornece informação sobre a qualidade do resultado analítico. Se a incerteza de medição não é conhecida, a informação fornecida pelo resultado analítico é incompleta e, consequentemente, a tomada de decisão fica prejudicada.

Separovic e colaborabores estimaram os riscos de decisões errôneas quanto a avaliação de conformidade (ou não-conformidade), devido a incerteza de medição, para comprimidos contendo amoxicilina.

Foram analisados 45 lotes de comprimidos contendo 500 mg de amoxicilina, empregando-se cromatografia líquida (HPLC). Os lotes apresentaram resultados entre 95,4 e 102,1%, atendendo a especificação regulatória (LIE = 95% e LSE = 105%). O processo produtivo apresentou um índice de capacidade (Cpk) de 1,2 (**Figura 49**), com média de 98,3% e desvio padrão 1,4%. Durante o período avaliado, o processo produtivo esteve sob controle, com todos os lotes dentro dos limites entre 95,0 e 102,3% ($x \pm 3s$).

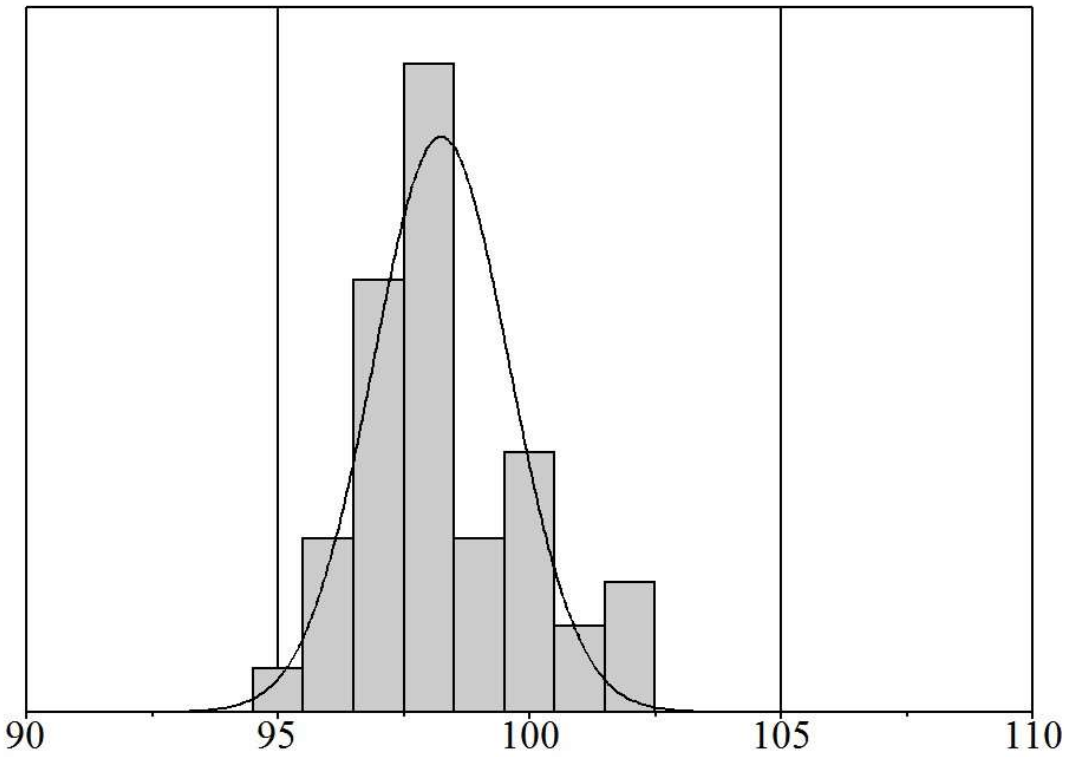


Figure 49. Histograma do conteúdo de amoxicilina em comprimidos, obtido a partir dos dados históricos (45 lotes). Limites de especificação: 95 a 105%. Adaptado de [41].

A capacidade do sistema de medição foi avaliada pela estimativa da incerteza de medição associada a quantificação de amoxicilina por HPLC em comprimidos. As principais fontes de incerteza e o procedimento de cálculo estão descritos no item 4.2.4 deste trabalho. As incertezas combinada e expandida foram 1,05% e 2,11%, respectivamente, adotando-se um fator de abrangência $k = 2{,}0$. O valor de $U/T\%$ para o método cromatográfico foi de 42%, o que é maior que o recomendado no Guia Eurachem.

A incerteza de medição é uma ferramenta útil na avaliação de conformidade baseada no gerenciamento de risco. Reavaliando os resultados analíticos obtidos para os 45 lotes, verificamos que um número considerável de lotes (13 em 45, ou seja, 29% dos lotes) podem ter sido aprovados erroneamente, conforme apresentado na **Figura 50**. Em outras palavras, os riscos do consumidor e do produtor podem ser significativamente altos. Esta é uma preocupação para os consumidores, pois um lote fora de especificação erroneamente aprovado oferece risco a saúde, uma vez que tem sua eficácia e segurança

comprometidas. Por outro lado, o produtor deve estar preocupado quanto a erroneamente reprovar um lote dentro das especificações, devido aos prejuízos financeiros e materiais.

Os riscos do consumidor e do produtor foram estimados empregando-se o método de simulações de Monte Carlo. A partir dos dados históricos do processo (45 lotes analisados), foram gerados 100.000 lotes virtuais com média 98,27% e desvio padrão 1,37%. Em seguida, foram gerados 100.000 resultados analíticos virtuais, com base no conteúdo de cada lote virtual simulado e na incerteza de medição ($u = 1{,}05\%$) do método cromatográfico. Ambas as simulações foram realizadas assumindo-se distribuição normal dos dados.

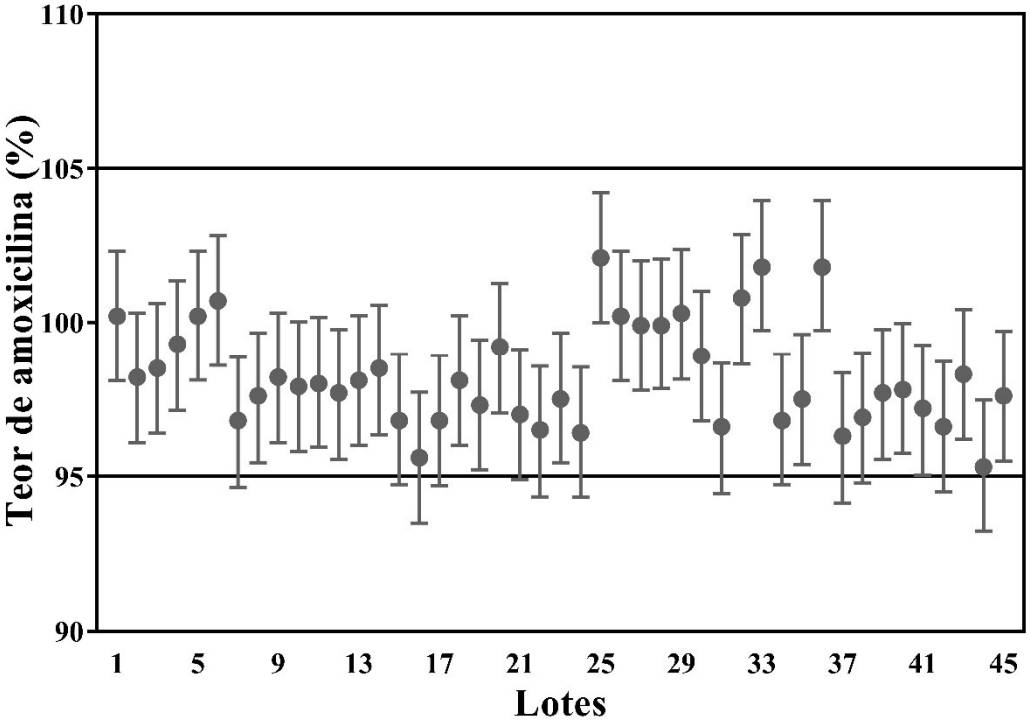


Figure 50. Resultados analíticos e suas respectivas incertezas de medição para o conteúdo de amoxicilina em comprimidos (45 lotes). Limites de especificação: 95 a 105%. Adaptado de [41].

O gráfico de dispersão do conteúdo de amoxicilina nos lotes simulados *vs.* resultados analíticos simulados está apresentado na **Figura 51**. A **Tabela 28** apresentado um resumo dos dados obtidos. A maioria dos lotes simulados estão dentro de especificação (99.191 em 100.000), entretanto alguns destes lotes tiveram resultado analítico fora das especificações (2.339 em 99.196). Por outro lado, poucos lotes

simulados estão fora de especificação (804 em 100.000), entretanto alguns destes lotes tiveram resultado analítico dentro das especificações (281 em 804).

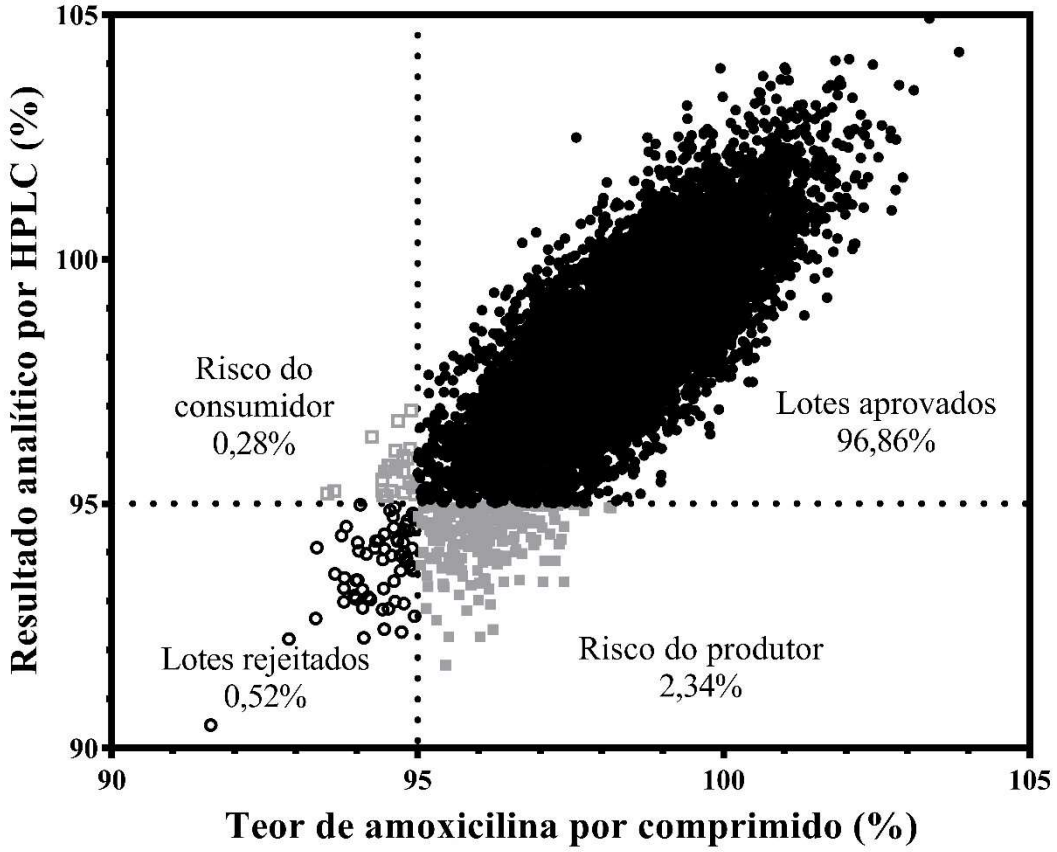


Figure 51. Gráfico de dispersão do conteúdo de amoxicilina nos lotes simulados *vs.* resultados analíticos simulados. Limites de especificação: 95 a 105%. Adaptado de [41].

Tabela 28. Tabela de contingência com os dados para a estimativa dos riscos do consumidor e do produtor.

Lote simulado / Resultado	Aprovado	Reprovado	Total
Dentro de especificação	96.857 (A)	2.339 (B)	99.196 ($A + B$)
Fora de especificação	281 (C)	523 (D)	804 ($C + D$)
Total	97.138 ($A + C$)	2.862 ($B + D$)	100.000 ($A + B + C + D$)

Adaptado de [41].

Os riscos do consumidor (R_C) e do produtor (R_P) foram estimados empregando-se as equações (59) e (60).

$$R_C = \frac{C}{A+B+C+D} = \frac{281}{100.000} = 0{,}28\% \qquad \text{Eq. (59)}$$

$$R_P = \frac{B}{A+B+C+D} = \frac{2.339}{100.000} = 2{,}34\% \qquad \text{Eq. (60)}$$

Podemos notar que o risco do produtor ($R_P = 2{,}34\%$) foi significativamente maior que o risco do consumidor ($R_P = 0{,}28\%$). Duas estratégias podem ser adotadas para reduzir os riscos do consumidor e de produtor: a) melhorar a capacidade do processo (aumentando-se o valor de Cpk, por exemplo, promovendo alterações no processo com a finalidade de mover a média do processo para o alvo ou de reduzir a variabilidade do processo); e b) melhorar o sistema de medição (reduzindo-se o valor de U/T, por exemplo: aumentando-se o número de determinações de cada lote ou reduzindo-se a incerteza combinada). Ferramentas de planejamento de experimentos (*Design of Experiments* – DoE), tais como planejamentos fatoriais, planejamentos de mistura, e delineamentos de compósito central (*Central Composite Design* – CCD) podem ser úteis na otimização da performance tanto do processo produtivo quanto do método analítico.

5.2.Comparação de métodos analíticos

Os métodos analíticos empregados no controle de qualidade de medicamentos devem ser validados segundo os critérios de guias nacionais e internacionais. Porém, ainda que um método atenda aos critérios de validação exigidos, é possível que seu desempenho não seja bom o suficiente para sua aplicação na avaliação de conformidade. A incerteza de medição indica a qualidade do resultado analítico e, consequentemente, permite a comparação de diferentes métodos analíticos.

A **Tabela 29** apresenta os resultados de validação, assim como as incertezas de medição para 4 métodos analíticos para quantificação de linezolida em formas farmacêuticas: a) método espectrofotométrico de absorção no UV [14]; b) método cromatográfico [12]; c) doseamento microbiológico por difusão em agar [47]; e d) doseamento microbiológico colorimétrico em microplaca [56].

Tabela 29. Resultados da validação de métodos para quantificação de linezolida em formas farmacêuticas e suas respectivas incertezas de medição.

Parâmetro	Critério	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4
Linearidade	$R^2 \geq 0{,}98$	0,999	0,999	0,995	0,992
Especificidade	De acordo	De acordo	De acordo	De acordo	De acordo
Precisão	RSD ≤ 5,0%	0,6%*	1,1%**	2,8%**	4,9%**
Exatidão	95 ≤ Rec ≤ 105%	99,9%	98,6%	102,7%	101,4%
Incerteza de medição	$u^T \leq 1{,}25\%$	1,06%	1,25%	1,55%	4,10%

Método 1: espectrofotometria de absorção no UV [14]; Método 2: UPLC [12]; Método 3: doseamento microbiológico por difusão em agar [47]; e Método 4: doseamento microbiológico colorimétrico em microplacas [56]. *precisão intermediária e **repetibilidade + precisão intermediária.

Podemos notar que, apesar de todos os métodos analíticos propostos atenderem as exigências quanto a validação de métodos, apenas os métodos espectrofotométrico por absorção no UV e UPLC apresentam incerteza padrão combinada (u =1,06% e u =1,25%, respectivamente) abaixo da incerteza padrão alvo (u^T =1,25%).

Os métodos microbiológicos por difusão em agar e colorimétrico em micriplacas apresentam incerteza padrão combinada (u =1,55% e u =4,10%, respectivamente) superior a incerteza padrão alvo (u^T =1,25%), o que indica que estes métodos analíticos não são adequados para a avaliação de conformidade. Os valores elevados de incerteza de medição dos métodos microbiológicos podem ser explicados pela alta variabilidade da resposta biológica.

Uma forma de reduzir a incerteza expandida final associada ao resultado analítico é aumentar o número de réplicas utilizadas; por exemplo, se a determinação da potência relativa for realizada em 4 amostras independentes, as incertezas padrão combinadas serão $u_{n=4} = 1{,}55\%/\sqrt{4}$ =0,78% e $u_{n=4} = 4{,}10\%/\sqrt{4}$ =2,05%, para os ensaios de difusão em agar e colorimétrico em microplacas, respectivamente.

5.3.Estudos de estabilidade e degradação forçada

A incerteza de medição também pode ser útil na investigação de resultados fora de especificação em estudos de estabilidade de medicamentos [64]. O empregado de *guard-bands* (limites de especificação que levam em consideração a incerteza de

medição) podem auxiliar na avaliação de conformidade quando o valor medido está reduzindo (por exemplo, degradação da substância ativa) ou aumentando (por exemplo, formação de um determinado produto de degradação) ao longo do tempo. Esta abordagem pode fornecer informações úteis para a estimativa do prazo de validade do medicamento, assim como os riscos do consumidor e do produto associados a esta estimativa.

Foram realizados estudos de degradação forçada de caspofungina em formas farmacêuticas, empregando-se método cromatográfico [11] e doseamento microbiológico [8]. Os resultados da quantificação de caspofungina ao longo dos 120 minutos de estudo estão apresentados na **Figura 52**. Em ambos os estudos, a caspofungina apresentou cinética de degradação de primeira ordem.

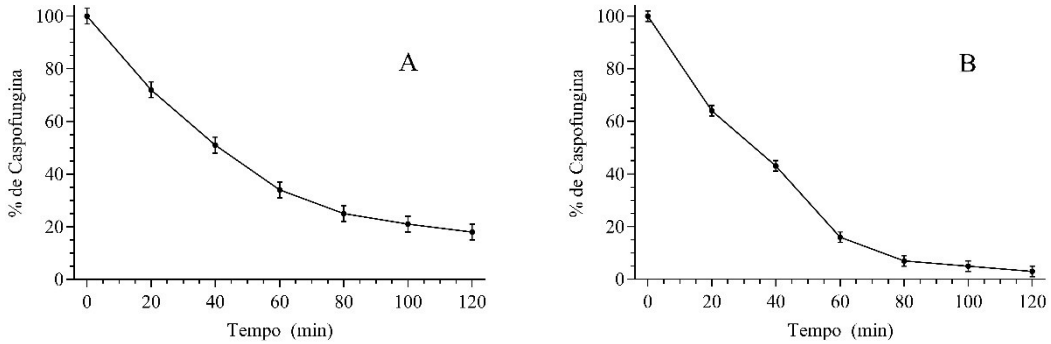


Figure 52. Gráficos de degradação forçada de caspofungina determinada pelo método cromatográfico (A) [11] e por doseamento microbiológico (B) [8].

A incerteza de medição permite constatar diferença significativa entre os resultados analíticos ao longo dos 120 minutos. Por exemplo, podemos perceber que os resultados analíticos da quantidade de caspofungina são significativamente diferentes ao longo dos primeiros pontos do estudo (até cerca de 60 minutos). Por outro lado, a partir de cerca de 80 minutos de degradação, os resultados analíticos da quantificação de caspofungina não apresentam diferença significativa.

Valores de incerteza elevados não permitirão constatar diferença entre os resultados analíticos ao longo do tempo do estudo, o que pode resultar numa estimativa de estabilidade (ou prazo de validade) inadequada. Ainda são necessários estudos adicionais para determinar como a incerteza de medição impacta na estimativa do prazo de validade de medicamentos e qual o valor de incerteza alvo recomendado.

5.4.Estudos de equivalência farmacêutica

A equivalência farmacêutica é uma etapa importante para a confirmação de similaridade e intercambialidade entre medicamentos genéricos, similares e referência, particularmente para aqueles medicamentos que não serão submetidos a estudos de bioequivalência ou biodisponibilidade relativa. Lourenço e Pinto [65] compararam os testes t-Student convencional e o teste t-Student duplo unicaudal (Two one-sided t-Test) para semelhança na avaliação da equivalência farmacêutica entre medicamentos genéricos, similares e referência de aciclovir creme, sulfato de atropina solução injetável, meropenem pó para solução injetável e metronidazol solução injetável. O uso da incerteza de medição na avaliação de equivalência farmacêutica por ser uma alternativa ao TOST, uma vez que a incerteza de medição permite comparar os medicamentos teste (genérico o similar) e referência entre si e contra as especificações regulatórias.

Okamoto e colaboradores [13] estabeleceram procedimento para a estimativa da incerteza de medição associada a quantificação de metronizadol em solução injetável por HPLC e aplicaram a incerteza estimada na avaliação de equivalência farmacêutica. A tomada de decisões quanto a equivalência farmacêutica (ou não) com base na incerteza de medição foi compatível àquela obtida pelo TOST.

Francisco e colaboradores [33] avaliaram a equivalência terapêutica *in vitro* de preparações oftálmicas contendo ciprofloxacino com base na incerteza de medição e em simulações de Monte Carlo.

De acordo com os requisitos regulatórios, duas preparações oftálmicas podem ser consideradas equivalentes se ambas atenderem às especificações para os testes indicados em sua monografia e se não apresentarem diferença maior que 10% em relação ao volume da gota, realizado de acordo com o teste de gotejamento da farmacopeia brasileira.

Foram realizadas simulações de Monte Carlo, possibilitando a comparação entre os medicamentos por meio da razão das doses efetivamente administrada para o medicamento teste e de referência, com base nas incertezas de medição associadas à quantificação de ciprofloxacino, à densidade (gravidade específica) e à massa média da gota (teste de gotejamento).

De acordo com os resultados obtidos no estudo, pequenas diferenças entre os medicamentos teste e referência no que diz respeito aos conteúdos de ciprofloxacino ou aos volumes das gotas não afetam a razão das doses efetivamente administrada. Ou seja, nesta situação os medicamentos teste e referência podem ser considerados equivalentes,

conforme apresentado na **Figura 53 A**. Entretanto, se os medicamentos teste e referência apresentarem diferenças simultâneas para os conteúdos de ciprofloxacino e para os volumes das gotas, a razão das doses efetivamente administrada será afetada significativamente. Em outras palavras, nesta situação os medicamentos teste e referência podem não ser equivalentes, conforme apresentado na **Figura 53 B**.

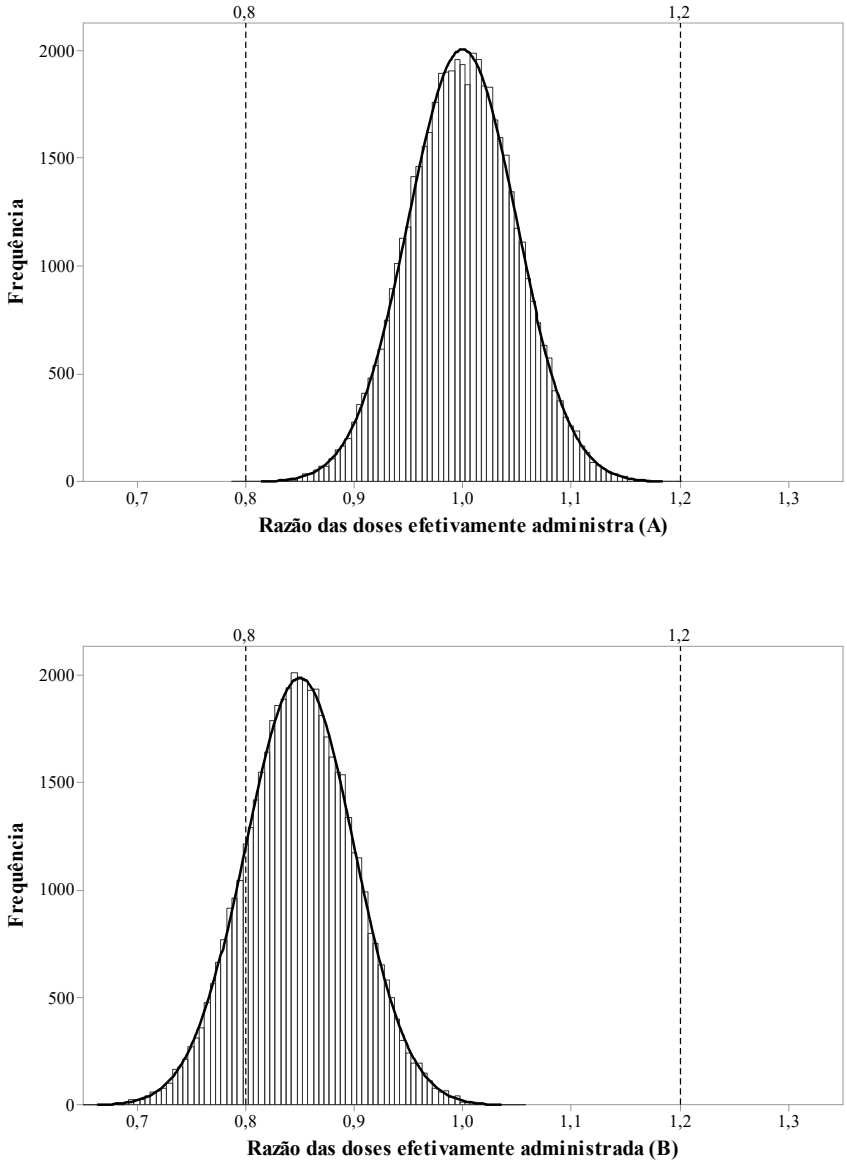


Figura 53. Histogramas obtidos para as 50.000 simulações de Monte Carlo para a razão das doses de ciprofloxacino efetivamente administrada para os medicamentos teste e referência, quando existem pequenas diferenças entre os medicamentos teste e referência no que diz respeito aos conteúdos de ciprofloxacino ou aos volumes das gotas (A) ou quando existem diferenças simultâneas para os conteúdos de ciprofloxacino e para os volumes das gotas (B). Adaptado de [33].

Até o presente momento, o uso da incerteza de medição ficou restrito à avaliação de conformidade quanto a um único parâmetro (por exemplo, a quantificação do princípio ativo na forma farmacêutica). Entretanto, seu uso pode abranger simultaneamente diversos parâmetros de qualidade considerados durante um estudo de equivalência farmacêutica, tais como o teste de uniformidade de doses unitárias, pH, ensaios microbiológicos, dentre outros. Desta forma, as incertezas de medição associadas aos testes e ensaios realizados durante o estudo de equivalência farmacêutica podem ser aplicadas na estimativa do risco de decisão errônea quanto a equivalência farmacêutica (ou não) entre os medicamentos teste (genérico ou similar) e referência.

6. Considerações finais e perspectivas futuras

Os estudos apresentados ao longo deste texto sistematizado evidenciam a importância da estimativa da incerteza de medição e sua aplicação nas análises farmacêuticas. Os primeiros estudos realizados por nosso grupo de trabalho foram relacionados a quantificação de linezolida em formas farmacêuticas por métodos espectrofotométrico de absorção no UV, método cromatográfico e doseamento microbiológico (FAPESP 2011/51686-4).

Os estudos relacionados a identificação e quantificação da incerteza de medição foram ampliados, abrangendo-se outros testes e ensaios usualmente aplicados na avaliação de qualidade de medicamentos, tais como o teste de dissolução, teste de gotejamento, testes de detecção de endotoxinas bacterianas, dentre outros. Em sua grande parte, os estudos consideraram a análise de formas farmacêuticas contendo antibióticos, antibacterianos e antifúngicos (FAPESP 2013/10743-0).

Recentemente, reconhecendo a importância da incerteza de medição na avaliação de conformidade, nosso grupo de trabalho tem investigado a estimativa dos riscos do consumidor e produtor como forma de avaliar a adequação ao uso de métodos analíticos. Além disso, o conceito de Qualidade por Design Analítico (AQbD) tem sido empregado como estratégia para a redução da incerteza de medição, assim como para o desenvolvimento, otimização e validação de método (FAPESP 2017/04539-2).

Considerando as perspectivas futuras, identificamos a necessidade de estudos adicionais no que diz respeito a estimativa de incerteza de medição em situações em que existe correlação das fontes de incerteza. A correlação pode aumentar ou diminuir a incerteza de medição associada ao resultado analítico, o que terá impacto na avaliação de conformidade.

Até o presente momento, temos investigado como a incerteza de medição afeta o risco de decisões erradas para um único parâmetro (risco particular). Pretendemos iniciar estudos quanto a estimativa do risco de decisões erradas quando o medicamento é avaliado em relação a diversos parâmetros de qualidade (risco total) e como o risco total pode ser aplicado na avaliação da equivalência farmacêutica entre medicamentos genéricos, similares e referência.

7. Referências bibliográficas

[1] S. Ellison e A. Williams, Eds., Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3 ed. ed., 2012.

[2] N. Mueller, "Introducing the concept of uncertainty of measurement in testing in association with the application of the standard ISO/IEC 17025," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 7, pp. 79-80, 2002.

[3] A. Williams, "Introduction to measurement uncertainty in chemical analysis," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 3, pp. 92-94, 1998.

[4] S. Ellison e V. Barwick, "Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation. Part 1. Principles of an appraoch using cause and effect analysis.," *Analyst,* vol. 123, pp. 1387-1392, 1998.

[5] Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (GUM), 2008.

[6] S. L. Ellison e V. J. Barwick, "Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 3, pp. 101-105, 1998.

[7] I. Leito, L. Strauss, E. Koort e V. Pihl, "Estamation of uncertainty in routine pH measurement," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 7, pp. 242-249, 2002.

[8] D. D. M. Ghisleni, R. T. Okamoto, C. M. d. O. Amaral, F. R. Lourenço e T. d. J. A. Pinto, "New microbiological assay for determination of caspofungin in the presence of its degradation products and its measurement uncertainty," *Journal of AOAC International,* vol. 97, nº 3, pp. 908-912, 2014.

[9] F. R. Lourenço, T. M. Kaneko e T. d. J. A. Pinto, "Validation of erythromycin microbiological assay using an alternative experimental design," *Journal of AOAC International,* vol. 90, nº 4, pp. 1107-1110, 2007.

[10] F. R. Lourenço, "Uncertainty measurement of microbiological assay for apramycin soluble powder," *Latin American Journal of Pharmacy,* vol. 32, nº 5, pp. 640-645, 2013.

[11] D. D. M. Ghisleni, R. T. Okamoto, F. R. Lourenço e T. d. J. A. Pinto, "Validation and measurement uncertainty of an UPLC-PDA stability indicating method

applied to degradtion kinetics of caspofungin," *Current Pharmaceutical Analysis,* vol. 10, nº 3, pp. 193-202, 2014.

[12] A. Saviano, R. Madruga e F. Lourenço, "Measurement uncertainty of a UPLC stability indicating method for determination of linezolid in dosage forms," *Measurement,* vol. 59, pp. 1-8, 2015.

[13] R. T. Okamoto, M. A. L. Traple e F. R. Lourenço, "Uncertainty in the quantification of metronidazole in injectable solution and its application in the assessment of pharmaceutical equivalence," *Current Pharmaceutical Analysis,* vol. 9, nº 4, pp. 355-362, 2013.

[14] A. M. Saviano e F. R. Lourenço, "Uncertainty evaludation for determining linezolid in jectable solution by UV spectrophotometry," *Measurement,* vol. 46, pp. 3924-3928, 2013.

[15] D. Takano, P. Reis, A. Singh e F. Lourenço, "Estimation of uncertainty for measuring desloratadine in tablets formualtion using UV spectrophotoletry," *Measurement,* vol. 101, pp. 40-44, 2017.

[16] M. A. L. Traple, A. M. Saviano, F. L. Francisco e F. R. Lourenço, "Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application," *Journal of Pharmaceutical Analysis,* vol. 4, nº 1, pp. 1-5, 2014.

[17] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição - GUM 2008, Duque de Caxias, RJ: INMETRO/CICMA/SEPIN, 2012, p. 141.

[18] S. Ellison e V. Barwick, "Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach.," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 3, pp. 101-105, 1998.

[19] F. Francisco, A. Saviano e F. Lourenço, "Measuring uncertainty using different approaches: a case study for acetaminophen quantification," *Journal of AOAC Internatiol,* vol. 99(3), pp. 612-617, 2016.

[20] T. Anglov, K. Byrialsen, J. K. Carstensen, F. Christensen, S. Christensen, B. S. Madsen, E. Sorensen, J. N. Sorensen, K. Toftegard, H. Winther e K. Heydorn, "Uncertainty budget for final assay of a pharmaceutical product based on RP-HPLC," *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 8, pp. 225-230, 2003.

[21] V. J. Barwick, S. L. Ellison, C. L. Lucking e M. J. Burn, “Experimental studies of uncertainties associate with chromatographic techniques,” *Journal of Chromatography A,* vol. 918, pp. 267-276, 2001.

[22] L. Bruggemann e R. Wennrich, “Evaluation of measurement uncertainty for analytical procedures using a linear calibration function,” *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 7, pp. 269-273, 2002.

[23] Q. S. H. Chui, H. B. Antonoff e J. C. Olivieri, “Utilização de índices r e R obtidos de programas interlaboratoriais para o controle de precisão de método analítico: determinação de água por Karl Fischer,” *Química Nova,* vol. 25, nº 4, pp. 657-659, 2002.

[24] A. B. Forbes e H. D. Minh, “Design of linear calibration experiments,” *Measurement,* vol. 46, pp. 3730-3736, 2013.

[25] R. M. Niemi e S. I. Niemelä, “Measurement uncertainty in microbiological cultivation methods,” *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 6, pp. 372-375, 2001.

[26] S. Leito, K. Mölder, A. Künappas, K. Herodes e I. Leito, “Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: influence of various uncertainty sources,” *Journal of Chromatography A,* vol. 1121, pp. 55-63, 2006.

[27] A. Barat, H. Ruskin e M. Crane, “Probabilistic models for drug dissolution. Part 1. Review of Monte Carlo and stochastic cellular automata approaches,” *Simulation Modeling Practice and Tehory,* vol. 14, pp. 843-846, 2006.

[28] D. Meimaroglou e C. Kiparissides, “Review of Monte Carlo methods for the prediction of distributed molecular and morphological polymer properties,” *Industrial & Engineering Chemistry Research,* vol. 53, pp. 8963-8979, 2014.

[29] M. Hammersley e D. Handscomb, “The general nature of Monte Carlo methods,” em *Monte Carlo methods*, Londres, Methuen & Co Ltd., 1964, pp. 1-9.

[30] D. Kroese, T. Brereton, T. Taimre e Z. Botev, “Why Monte Carlo method is so important today.,” *WIREs Computational Statistics,* vol. 6, nº 6, pp. 386-392, 2014.

[31] H. B. Motra, J. Hildebrand e F. Wuttke, “The Monte Carlo method for evaluating measurement uncertainty: application for determining the properties of materiais,” *Probabilistic Engineering Mechanics,* vol. 45, pp. 220-228, 2016.

[32] Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), Evaluation of measurement data - Supplement 1 to the "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" - Propagation of distribution using a Monte Carlo Method., 2008.

[33] F. L. Francisco, A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “In vitro therapeutic equivalence of ciprofloxacin ophthalmic drugs based on measurement uncertainty and Monte Carlo simulations,” *Latin American Journal of Pharmacy,* vol. 33, nº 2, pp. 237-244, 2014.

[34] D. D. M. Ghisleni, R. T. Okamoto, F. R. Lourenço e T. d. J. A. Pinto, “An alternative capillary electrophoresis method for the quantification of caspofungin in lyophilisate powder and its measurement uncertainty,” *African Journal of Pharmacy and Pharmacology,* vol. 8, nº 40, pp. 1025-1032, 2014.

[35] V. Meyer, “Measurement Uncertainty,” *Journal of Chromatography A,* vol. 1158, pp. 15-24, 2007.

[36] A. Chen e C. Chen, “Comparison of GUM and Monte Carlo methods for evaluating measurement uncertainty of perspiration measurement systemns,” *Measurement,* vol. 87, pp. 27-37, 2016.

[37] F. d. M. Albano e C. S. ten Caten, “Analysis of the relationships between proficiency testing, validation of methods and estimation of measurement uncertainty: a qualitative study with experts,” *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 21, pp. 161-166, 2016.

[38] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar e L. A. Escaleira, “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry,” *Talanta,* vol. 76, pp. 965-977, 2008.

[39] H. Bhutani, M. Kurmi, S. Singh, S. Beg e B. Singh, “Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An overview,” *Pharma Times,* vol. 46, nº 8, pp. 71-75, 2014.

[40] L. V. Candioti, M. M. De Zan, M. S. Cámara e H. C. Goicoechea, “Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development,” *Talanta,* vol. 124, pp. 123-138, 2014.

[41] L. Separovic, A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “Using measurement uncertainty to assess the fitness for purpose of an HPLC analytical method in the pharmaceutical industry,” *Measurement,* vol. 119, pp. 41-45, 2018.

[42] A. Doloumetzidis e P. Macheras, “A century of dissolution research> from noyes and whitney to the biopharmaceutics classification system.,” *International Journal of Pharmacology,* Vols. %1 de %2231(1-2), pp. 1-11, 2006.

[43] D. C. Romero e F. R. Lourenço, “Measurement uncertainty of dissolution test of acetaminophen immediate release tablets using Monte Carlo simulations,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,* vol. (3), pp. e00163 (1-9), 2017.

[44] M. Paakkunainen, S. Matero, J. Ketolainen, M. Lahtela-Kakkonen, A. Poso e S. P. Reinikainen, “Uncertainty in dissolution test of drug release,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems,* vol. 97, pp. 82-90, 2009.

[45] F. R. Lourenço, T. M. Kaneko e T. d. J. A. Pinto, “Evaluating measurement uncertainty in the microbiological assay of vancomycin from methodology validation data,” *Journal of AOAC International,* vol. 90, nº 5, pp. 1383-1386, 2007.

[46] F. R. Lourenço, E. d. A. Barbosa e T. d. J. A. Pinto, “Microbiological assay for apramycin soluble powder,” *Latin American Journal of Pharmacy,* vol. 30, nº 3, pp. 554-557, 2011.

[47] A. M. Saviano, F. L. Francisco e F. R. Lourenço, “Rational development and validation of a new microbiological assay for linezolid and its measurement uncertainty,” *Talanta,* vol. 127, pp. 225-229, 2014.

[48] G. V. Galvão, A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation,” *Analytical Methods,* vol. 8, nº 19, pp. 3853-3992, 2016.

[49] A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “Measurement uncertainty estimation based on multiple regression analysis (MRA) and Monte Carlo (MC) simulations – Application to agar diffusion method,” *Measurement,* vol. 115, pp. 269-278, 2018.

[50] A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “Rapid microbiológico methods (RMMs) for evaluating the activity of cephalosporin antibiotics employing triphenyltetrazolium chloride,” *Talanta,* vol. 185, pp. 520-527, 2018.

[51] F. L. Francisco, A. M. Saviano, T. J. Pinto e F. R. Lourenço, “Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products,” *Journal of Microbiological Methods,* vol. 103, pp. 104-111, 2014.

[52] F. L. Francisco, A. M. Saviano e F. R. Lourenço, “Design Space of a Rapid Colorimetric Microplate Bioassay for Bacitracin Using Response Surface Methodology (RSM),” *Current Analytical Chemistry,* vol. 12, pp. 620-627, 2016.

[53] T. S. Botelho, F. R. Lourenço e T. J. Pinto, “Vancomycin Microbial Assay Using Kinetic-Reading Microplate System,” *Current Pharmaceutical Analysis,* vol. 9, pp. 172-176, 2013.

[54] F. R. Lourenço e T. J. Pinto, “Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,* vol. 47, nº 3, pp. 573-584, 2011.

[55] F. L. Francisco, A. M. Saviano, T. d. S. B. Almeida e F. R. Lourenço, “Kinetic microplate bioassays for relative potency of antibiotics improved by partial least square (PLS) regression,” *Journal of Microbiological Methods,* vol. 124, pp. 28-34, 2016.

[56] A. M. Saviano, F. L. Francisco, C. S. Ostronoff e F. R. Lourenço, “Development, optimization, and validation of a microplate bioassay for relative potency determination of linezolid using a design space concept, and its measurement uncertainty,” *Journal of AOAC International,* vol. 98, nº 5, pp. 1267-1275, 2015.

[57] T. Gadrich e E. Bashkansky, “A Bayesian approach to evaluating uncertainty of inaccurate categorical measurements,” *Measurement,* vol. 91, pp. 186-193, 2016.

[58] F. R. Lourenço, T. M. Kaneko e T. d. J. A. Pinto, “Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,* vol. 41, nº 4, pp. 437-443, 2005.

[59] F. R. Lourenço, T. d. S. Botelho e T. d. J. A. Pinto, “How pH, temperature, and time of incubation affect false-positive responses and uncertainty of the LAL gel-clot test,” *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology,* vol. 66, nº 6, pp. 542-546, 2012.

[60] C. S. Ostronoff e F. R. Lourenço, “Measurement uncertainty of chromogenic LAL assays: reaction time and proportion of endotoxin and LAL reagent affect release of p-nitroaniline,” *Journal of AOAC International,* vol. 98, nº 1, pp. 51-55, 2015.

[61] C. Burgess, P. Curry, D. J. LeBlond, G. S. Gratzl, E. Kovacs, G. P. Martin, P. L. McGregor, P. Netthercote, H. Pappa e J. Weitzel, “Fitness for use: decision rules and target measurement uncertainty,” *Pharmacopeial Forum,* vol. 42, nº 2, 2016.

[62] D. Dalalah e D. B. Hani, “A precision-to-tolerance ratio model for the assessment of measurements uncertainty,” *Precision engineering,* vol. 44, pp. 143-151, 2016.

[63] E. Desimoni e B. Brunetti, “Uncertainty of measurement and conformity assessment: a review,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* vol. 400, pp. 1729-1741, 2011.

[64] I. Kuselman, I. Schumacher, F. Pennecchi, C. Burns, A. Fajgelj e P. de Zorzi, “Long-term stability of drug products and out-of-specification test results,” *Accreditation and Quality Assurance,* vol. 16, pp. 615-622, 2011.

[65] F. R. Lourenço e T. d. J. A. Pinto, “Assessment of pharmaceutical equivalence: difference test or equivalence test?,” *Latin American Journal of Pharmacy,* vol. 31, nº 4, pp. 597-604, 2012.

Anexos

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Estimativa da incerteza em ensaio de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.41, p.438 - 443, 2005. (Fator de Impacto: 0,474)

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Validation of Erythromycin microbiological assay using an alternative experimental design. *Journal of AOAC International.* v.90, p.1107 - 1110, 2007. (Fator de Impacto: 0,962)

LOURENÇO, F.R.; KANEKO, T.M.; PINTO, T.J.A. Evaluating Measurement Uncertainty in the Microbiological Assay of Vancomycin from Methodology Validation Data. *Journal of AOAC International.* v.90, p.1383 - 1386, 2007. (Fator de Impacto: 0,962)

LOURENÇO, F.R.; BARBOSA, E.A.; PINTO, T.J.A. Microbiological assay for apramycin soluble powder. *Latin American Journal of Pharmacy.* v.30, p.554 - 557, 2011. (Fator de Impacto: 0,298)

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Antibiotic microbial assay using kinetic-reading microplate system. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* v.47, p.573 - 584, 2011. (Fator de Impacto: 0,474)

LOURENÇO, F.R.; BOTELHO, T.S.; PINTO, T.J.A. How pH, Temperature, and Time of Incubation Affect False-Positive Responses and Uncertainty of the LAL Gel-Clot Test. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. v.66, p.542 - 546, 2012. (Fator de Impacto: 0,393)

LOURENÇO, F.R.; PINTO, T.J.A. Assessment of Pharmaceutical Equivalence: Difference Test or Equivalence Test? *Latin American Journal of Pharmacy*. v.31, p.597 - 604, 2012. (Fator de Impacto: 0,298)

BOTELHO, T.S.; **LOURENÇO, F.R.**; PINTO, T.J.A. Vancomycin Microbial Assay Using Kinetic-Reading Microplate System. *Current Pharmaceutical Analysis.* v.9, p.172 - 176, 2013. (Fator de Impacto: 0,750)

LOUNREÇO, F.R. Uncertainty Measurement of Microbiological Assay for Apramycin Soluble Powder. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.32, p.640 - 645, 2013. (Fator de Impacto: 0,298)

OKAMOTO, R.T.; TRAPLE, M.A.; **LOURENÇO, F.R.** Uncertainty in the Quantification of Metronidazole in Injectable Solution and its Application in the Assessment of Pharmaceutical Equivalence. *Current Pharmaceutical Analysis.* v.9, p.355 - 362, 2013. (Fator de Impacto: 0,750)

SAVIANO, A.M.; **LOURENÇO, F.R.** Uncertainty evaluation for determining linezolid in injectable solution by UV spectrophotometry. *Measurement*. v.46, p.3924 - 3928, 2013. (Fator de Impacto: 2,359)

GHISLENI, D.D.M.; OKAMOTO, R.T.; **LOURENÇO, F.R.**; PINTO, T.J.A. Validation and measurement uncertainty of an UPLC-PDA stability indicating method applied to degradation kinetics of Caspofungin. *Current Pharmaceutical Analysis.* v.10, p.193 - 202, 2014. (Fator de Impacto: 0,750)

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*. v.127, p.225 - 229, 2014.

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. *Journal of AOAC International.* v.97, p.908 - 912, 2014. (Fator de Impacto: 0,962)

TRAPLE, M.A.; SAVIANO, A.M.; FRANCISCO, F.L.; **LOURENÇO, F.R.** Measurement uncertainty in pharmaceutical analysis and its application. *Journal of Pharmaceutical Analysis.* v.4, p.1 - 5, 2014.

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. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.33, p.237 - 244, 2014. (Fator de Impacto: 0,298)

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; PINTO, T.J.A.; **LOURENÇO, F.R.** Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. *Journal of Microbiological Methods.* v.103, p.104 - 111, 2014. (Fator de Impacto: 1,790)

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 Journal of Pharmacy and Pharmacology.* v.8, p.1025 - 1032, 2014. (Fator de Impacto: 0,839)

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. *Journal of AOAC International.* v.98, p.51 - 55, 2015. (Fator de Impacto: 0,962)

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.* v.59, p.1 - 8, 2015. (Fator de Impacto: 2,359)

SAVIANO, A.M.; FRANCISCO, F.L.; OSTRONOFF, C.S.; **LOURENÇO, F.R.** Development, Optimization, and Validation of a Microplate Bioassay for Relative Potency Determination of Linezolid Using a Design Space Concept, and its Measurement Uncertainty. *Journal of AOAC International.* v.98, p.1267 - 1275, 2015. (Fator de Impacto: 0,962)

GALVÃO, G.V.; SAVIANO, A.M.; **LOURENÇO, F.R.** Reduced incubation time for inhibition zone formation based on diffusion and growth mechanism elucidation. *Analytical Methods*. p.3885 - 3891, 2016. (Fator de Impacto: 1,900)

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; **LOURENÇO, F.R.** Measuring Uncertainty Using Different Approaches: A Case Study for Acetaminophen Quantification. *Journal of AOAC International.* v.99, p.612 - 617, 2016. (Fator de Impacto: 0,962)

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; ALMEIDA, T.S.B.; **LOURENÇO, F.R.** Kinetic microplate bioassays for relative potency of antibiotics improved by partial Least Square (PLS) regression. *Journal of Microbiological Methods.* v.124, p.28 - 32, 2016. (Fator de Impacto: 1,790)

FRANCISCO, F.L.; SAVIANO, A.M.; PINTO, T.J.A.; **LOURENÇO, F.R.** Design Space of a Rapid Colorimetric Microplate Bioassay for Bacitracin using Response Surface Methodology (RSM). *Current Analytical Chemistry.* v.12, p.1 - 1, 2016. (Fator de Impacto: 1,306)

ROMERO, D.C.; **LOURENÇO, F.R.** Measurement uncertainty of dissolution test of acetaminophen immediate release tablets using Monte Carlo simulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.53, p.e000163 - , 2017. (Fator de Impacto: 0,474)

TAKANO, D.E.N.; REIS, P.R.S.; SINGH, A.K.; **LOURENÇO, F.R.** Estimation of uncertainty for measuring desloratadine in tablets formulation using UV spectrophotometry. *Measurement*. v.101, p.40 - 44, 2017. (Fator de Impacto: 2,359)

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.* v.119, p.41 - 45, 2018. (Fator de Impacto: 2,359)

SAVIANO, A.M.; **LOURENÇO, F.R.** Rapid microbiological methods (RMMs) for evaluating the activity of cephalosporin antibiotics employing triphenyltetrazolium chloride. *Talanta*. v.185, p.520 - 527, 2018. (Fator de Impacto: 4,162)

SAVIANO, A.M.; **LOURENÇO, F.R.** Measurement uncertainty estimation based on multiple regression analysis (MRA) and Monte Carlo (MC) simulations - Application to agar diffusion method. *Measurement.* v.115, p.269 - 278, 2018. (Fator de Impacto: 2,359)