

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**Desenvolvimento e Aplicação de Ensaio de Proficiência  
para determinação de Ivermectina em medicamento  
veterinário.**

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni  
Olivares

Mestranda: Paula Souza da Silva Gomes Lima

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos/SP

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Paula Souza da Silva Gomes Lima

**Desenvolvimento e Aplicação de Ensaio de Proficiência para  
determinação de Ivermectina em medicamento veterinário.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Exemplar revisado. O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

São Carlos/SP

2021

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

**Assinatura:**

**Data:**

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Lima, Paula Souza da Silva Gomes

Desenvolvimento e aplicação de ensaio de proficiência para determinação de ivermectina em medicamento veterinário / Paula Souza da Silva Gomes Lima. — São Carlos, 2021.

81 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

1. Ivermectina. 2. Gestão da qualidade. 3. Ensaio de proficiência. 4. Medicamento veterinário. I. Título.



A minha avó Iracema Gomes Lima, que nos seus 101 anos de vida, sempre me inspirou a lutar pelos meus objetivos e a nunca desistir dos sonhos por mais impossíveis que possam parecer.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por conduzir todos os dias para que me torne um ser humano melhor, justo e ético.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares, pela orientação, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Vitor Hugo Polisé Paccos do IQSC, pela paciência, orientação e grandes ideias.

Ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – Campinas/SP, especialmente a Milene Martini Berbel e a Juliana Cristina Pereira, por todo o suporte em análises, paciência e treinamentos.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela estrutura, suporte e apoio sempre em excelente qualidade.

A minha família, principalmente aos meus pais, Paulo Gomes Lima e Sonia Maria Souza da Silva Lima, meus irmãos, Daniel da Silva Gomes Lima e Eduardo da Silva Gomes Lima, e minha sobrinha Leticia Lopes Lima, pelo suporte emocional, paciência e amor.

Aos colegas de Grupo, Pamela Grizotto, Rhaissa Bontempi, Bruna Drielen, Cássia Watanabe, Luiz Filipe Santagostino, Stephano Marques e Carolaine Rodrigues pela companhia ao longo do mestrado.

A Paula Oshiro, Brenda Luisi, Evelise Quintanilha, Klaus Aires Alves, Martin Leme, Lucas Frias, Daniel Oliveira, por serem os melhores amigos do mundo e principalmente por serem a minha família de Bauru.

Ao Chubraider Xavier e Yuri Andrade, pelas conversas, conselhos, risadas, desabafos e principalmente pela paciência, que ambos me dedicam diariamente.

Aos meus amigos de São Carlos, pela companhia nos momentos mais solitários, e também nos momentos de alegria, pelas festas, ou simplesmente pelos convites de sair para tomar um café.

A Universidade Virtual do Estado de São Paulo (UNIVESP) pela bolsa de estudos.

*“O ato criador, seja na ciência ou na arte,  
surge sempre de uma dor. Não é preciso  
que seja uma dor doída ... Por vezes a dor  
aparece como aquela coceira que tem o  
nome de curiosidade” – Rubem Alves*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Crescimento da acreditação de laboratórios. Laboratórios acreditados no Brasil por diferentes Sistemas de Gestão com base no cadastro do INMETRO.....	5
Figura 2 – Ciclo de qualidade analítica (do inglês, <i>analytical quality assurance cycle</i> , AQAC) .....	6
Figura 3 – Relação entre os EP e a acreditação de laboratórios .....	7
Figura 4 – Ciclo PDCA formado pelas quatro fases do controle de processo: planejar, executar, verificar e atuar .....	9
Figura 5 – Representação gráfica de um número ideal de laboratórios participantes de EP .....	11
Figura 6 – Fórmula estrutural da IVM de suas duas variações .....	13
Figura 7 – Lesão de pele que se desenvolve a partir do agravamento da oncocercose, durante um certo período de tempo .....	14
Figura 8 – Proporção de amostras PNCRC (%) realizadas em LFDAs e em laboratórios credenciados .....	16
Figura 9 – Ilustração dos componentes importantes do método de cromatografia líquida .....	18
Figura 10 – Aplicabilidade da cromatografia líquida .....	19
Figura 11 – Benefícios da utilização do método ELISA .....	21
Figura 12 – Representação do método ELISA do tipo sanduíche.....	23
Figura 13 – Estrutura representativa da técnica ELISA do tipo competitiva .....	24
Figura 14 – Representação de todas as etapas necessárias para um programa de EP ....	25
Figura 15 – Normas e Guias usados no processo de desenvolvimento do EP .....	27
Figura 16 – Preparação das amostras do EP de IVM em produto comercial.....	28
Figura 17 – Esquematização de um método ideal para a realização do ensaio da homogeneidade .....	29
Figura 18 – Demonstração da metodologia usada para análise de IVM em ELISA.....	38
Figura 19 – Gráfico do ensaio da estabilidade, realizado pelo estudo da concentração de ivermectina x tempo, para primeira curva de calibração .....	42
Figura 20 – Gráfico do ensaio da estabilidade, realizado pelo estudo da concentração de ivermectina x tempo, para segunda curva de calibração.....	42
Figura 21 – Gráfico com os resultados dos laboratórios participantes a partir da avaliação do índice Z.....	46
Figura 22 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 002 .....	50
Figura 23 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 004 .....	52
Figura 24 – Gráfico que apresenta a regressão ordinária e ponderada para os resultados do laboratório 005 .....	54
Figura 25 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 007.....	56
Figura 26 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 008.....	58
Figura 27 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 009.....	59
Figura 28 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 010.....	61
Figura 29 – Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 012.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Substâncias para quais foram detectadas violações no período de 2013 a 2018 e sua respectiva frequência de violação (% de amostras testadas): .....	15
Tabela 2 – LMR de IVM disponível nas carnes para consumo humano .....	16
Tabela 3 – Resultados referentes ao estudo da incerteza do EP de Ivermectina .....	34
Tabela 4 – Critério de aceitação para reprodutibilidade .....	36
Tabela 5 – Modelo de preparo de amostras para uma análise de IVM.....	37
Tabela 6 – Resultados obtidos a partir do ensaio de homogeneidade .....	39
Tabela 7 – Avaliação estatística para o ensaio da homogeneidade .....	40
Tabela 8 – Resultados da incerteza padrão do valor designado .....	41
Tabela 9 – Resultados obtidos a partir do ensaio de estabilidade .....	42
Tabela 10 – Orientações para parâmetros de dispersões robustas em caso de poucos participantes.....	43
Tabela 11 – Resultados dos laboratórios participantes seguindo os índices $z$ e $zeta$ .....	48
Tabela 12 – Resultados apresentados pelo participante de código 002 para a curva de calibração.....	50
Tabela 13 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 002.....	50
Tabela 14 – Resultados apresentados pelo participante de código 004 para a curva de calibração .....	52
Tabela 15 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 004.....	52
Tabela 16 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 005 .....	53
Tabela 17 – Resultados do $R^2$ para os critérios de regressão ordinária e ponderada .....	54
Tabela 18 – Avaliação da homocedasticidade para o laboratório 005 .....	54
Tabela 19 – Resultados apresentados pelo participante de código 007 para a curva de calibração .....	56
Tabela 20 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 007.....	57
Tabela 21 – Resultados apresentados pelo participante de código 008 para a curva de calibração.....	57
Tabela 22 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 008.....	58
Tabela 23 – Resultados apresentados pelo participante de código 009 para a curva de calibração.....	59
Tabela 24 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 009.....	60
Tabela 25 – Resultados apresentados pelo participante de código 010 para a curva de calibração.....	60
Tabela 26 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 010.....	61
Tabela 27 – Resultados apresentados pelo participante de código 012 para a curva de calibração.....	62
Tabela 28 – Dados calculado pelo software ConfLab <sup>®</sup> , para avaliação do laboratório 012.....	63



## LISTA DE SIGLAS

EP: ensaio de proficiência

IVM: ivermectina

BPL: boas práticas de laboratório

INMETRO: instituto nacional de metrologia, qualidade e tecnologia

RBLE: rede brasileira de laboratórios e ensaios

RBC: rede brasileira de calibração

MAPA: ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

LFDA: laboratórios federais de defesa agropecuária

LMR: limite máximo de resíduos

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

RIA: *Radio Imuno Assay*

$s_{entre}$ : desvio padrão relacionados à variabilidade entre grupos

$s_{bb}$ : desvio padrão entre grupos

$s_r$ : desvio padrão relacionado à repetibilidade

$s_a$ : desvio padrão relacionado ao coeficiente angular

$MQ_{entre}$ : quadrados médios relacionados à variabilidade entre grupos

$MQ_{dentro}$ : quadrados médios relacionados à repetibilidade entre grupos

$n_0$ : número de medições de cada frasco

$u_h / u_{bb}$ : componente da incerteza devido à homogeneidade

$u_{est}$ : componente da incerteza devido à estabilidade

$u_{des}$ : componente da incerteza devido ao valor designado

U: incerteza expandida

p: número de laboratórios participantes

$\sigma_H$ : desvio padrão para avaliação de ensaio de proficiência

$\delta_E$ : critério de erro máximo admissível para diferenças

Z: pontuação usada para avaliação da eficiência

$\zeta$ : índice zeta - índice z modificado, que inclui incertezas para o resultado do participante e o valor atribuído

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
2.1 <i>Gestão da Qualidade</i> .....	8
2.2 <b>Ensaio de Proficiência</b> .....	10
2.3 <b>Ivermectina</b> .....	13
2.4 <b>Método Cromatográfico</b> .....	17
2.5 <b>Método ELISA</b> .....	20
2.6 <b>Planejamento do Ensaio de Proficiência</b> .....	25
2.7 <b>Objetivo Geral</b> .....	26
2.8 <b>Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 <b>Elaboração do protocolo de ensaio de proficiência</b> .....	27
3.2 <b>Preparação dos itens de ensaio</b> .....	28
3.3 <b>Ensaio da Homogeneidade</b> .....	29
3.4 <b>Ensaio da Estabilidade</b> .....	31
3.5 <b>Estudo para atribuição do Valor Designado e Incerteza Expandida</b> .....	32
3.6 <b>Elaboração do cálculo estatístico para um número pequeno de laboratórios participantes</b> .....	34
3.7 <b>Aplicação do método cromatográfico e do ensaio imunoenzimático</b> .....	36
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
4.1 <b>Ensaio da Homogeneidade/Valor Designado</b> .....	39
4.2 <b>Ensaio da Estabilidade</b> .....	41
4.3 <b>Análise estatística dos resultados</b> .....	43
4.4 <b>Resultado dos laboratórios participantes de EP de Ivermectina</b> .....	47
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>6. TRABALHOS FUTUROS</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>APÊNDICE A</b> .....	71
<b>APÊNDICE B</b> .....	73
<b>APÊNDICE C</b> .....	75

## RESUMO

LIMA, Paula Souza da Silva Gomes. **Desenvolvimento e Aplicação de Ensaio de Proficiência para determinação de Ivermectina em medicamento veterinário.** 2021. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Atualmente, um Sistema de Gestão da Qualidade é de extrema importância, uma vez que os laboratórios começam a exigir uma maior credibilidade em seus serviços. Para isso, o Brasil introduziu o uso de algumas normas internacionalmente utilizadas, como a ISO/IEC 17025:2017 e a BPL. Estas normas estimulam o desenvolvimento e uso de materiais de referência certificados e ensaios de proficiência, visando o monitoramento dos resultados durante a rotina analítica dos laboratórios, trazendo assim uma maior segurança nos resultados dos ensaios. Já na produção de medicamentos veterinários, em específico a ivermectina (antiparasitário), que são utilizados em animais para consumo humano, há a necessidade de um adequado monitoramento pelos laboratórios com todos os controles necessários para fornecer rastreabilidade e confiabilidade. Nesse trabalho, foram utilizadas as normas ISO 13528:2015 e ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 no desenvolvimento e aplicação de um ensaio de proficiência de ivermectina em medicamento veterinário. Desta maneira, diferentes estudos foram realizados, como o estudo de valor designado, homogeneidade, estabilidade e por fim, a estimativa de incerteza dos itens de ensaios. Ao final deste processo foi realizado um ensaio interlaboratorial para a análise estatística dos resultados através da avaliação dos valores de índice  $z$  e  $zeta$ , pelo qual avaliou-se o desempenho de 12 laboratórios participantes, além de uma breve consideração sobre os dois métodos analíticos utilizados neste ensaio interlaboratorial. Portanto, pode-se concluir que essa rodada de ensaio de proficiência, foi verificado que 4 laboratórios conseguiram a aprovação (de códigos 001, 002, 004 e 005), o participante de código 011 obteve o seu rendimento como questionável, e os 7 laboratórios restantes foram reprovados (os participantes de códigos 006 a 010, pertenciam a mesma rede e com análise de rotina similares).

Palavras-chave: gestão da qualidade; ensaio de proficiência; ivermectina;

## ABSTRACT

LIMA, Paula Souza da Silva Gomes. **Development and Application of Proficiency Testing for determination of Ivermectin in veterinary medicine**. 2021. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Nowadays, a Quality Management System is extremely important since laboratories are beginning to demand greater credibility in their services. Therefore, Brazil introduced the use of some internationally used Standards, such as ISO/IEC 17025:2017 and GLP. These Standards encourage the development and use of certified reference materials and proficiency testing aiming to monitor the results during the laboratory's analytical routine, bringing greater confiability to test results. In the production of veterinary drugs, more specific, ivermectin (antiparasitic) which are used in animals for human consumption, there is a need for adequate monitoring by laboratories with all the necessary controls to provide traceability and reliability. In the present work, ISO 13528:2015 and ISO/IEC 17043:2011 Standards were used in the development and application of proficiency testing of ivermectin in veterinary medicine. In this way, different studies were carried out such as the study of assigned value, homogeneity, stability and the estimation of uncertainty of test items. At the end of this process, an interlaboratory test was carried out for the statistical analysis of the results by evaluating the  $z$  and  $zeta$  scores values in which the performance of 12 participating laboratories was evaluated, in addition to a brief consideration of the two analytical methods used in this interlaboratory test. Therefore it can be concluded that in this round of proficiency testing it was verified that four laboratories achieved approval (codes 001, 002, 004 and 005), code 011 participant obtained its performance as questionable and the 7 remaining laboratories failed (codes 006 to 010 participants, to which belonged to the same network and with similar analytical routine).

Keywords: quality management; proficiency testing; ivermectin;

## 1. INTRODUÇÃO

A implementação do Sistema de Gestão de Qualidade para normas e práticas laboratoriais é um assunto historicamente noticiado e de importância mundial até os dias atuais.

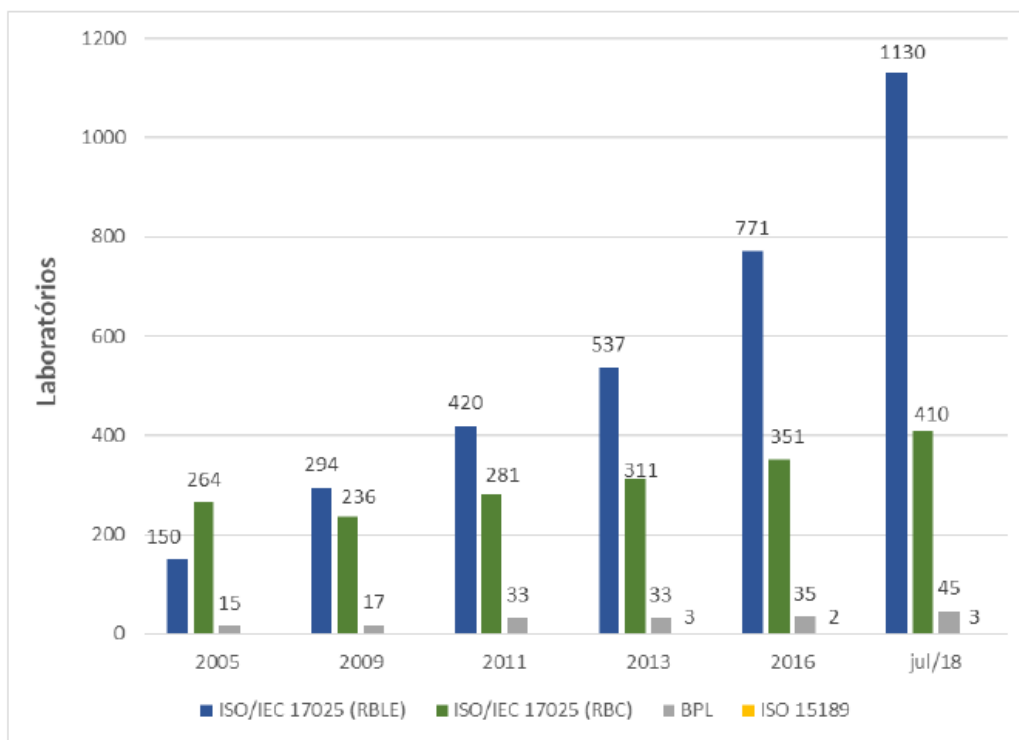
Para definir o conceito de qualidade, basta compreender a seguinte citação de Juran, no qual ele explica que a qualidade “é o conjunto das atividades através das quais atingimos a adequação ao uso, não importando em que parte da organização estas atividades são executadas” (JURAN,1991). Ao aplicar esta concepção de Juran para os laboratórios, nota-se uma ligação da rastreabilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

A Gestão de Qualidade é a ferramenta que permite que os laboratórios utilizem de procedimentos documentados, de forma adequada a permitir que todos os fatores que possam afetar a qualidade de seus produtos sejam devidamente analisados e padronizados, comprovando assim a eficiência da mercadoria produzida. No Brasil adotam-se normas específicas, que implementam a gestão da qualidade nos laboratórios, em destaque para a ISO/IEC 17025 e BPL (Boas Práticas de Laboratório) (OLIVARES, 2019).

Segundo Olivares, as normas ISO/IEC 17025 e a BPL apresentam a mesma finalidade, porém a BPL é capacitada para laboratórios que realizam análises para fins de registro, e a ISO/IEC 17025 é adotada principalmente em laboratórios de rotina, pois supervisiona o laboratório como um todo.

Um sistema de gestão da qualidade e sua acreditação tem sua aplicação de modo voluntário, porém os órgãos nacionais como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), ANA (Agência Nacional de Águas), MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente), solicitam que os laboratórios que lhes efetuam serviços sejam acreditados (OLIVARES, 2019). Esta exigência, em companhia de uma forte concorrência com o mercado internacional, tem demonstrado um grande crescimento no número de laboratórios acreditados no Brasil, como descrito na Figura 1, sendo que o eixo das abscissas representa as normas que foram aplicadas na acreditação dos laboratórios no Brasil, segundo o cadastro do INMETRO.

Figura 1 – Crescimento da acreditação de laboratórios. Laboratórios acreditados no Brasil por diferentes Sistemas de Gestão com base no cadastro do INMETRO

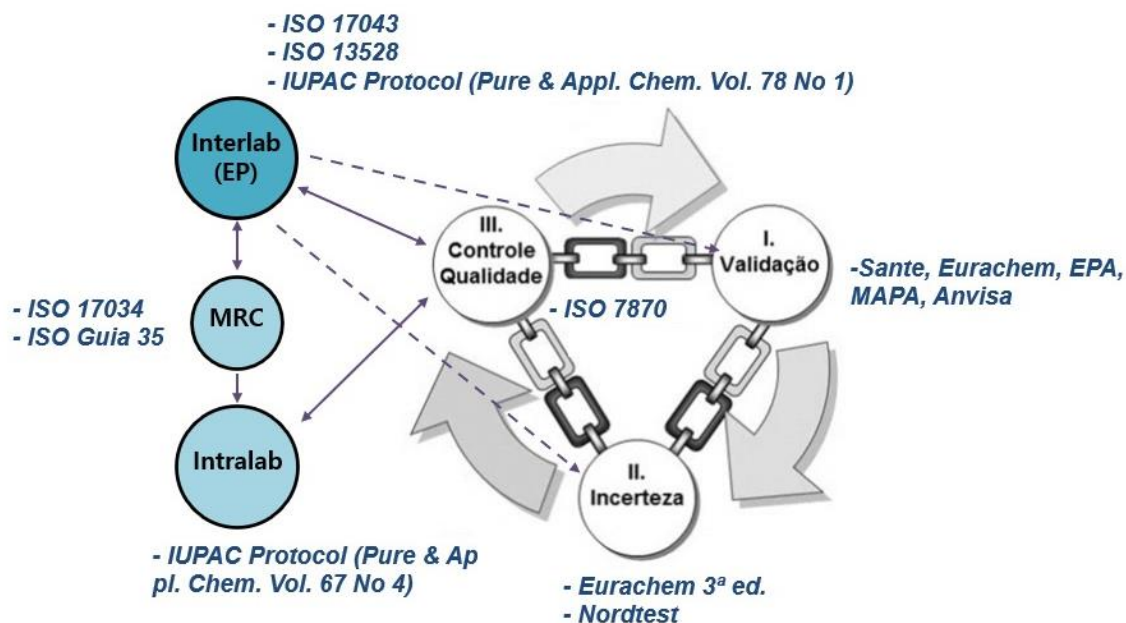


Fonte: Olivares (2019). \*RBLE corresponde a Rede Brasileira de Laboratórios e Ensaios e a RBC a Rede Brasileira de Calibração.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, expõe conceitos do sistema de gestão da qualidade correlacionado ao funcionamento, a administração de um laboratório e requisitos de recursos (como calibração de equipamentos, instalações, condições ambientais, pessoal e rastreabilidade metrológica). No caso dos requisitos de processo, podem ser evidenciados três que são de extrema importância para a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados (nota-se uma grande relação entre si), de modo que é possível unir estes requisitos em um único esquema. Na Figura 2, está representado o ciclo de qualidade analítica (do inglês, *analytical quality assurance cycle*, AQAC), destacando-se os requisitos:

- I. Validação do método de ensaio (item 7.2 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- II. Estimativa da incerteza (item 7.6 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- III. Controle de qualidade (item 7.7 da norma ISO/IEC 17025:2017)

Figura 2 – Ciclo de qualidade analítica (do inglês, *analytical quality assurance cycle*, AQAC)

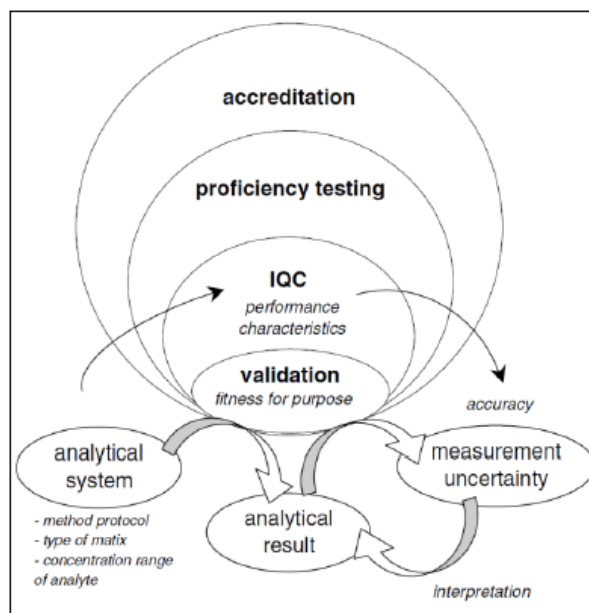


Fonte: Olivares (2019).

O Controle de Qualidade, poderá ser efetuado de duas formas: controle intralaboratorial ou interlaboratorial. Em um controle interlaboratorial, há a aplicação de ensaios de proficiência (EP) que são elaborados de maneira periódica pelos laboratórios. Entretanto, os EP são considerados de alto custo no caso de uma avaliação rotineira, desta maneira, também é utilizado o controle intralaboratorial, como por exemplo o uso de material de referência e, ou material de referência certificado. Segundo o guia EURACHEM/CITAC a utilização de EP em procedimentos de Controle de Qualidade, auxilia na fiscalização da rastreabilidade de um dado padrão (EURACHEM/CITAC, 2021).

Os EP apresentam relação com a acreditação de laboratório como demonstrado na Figura 3, de modo que as diferenças entre os níveis correspondem as medidas adotadas por um laboratório, para que se possa garantir a qualidade de seus resultados, e com isso melhorar a confiabilidade de suas análises (TAVERNIERS et al., 2004).

Figura 3 – Relação entre os EP e a acreditação de laboratórios



Fonte: Taverniers et al. (2004).

De acordo com o INMETRO, no Brasil existem apenas 16 provedores de EP que são acreditados, ocasionando a demanda por ensaios de organizações internacionais. Desta maneira, é de extremo interesse que sejam criados e acreditados EP nacionais, em especial os laboratórios agropecuários, os quais atuam nas análises de setores como alimentos, matérias-primas e medicamentos.

A ivermectina (IVM) é o fármaco antiparasitário mundialmente popular, patenteada a mais de 20 anos. Porém o uso desse antiparasitário sem restrição e controle, pode causar níveis acima do aceitável nas carnes bovinas que são produzidas para consumo humano, além da possibilidade de surgir uma resistência parasitária ao medicamento (DANAHER et al., 2006; COSTA; PEREIRA NETTO, 2012).

Para o uso veterinário, há várias formulações de IVM disponíveis no mercado farmacêutico, são disponíveis as concentrações que variam de 1% a 4%, além de diferentes combinações moleculares que possuem a finalidade de melhoria da eficiência do medicamento.

Contudo, o aumento na dosagem da IVM gera uma preocupação no aumento do nível da concentração de resíduos e um aumento do tempo de carência do fármaco. Com isso, a elaboração e aplicação de um programa de EP especificamente deste medicamento,



torna-se fundamental para garantir um correto monitoramento quanto a concentração de IVM nos medicamentos veterinários aplicados no Brasil. À vista disso, o presente trabalho, irá verificar o desempenho estatístico dos laboratórios participantes de uma rodada de EP, e avaliar as duas metodologias de análise mais comumente utilizada na detecção da IVM, que são o método cromatográfico e o ensaio imunoenzimático.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Gestão da Qualidade***

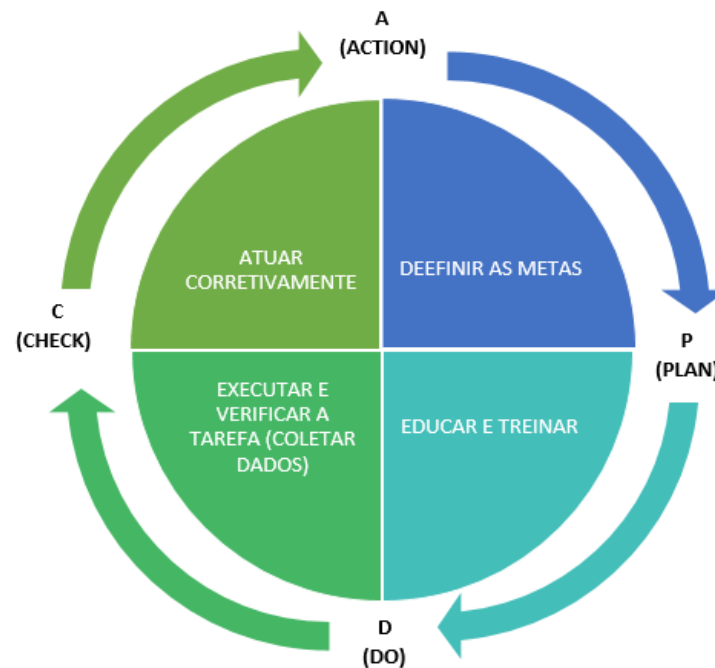
Na década de 20, o estatístico norte-americano W. A. Shewhart, questionou sobre a qualidade e a variabilidade encontradas nas produções de bens e serviços. Com isso, Shewhart, criou sistemas para qualificações de serviços que ficaram conhecidos como Controle Estatístico de Processo (CEP) e a utilização de gráficos de controle (LONGO, 1996).

Após o fim da Segunda Guerra Mundial, o pesquisador W. E. Deming foi convidado por japoneses para palestrar e treinar os empresários interessados em reerguer o Japão como potência economicamente ativa nos moldes da Gestão da Qualidade.

De acordo com Olivares, os quatorze princípios de Deming estabeleceram uma transformação gerencial em todos os níveis da organização, demonstrando uma preocupação com a qualidade dos produtos, serviços e a inclusão do trabalhador como integrante das decisões da empresa (gestão participativa) (OLIVARES, 2019). Deming propôs os 14 princípios que são: 1) Criar constância de propósito, 2) Adotar nova filosofia, 3) Acabar com a dependência em relação à inspeção, 4) Minimizar o custo total, 5) Melhorar o sistema, 6) Instituir a formação, 7) Adotar e instituir a liderança, 8) Acabar com o medo, 9) Eliminar as barreiras entre os departamentos, 10) Eliminar slogans, exortações que conclamem o aumento da produtividade e metas, 11) Eliminar as quotas de trabalho, 12) Promover o orgulho pelo trabalho, 13) Auto Melhoria, 14) A transformação é tarefa de todos.

Deming também foi responsável pela divulgação e aplicação do ciclo PDCA (*Plan, Do, Check e Act*), pelo qual obteve uma grande notoriedade, com efeito de ser aplicado em Sistemas de Gestão da Qualidade (OLIVARES, 2019). Na figura a seguir está representado o ciclo PDCA.

Figura 4 – Ciclo PDCA formado pelas quatro fases do controle de processo: planejar, executar, verificar e atuar



Fonte: Adaptado de Campos (1992).

No ano de 1947, ocorreu a criação da entidade *International Organization for Standardization* (ISO), que padronizou um Sistema da Gestão de Qualidade, tornando-se referência mundial ao lançar a ISO 9001 no ano de 1987.

Para os laboratórios de ensaio e calibração, a entidade ISO em princípio elaborou a ISO/IEC Guide 25, no qual foi substituída no ano de 1999, pela junção dos requisitos da ISO 9001, surgindo assim a ISO/IEC 17025. Em 2017, ocorreu a última revisão desta norma, deixando-a mais simples e com novos conceitos (OLIVARES, 2019).

Em resumo, a qualidade de um produto é a eficiência em atender as viabilidades e necessidades dos clientes. Para isso, é necessário que um produto seja produzido de

modo adequado para atender um determinado padrão, sendo assim, denominamos a organização de procedimentos para atender as necessidades e expectativas do cliente de Sistema de Gestão de Qualidade (OLIVARES, 2019).

## **2.2 Ensaio de Proficiência**

Para que os laboratórios de química analítica participem dos EP, necessita-se de uma distribuição regular de um material verdadeiramente homogêneo, no qual os laboratórios participantes irão analisar esse material por um método não especificado. Não serão conhecidas as concentrações do analito para os laboratórios que irão avaliar esses itens de ensaio. Com isso, os participantes deverão relatar ao fornecedor do EP os resultados de suas análises dentro de um determinado prazo. É de responsabilidade do provedor de um EP, emitir um relatório contendo um resultado de desempenho para os laboratórios participantes. Destaca-se também que estes testes podem ser realizados para vários analitos numa mesma rodada (THOMPSON, 2009).

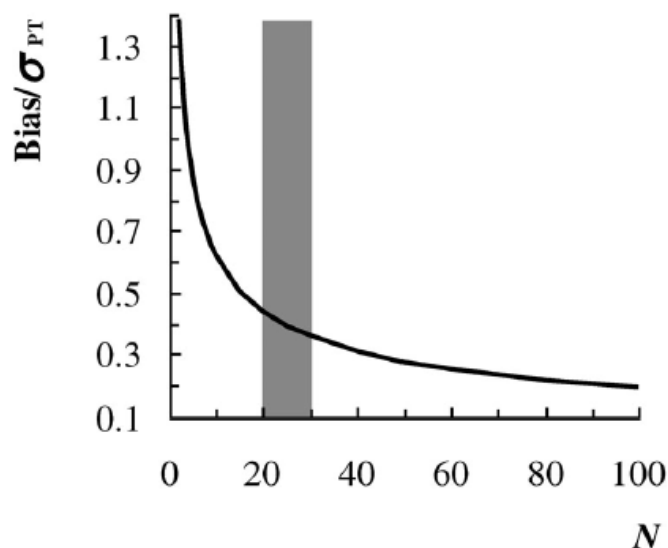
Segundo Thompson, o objetivo principal de um EP é avaliar a exatidão dos resultados apresentados pelos laboratórios participantes frente a um valor de referência, com isso, esses laboratórios tem a oportunidade de formular ações corretivas que se adequam as exigências e falhas encontradas no EP. Para que as análises sejam as mais representativas, é necessário que os materiais de ensaio sejam bem similares aos encontrados nos laboratórios, para isso, devem ser examinados como parte da rotina dos participantes do EP (THOMPSON, 2009).

Caso os laboratórios tenham pretensões de se candidatar a uma avaliação de acreditação na ISO/IEC 17025, é obrigatório a participação de um EP para uma parte significativa de seu escopo, visando identificar e corrigir as falhas em seus ensaios, e assim garantir a rastreabilidade e confiabilidade de suas análises (OLIVARES, 2019).

O relatório IUPAC/CITAC, apresenta instruções e exemplos para a realização de um EP com um número limitado de participantes, em síntese, recomenda-se que o valor atribuído seja fundamentado em informações independentes e confiáveis.

A Figura 5, representa o posicionamento do guia da IUPAC/CITAC para um número ideal de laboratórios participantes (a faixa correspondente pela cor cinza) sendo um número  $N$  de participante está entre  $20 \leq N < 30$ .

Figura 5 – Representação gráfica de um número ideal de laboratórios participantes de EP



Fonte: IUPAC/CITAC Guide: Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants – chemical analytical laboratories (2010).

Um estudo realizado pelo Instituto Técnico de Varsóvia na Polônia, evidenciou três métodos analíticos para um ensaio interlaboratorial com amostras limitadas. Nesse artigo, os autores mostram de modo cético, que os cálculos com modelos robustos podem não demonstrar resultados com alto nível de confiabilidade (SZEWCZAK, 2016).

Porém, os autores confirmam a importância desse tipo de ensaio para garantir um maior controle na qualidade, e por sua vez, uma maior rigidez no combate as possíveis fontes de erro. Para isso, é nítido que com o avanço das pesquisas, as novas metodologias de EP provem de uma maior eficiência nas análises estatísticas para um número limitado de laboratórios participantes (SZEWCZAK, 2016).

De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 e o Protocolo Internacional Harmonizado para EP em laboratórios de química analítica, é primordial a remoção de erros de um conjunto de dados na fase inicial da análise, antecipando o uso de métodos robustos, ou na utilização de *outliers* para o cálculo estatístico.

A ISO 13528:2015 descreve os métodos robustos como uma ferramenta que explica a parte central dos conjuntos normalmente distribuídos, porém excluindo os valores específicos rotulados como *outliers* das análises subsequentes.

Em virtude de estabelecer uma transparência nos cálculos de EP, foi estabelecido um sistema de pontuação chamado de índice Z. Para isso, é necessário obter uma escala adequada na diferença entre o resultado obtido pelo laboratório participante de EP e do “valor atribuído” para a concentração do analito. A compreensão deste índice é de forma direta, porém necessita de atenção para não cometer nenhum equívoco.

Ao longo do tempo, ocorreram algumas modificações no modo de contagem do cálculo de avaliação dos ensaios laboratoriais. Alguns índices são detalhados na norma ISO 13528:2015, como destaque temos: índice *zeta* ( $\zeta$ ), índice  $z'$ , erro normalizado ( $E_n$ ) e também o índice  $z$ .

Um estudo apresentado sobre EP pelo pesquisador Michael Koch, discutiu a importância e o futuro dos EP nos próximos anos em países subdesenvolvidos. A pesquisa que abordou 35 países, incluindo o Brasil, descobriu que na maioria dos participantes as tarefas mais importantes para a realização dos EP são: a acreditação dos laboratórios participantes, o aumento da conscientização desses laboratórios, a introdução de EP nacionais, a melhoria no transporte das amostras e o treinamento adequado dos profissionais locais (KOCH, 2019).

Por fim, existe uma plataforma que reúne os principais provedores de EP em uma base de dados, denominada EPTIS (Base de Dados de Provedores de Ensaio de Proficiência). Hoje a EPTIS conta com 5266 provedores de EP cadastrados, com resultados de 50 países, tornando-se um programa imprescindível para pesquisa de EP em diferentes matrizes. No caso dos medicamentos veterinários, existe somente um provedor de EP que estuda a IVM catalogado na EPTIS, no qual é a rede metrológica do estado do Rio Grande do Sul, através do estudo da IVM em alimentos de origem animal.

## 2.3 Ivermectina

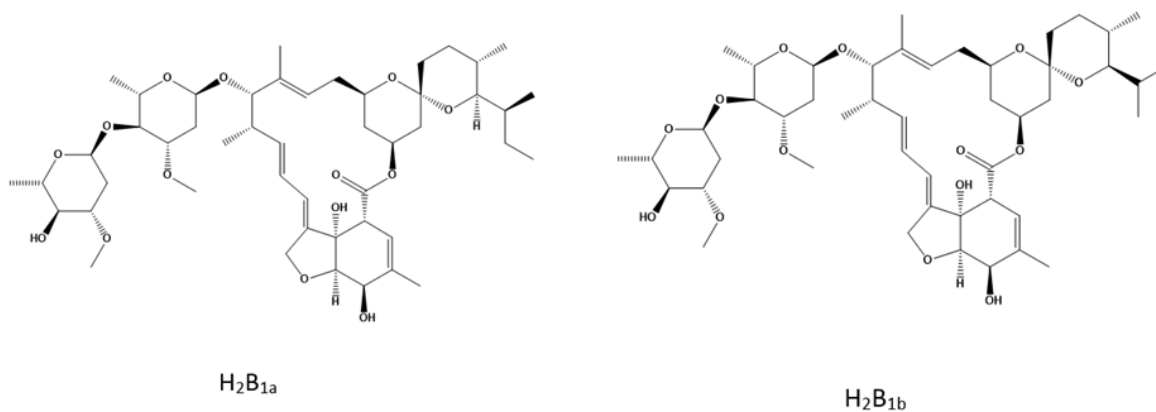
No ano de 2015 o prêmio Nobel de medicina causou um grande impacto ao ser atribuído aos pesquisadores responsáveis no tratamento inovador da oncocercose (cegueira dos rios) e da filariose (elefantíase). William Campbell foi o descobridor da capacidade antiparasitária de um novo composto ainda sem muito prestígio para ciência.

Este composto foi testado de forma simples e rápida, através do acompanhamento de um ensaio realizado pela ingestão da substância em um único rato. Mas tarde, a substância foi avaliada em outros testes, que comprovaram seu efeito anti-helmíntico (BURG; STAPLEY, 1989).

Coube aos químicos analíticos, desvendar a estrutura molecular dessa misteriosa substância, no qual consistia em um complexo de oito moléculas estreitamente relacionadas (ALBERS-SCHONBERG, 1981). Por possuir semelhanças com os pesticidas da milbemicina, o composto passou a ser denominado de avermectina (CAMPBELL, 2015).

Com o avanço das pesquisas, um dos derivados da avermectina (Figura 6), manifestou ter uma eficácia superior ao da própria avermectina. Esta eficiência foi comprovada através da hidrogenação da ligação química da avermectina na posição carbono 22-23. Sendo assim, os pesquisadores decidiram denominar a substância de “*hyvermectin*”, porém em alguns idiomas a palavra “*hyver*” significa “testículos”, por isso, foi substituída pelo nome de “*ivermectina*” (CAMPBELL, 2015).

Figura 6 – Fórmula estrutural da IVM de suas duas variações



Fonte: própria.

A IVM comprovou ser um poderoso antiparasitário para diferentes espécies de animais, ocasionando uma procura para teste em infecções parasitárias com ocorrência em humanos. Foi no ano de 1981, no Senegal, que um grupo de cientistas, iniciou o processo de estudo da IVM para tratamento em pacientes com oncocercose (AZIZ, 1982).

Foi na região da África francófona, que oncocercose surgiu como uma doença altamente endêmica. Portanto, com o avanço dos resultados e do tratamento da cegueira dos rios pela IVM, que em outubro de 1987 este medicamento foi aprovado para uso em humanos (CAMPBELL, 2015). Na Figura abaixo, registra o efeito de uma lesão na pele, agravada pela oncocercose.

Figura 7 – Lesão de pele que se desenvolve a partir do agravamento da oncocercose, durante um certo período de tempo



Fonte: Campbell (2015).

Somente no ano de 1981, que a IVM passou a ser lançada como medicamento para saúde animal (CAMPBELL, 2015).

Para o uso seguro da dosagem da IVM foram estabelecidas medidas fundamentadas nas Boas Práticas de Agropecuárias (BPA). Além de estipular as vias de administração do produto e o tempo limite de carência. Essas informações são descritas na bula do medicamento.

Alguns estudos sobre uso indiscriminado de medicamentos veterinários, demonstraram efeitos mutagênicos e/ou teratogênicos em espécies de mamíferos. Contudo, há poucos relatos de efeitos nocivos à saúde humana causados por excesso de IVM (SUNG et al., 2009; DEBONIS; PIERRE, 2011).

É através da Ingestão Diária Aceitável (IDA), sendo calculada a máxima concentração de uma substância que poderá ser consumida diariamente por seres humanos, no qual a IVM apresenta uma taxa de 0,6 mg/Kg/dia (JOINT FAO/WHO, 2014).

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/ANIMAL), que apresenta como base legal a Instrução Normativa SDA N° 42 de 20 de dezembro de 1999, estipula um limite máximo de resíduo (LMR) onde o medicamento veterinário estudado poderá ser encontrado no alimento sem prejuízo ao consumidor final.

Um ensaio realizado pelo PNCRC durante os anos de 2013 a 2018, com diferentes matrizes, mostrou a porcentagem de infração encontrada em algumas substâncias, pelo qual podemos observar que a IVM obteve resultados um pouco superior aos demais antiparasitários e antibióticos, conforme relatado na Tabela 1.

Tabela 1 – Substâncias para quais foram detectadas violações no período de 2013 a 2018 e sua respectiva frequência de violação (% de amostras testadas):

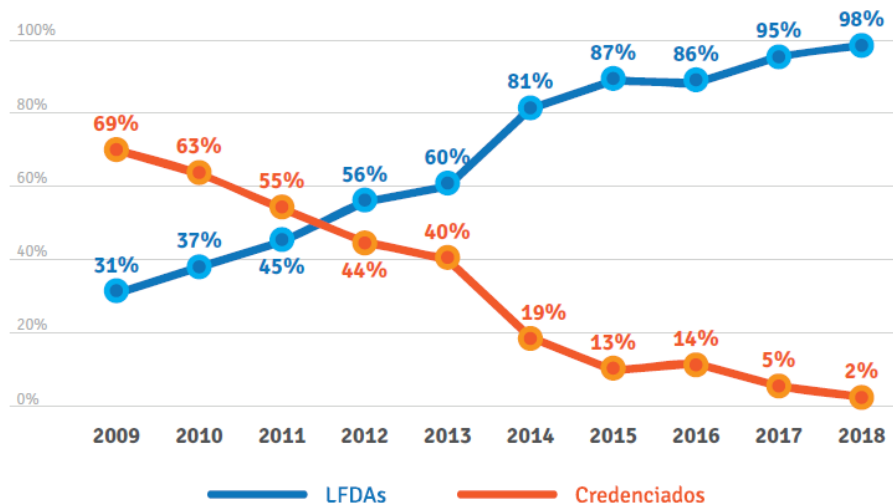
BOVINOS ABATIDOS		SUÍNOS		LEITE	
Ivermectina	1,34%	Lincomicina	0,07%	Ivermectina	0,55%
Abamectina	0,18%	Ivermectina	0,05%	Abamectina	0,07%
Doramectina	0,15%	Tilmicosina	0,02%	Tilmicosina	0,04%

Fonte: Adaptado de Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminante - PNCRC (2019).

Para a conformidade das análises, é necessário que sejam feitas em laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, no qual abrange os laboratórios credenciados pelo MAPA e os laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA). Conseqüentemente, todos estes laboratórios são acreditados pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017.



Figura 8 – Proporção de amostras PNCRC (%) realizadas em LFDAs e em laboratórios credenciados



Fonte: Manual Instrutivo do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminante -PNCRC (2019).

Por possuir característica lipofílica, a IVM reage lentamente no organismo, sendo armazenada em tecidos adiposos. Com isso, dependendo da dose administrada, sua excreção em períodos prolongados, poderá atingir até 5% no leite, além de tecidos como rins, fígado e músculos (KOLBERG et al., 2009; CERKVENIK-FLAJS et al., 2010).

As normas do *Codex Alimentarius* foram aceitas no Brasil para a determinação da quantidade de resíduos farmacêuticos utilizados em animais, entretanto, é recomendável que não se aplique a IVM em gado leiteiro. Na tabela abaixo, estão descritas a quantidade aceitável de IVM encontrada em animais que serão usados na alimentação humana.

Tabela 2 – LMR de IVM disponível nas carnes para consumo humano

ESPÉCIE	TECIDO	LMR (µg/kg)
Gado	Fígado	800
Gado	Banha	400
Gado	Rim	100
Gado	Leite	10
Porco	Fígado	15
Porco	Banha	20
Ovelha	Fígado	15
Ovelha	Banha	20

Fonte: Adaptado de *Codex Alimentarius* (2018).

A IVM atua no tratamento clínico de outras doenças para saúde humana, como a sarna, e também tem um impacto importante para o controle da filariose linfática (utilizando albendazol em combinação com a IVM) (CAMPBELL, 2015).

Uma pesquisa publicada em março de 2020, causou um grande impacto mundial. Cientistas australianos descobriram uma capacidade antiviral da IVM, com resultados que pareciam bem promissores para o combate ao novo coronavírus (batizado de Covid-19), o medicamento veterinário alcançou uma ótima eficiência nos testes *in vitro*, com a redução do vírus nas primeiras 24 horas (CALY, 2020). Porém, ensaios pré-clínicos não conseguiram detectar a eficiência da IVM para uso no tratamento em humanos para esta doença viral.

Já empresa Merck (chamada de MSD fora do Canadá e dos Estados Unidos), realizou estudos para examinar cuidadosamente a eficiência e segurança da utilização do medicamento para o controle da Covid-19. Com isso, a instituição emitiu uma nota a imprensa, esclarecendo o posicionamento da Merck com a falta de embasamento científico para efeito terapêutico e da insegurança da dosagem da IVM, que iriam além das informações recomendadas de prescrição aprovadas pela agência reguladora (MERCK, 2021).

Apesar da grande importância da IVM como medicamento veterinário, destaca-se que existem limites máximos deste composto, levando a necessidade de ser monitorado nos alimentos. Entretanto, a presença da IVM nos alimentos pode estar relacionada não apenas ao uso incorreto, mas também ao controle de sua concentração nos medicamentos veterinários comercialmente vendidos, sendo necessário que este controle seja realizado de maneira adequada. Esta questão levou ao LFDA de São Paulo iniciar o monitoramento da IVM em produto comercial, porém este tipo de análise ainda carece de EP específicos visando avaliar se os laboratórios que monitoram IVM em produto comercial se utilizam de métodos capazes de fornecer resultados reprodutíveis.

## **2.4 Método Cromatográfico**

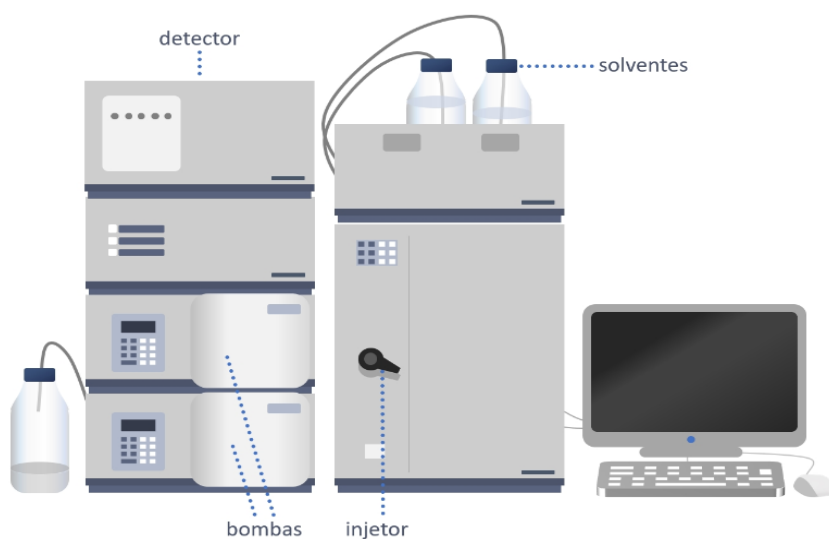
Historicamente, a primeira definição de cromatografia líquida foi apresentada pelo russo botânico Mikhail S. Tswett, (publicado em 1910), no qual foi observado através do

seu experimento para a extração de pigmentos de plantas com a utilização de uma coluna de separação (LANÇAS, 2009).

O método de cromatografia líquida é determinado por uma fase móvel abrangendo um solvente líquido, que contém uma amostra na forma de mistura de solutos. No começo, a cromatografia líquida era executada por colunas feitas de vidro e com um diâmetro interno de 10 a 50 mm. Estas colunas eram feitas com partículas sólidas revestidas com um líquido adsorvido, no qual foi denominado como fase estacionária (SKOOG et al., 2006).

A sigla HPLC, foi um conceito surgido em 1970 por Csaba Horváth, que após algumas modificações tem o seu significado atribuído a expressão em inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”. Já a instrumentação do HPLC é ilustrada na figura a seguir, simplificando as principais características, o funcionamento consiste de uma fase móvel ou eluente pelo qual é acondicionado em uma vidraria apropriada, que é aspirado na direção da coluna por uma bomba de alta pressão. Através de uma válvula de injeção, a amostra é introduzida no eluente e encaminhada para coluna, em que ocorre a separação e identificação dos analitos eluídos da fase móvel por um detector. Com isso, o detector gera um sinal, que é exibido em um software e analisado em um computador, onde finaliza com a geração de um cromatogramas, que informa a variação do sinal do detector em função do intervalo de tempo do ensaio (LANÇAS, 2009).

Figura 9 – Ilustração dos componentes importantes do método de cromatografia líquida.

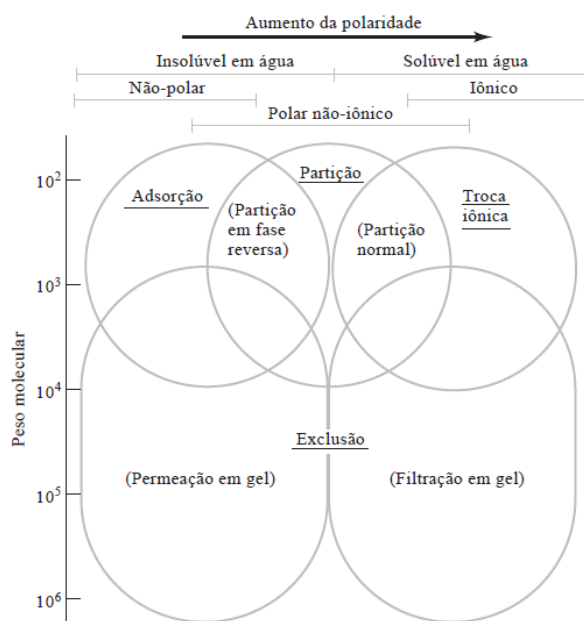


Fonte: própria.

No final dos anos 60 foi desenvolvida a tecnologia para fabricar e manusear colunas com recheios de partículas com diâmetros muito pequenos, com tamanhos de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . Para isso, houve a necessidade do avanço da tecnologia para fabricar instrumentos que possibilitassem o bombeamento de pressões muito mais altas que os aparelhos de cromatografia que sucederam. Ao mesmo tempo, foram elaborados detectores para permitirem o monitoriamento contínuo dos eluentes das colunas. Desta forma, foi empregado o termo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para diferenciar a metodologia utilizada por cromatógrafos de colunas simples (SKOOG et al., 2006)

Para utilizar a cromatografia líquida em diferentes espécies de analitos é necessário observar o tamanho e a polaridade dessas amostras. Portanto, a Figura 10 demonstra qual é a melhor variante de cromatografia líquida para ser aplicada, ou seja, para os analitos com massa molar maior que 10.000, emprega-se um dos métodos de exclusão por tamanho (permeação em gel: para os compostos não-polares e filtração em gel: para as espécies iônicas ou polares), já para os analitos iônicos com pequena massa molar, recomenda-se o uso da cromatografia por troca iônica, e por fim, as espécies não iônicas com baixa polaridade, são separadas por procedimento de partição (SKOOG et al., 2006).

Figura 10 – Aplicabilidade da cromatografia líquida.



Fonte: Skoog et al. (2006).

É importante que se removam os gases dissolvidos nas partículas presentes nos líquidos da fase móvel. Caso as bolhas se espalhem pela coluna, poderá ocasionar um alargamento de banda, além de interferir no desempenho da maioria dos detectores. Por isso, temos aparelhos denominados desgaseificadores, que podem apresentar em sua composição um sistema de aplicação de vácuo, um dispositivo de aquecimento e agitação, um esquema de destilação, e também temos o método de *sparging*, que consiste em arrastar os gases dissolvidos na fase móvel, através da injeção de um outro gás inerte e insolúvel no eluente (SKOOG et al., 2006).

Portanto, o aumento da utilização do HPLC nos últimos anos, foi importante para que esta técnica fosse aperfeiçoada, e dessa maneira, a busca por um melhor desempenho cromatográfico e por resultados mais rápidos, foram cruciais para novas alternativas de análises. Uma possibilidade de reduzir o tempo das análises, é utilizar colunas mais seletivas, estáveis e eficientes (quimicamente e mecanicamente). Desta maneira, a cromatografia líquida vem sendo utilizada em laboratórios farmacêuticos e de análises químicas, em áreas médicas e em órgãos governamentais. (MALDANER et al., 2009).

## 2.5 Método ELISA

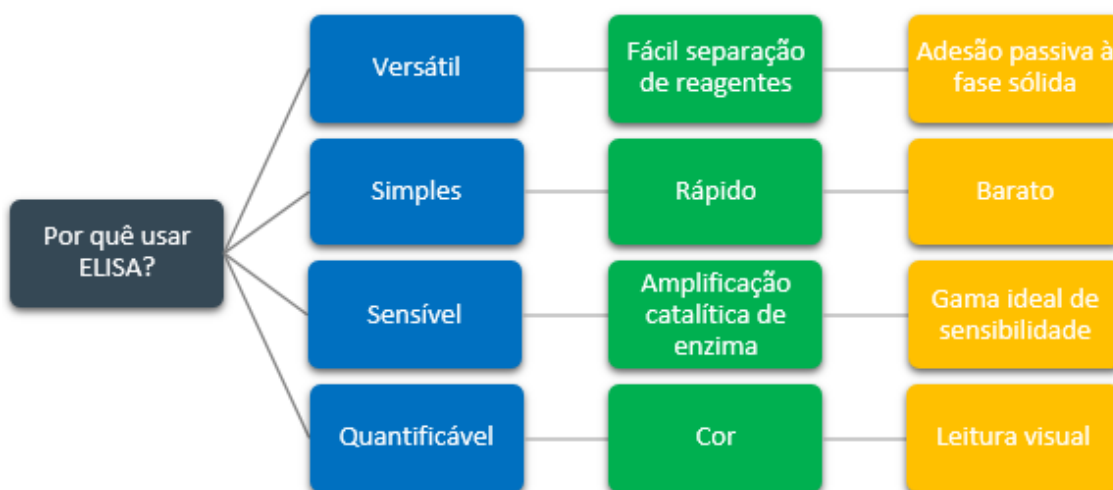
Os ensaios mais comumente utilizados como ferramenta de diagnóstico em medicina são realizados através do ensaio imunoenzimático (EIA) e o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA, do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Estas técnicas são realizadas para análises com concentrações na faixa de ng/mL a pg/mL, de amostras biológicas como urina, esperma, soro e sobrenadante de células. E também em pesquisas na área de ciências naturais (POSSAS, 2012).

Os pesquisadores Berson e Yalow foram responsáveis pela descoberta do método de ensaio radioimunoensaio (RIA), ao qual são atribuídos os princípios básicos que sucederam os procedimentos ELISA e EIA. Por essa descoberta, Yalow recebeu o prêmio Nobel no ano de 1977, com a medição da insulina endógena pelo plasma. O RIA tem como procedimento o uso da radioatividade, e por motivo de segurança, o método teve que ser modificado. Com isso, a utilização do radioisótopo cedeu lugar para as enzimas, surgindo assim a tecnologia necessária para as técnicas em EIA e ELISA.

Historicamente, a elaboração do ensaio em ELISA é atribuída aos pesquisadores Peter Perlmann e Eva Engvall, da Universidade de Estocolmo, na Suécia. Já a EIA foi uma técnica desenvolvida nos laboratórios de pesquisa da NV Organon, situado na cidade de Oss na Holanda, pelos cientistas Anton Schuurs e Bauke Van Weemen (ENGVALL & PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN & SCHUURS, 1971).

Independentemente das siglas utilizadas na notação do ensaio imunoenzimático, ou seja, ELISA ou EIA, e das poucas diferenças entre os dois métodos, utilizaremos o nome ELISA para fins de publicação e facilitar as devidas citações. Com isso, demonstramos na Figura 11, as vantagens de se utilizar a ELISA em análises laboratoriais (POSSAS, 2012).

Figura 11 – Benefícios da utilização do método ELISA.



Fonte: Adaptado de Crowther, 1995.

A metodologia de análise em ELISA é realizada de maneira simples, que em resumo, pode ser compreendida como a interação do composto antígeno-anticorpo, ou seja, através da conversão de um substrato incolor (cromógeno) pela enzima, formando assim um produto colorido. A técnica ELISA poderá ser utilizada para constatar tanto a presença de anticorpos específicos, como de antígenos (por exemplo, hormônios, peptídeos e proteínas), dependendo de como a amostra será revelada (POSSAS, 2012).

O princípio fundamental do ELISA é adesão ou imobilização do antígeno ou a captura específica do complexo antígeno-anticorpo, diretamente da superfície do poço (geralmente em placas de microtitulação contendo 96 poços) (GAN et al., 2013). Contudo, existem diferentes categoria de análises para o método ELISA, que podem ser

utilizadas para estudos quantitativos e qualitativos. Todas estas técnicas são definidas e distinguidas a seguir:

- ELISA indireta

O método ELISA do tipo indireto é determinado através da análise de uma amostra por um antígeno específico, as quais são aplicadas em um poço de uma placa de microtitulação. Na mesma amostra, é acrescida uma solução de proteína não reagente, por exemplo, a albumina de soro bovino, em que deverá bloquear as áreas do poço não envolvidas pelo antígeno. Após este processo, é incorporado um anticorpo primário, que se ligará diretamente ao antígeno, e depois um anticorpo secundário conjugado com a enzima. Com isso, um substrato é inserido para a enzima quantificar o anticorpo primário, ocorrendo uma mudança de coloração. A intensidade da cor é relacionada especificamente pela concentração do anticorpo primário presente no soro (GAN et al., 2013).

O maior problema do ensaio indireto é que não é seletivo para a imobilização do antígeno. Isso ocorre porque o soro utilizado como antígeno, captura todas as proteínas da amostra presente nos poços da placa de microtitulação. Portanto, para solucionar esta limitação, é necessário usar um anticorpo que captura exclusivamente o antígeno do método (GAN et al., 2013).

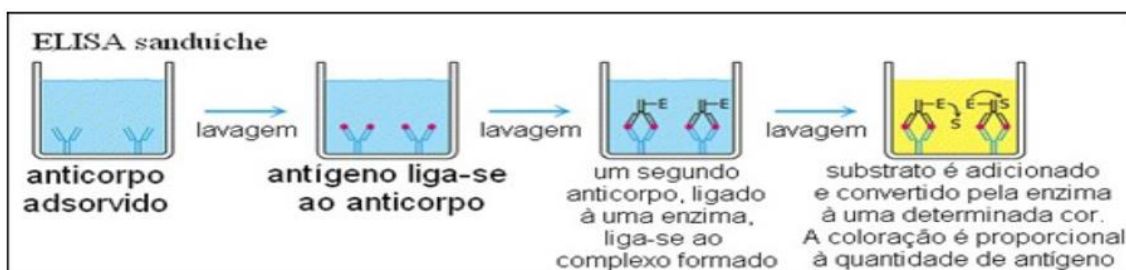
- ELISA sanduíche

A técnica de ELISA conhecida como sanduíche é realizada para identificar o antígeno específico da amostra. O procedimento é bem parecido com o ensaio do tipo indireto. As superfícies dos poços são preparadas para capturar o antígeno desejado através de uma quantidade conhecida de anticorpo. A albumina do soro bovino bloqueia as ligações não específicas da amostra, e com a adição do anticorpo primário que

“ensanduicha” o antígeno. As enzimas associadas aos anticorpos secundários são aplicados ao poço para que se liguem ao anticorpo primário (GAN et al., 2013).

Para os conjugados do anticorpo-enzima que não ligaram ao complexo, um substrato é adicionado e as enzimas são convertidas em uma coloração, podendo ser quantificadas. O procedimento da técnica ELISA do modo sanduíche é representado na Figura 12.

Figura 12 – Representação do método ELISA do tipo sanduíche.



Fonte: Goldsby et al. (2000).

- ELISA competitivo

O ELISA competitivo apresenta uma prática bem similar ao método do ELISA sanduíche, porém neste procedimento ocorre a competição do antígeno presente nos poços da placa de microtitulação com o antígeno da amostra (GAN et al., 2013).

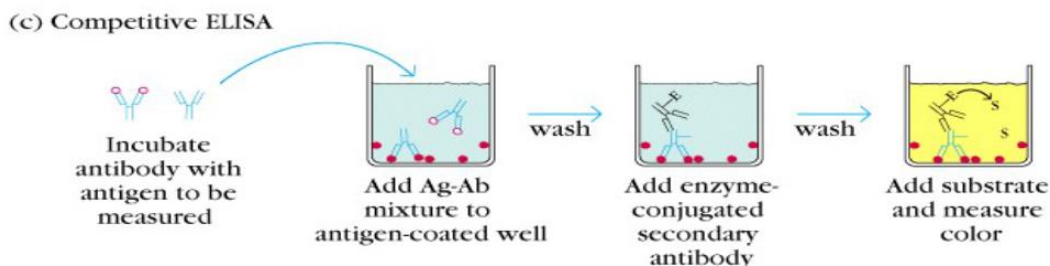
Deste modo, a técnica primeiramente reage com a incubação do anticorpo primário com o antígeno da amostra, formando-se assim os complexos de antígeno-anticorpo, no qual são incluídos aos poços já revestidos com o mesmo antígeno. Após o tempo de incubação, os anticorpos que não conseguiram incorporar ao antígeno, são lavados e assim, quanto maior a quantidade de antígenos da amostra, maior será o número de ligação do complexo antígeno-anticorpo (GAN et al., 2013).

Entretanto, existirá um número de anticorpo primário menor para ser envolvido com o antígeno revestido no poço. Por fim, é adicionado um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, e em sequência um substrato, em que será eliciado um sinal



fluorescente ou cromogênico. A ausência de coloração indicará a presença do antígeno na análise, conforme demonstrado na Figura a seguir.

Figura 13 – Estrutura representativa da técnica ELISA do tipo competitiva.



Fonte: Goldsby et al. (2000).

Esse tipo de ensaio apresenta a vantagem de possuir uma alta sensibilidade as diferentes composição dos complexos de antígenos, até mesmo quando a quantidade de anticorpo específico é relativamente pequena (DOBROVOLSKAIA et al., 2006). Uma utilização do método ELISA da categoria competitiva é a medição de anticorpos totais do polissacarídeo da espécie *Haemophilus influenzae*.

- ELISA múltiplo e portátil

Este é um novo método para a análise em ELISA, no qual consiste em um dispositivo que contém 8 ou 12 pinos de projeção imunoabsorventes, além de uma haste lateral, que deverá ser imersa na amostra coletada. A incubação e as lavagens são desempenhadas através dos antígenos conjugados com enzimas. Já os cromógenos são identificados pelo mergulho dos pinos nos micropoços contendo reagentes (GAN et al., 2013).

A vantagem dessa técnica é a praticidade do kit, que já vem pronto para uso laboratorial, com isso, não há necessidade de equipamentos sofisticados e nem de treinamento profissional. Por isso, é classificado como um método barato e usado para análises que envolve poucos recursos, como podemos destacar na investigação de drogas, marcação de células oncológicas e no atendimento para doenças infecciosas (BALSAM et al., 2013).

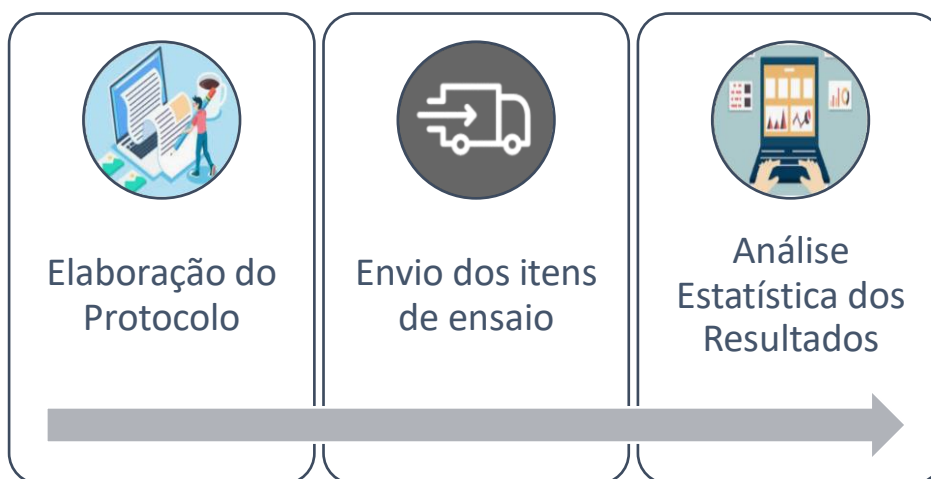
## 2.6 Planejamento do Ensaio de Proficiência

Segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 a realização de um EP envolve os seguintes tópicos:

- a. Determinar um valor designado;
- b. Calcular a estatística do desempenho;
- c. Avaliar o desempenho;
- d. Determinar a estabilidade e homogeneidade dos itens de EP;

Por isso, foi realizado um EP de acordo com as seguintes etapas: elaboração de um protocolo (que contemple os tópicos de “a” a “d” supracitados, envio das amostras e por último analisar estatisticamente os resultados de cada laboratório. Todas estas fases, estão demonstradas no esquema abaixo.

Figura 14 – Representação de todas as etapas necessárias para um programa de EP



Fonte: própria.

Não se pode começar um estágio sem ter terminado o outro, ou seja, são complementares, seguindo o sentido da seta que está desenhada na Figura 14.

## **OBJETIVOS**

### **2.7 Objetivo Geral**

Desenvolvimento e aplicação de EP para determinação de IVM em medicamento veterinário.

### **2.8 Objetivos Específicos**

- Desenvolver um protocolo estatístico de um EP para determinação de IVM em medicamento veterinário;
- Avaliar a homogeneidade e estabilidade das amostras do EP;
- Avaliar estatisticamente o desempenho dos laboratórios participantes;
- Realizar uma avaliação crítica dos resultados de cada laboratório, visando colaborar na busca de uma ação corretiva adequada para aqueles que não tiverem desempenho satisfatório e na busca de melhorias para aqueles que tiveram desempenho satisfatório.

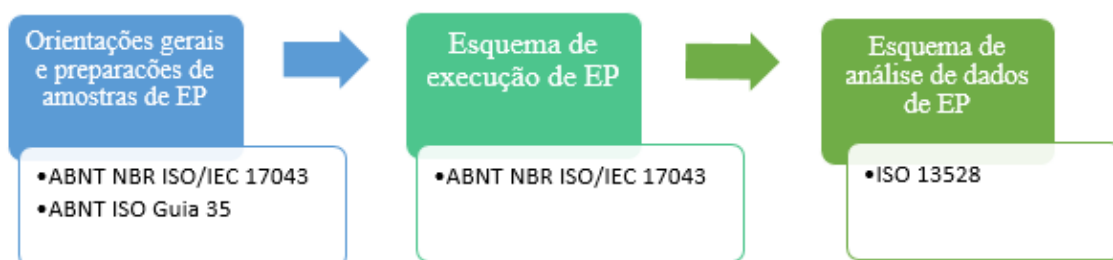
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Elaboração do procolo de ensaio de proficiência

O protocolo de EP foi elaborado num processo que envolveu a leitura e interpretação de normas internacionalmente aplicadas para EP, além de constar todos os procedimentos de cálculos estatísticos necessários para garantir a qualidade da análise da matriz analisada no ensaio interlaboratorial.

A Figura 15 ilustra uma representação do conjunto de normas e guias usados para uma avaliação de EP, pelo qual foram utilizados para a elaboração do protocolo de IVM em produto comercial.

Figura 15 – Normas e Guias usados no processo de desenvolvimento do EP



Fonte: Adaptado de Medeiros Albano, 2017.

De acordo com a ISO 13528:2015, códigos de letras ou números devem ser utilizados para identificar os laboratórios participantes, no intuito de que os próprios laboratórios possam reconhecer seus resultados e não consigam distinguir a qual participante obteve qualquer outro resultado.

Já o envio e transporte da IVM foi de responsabilidade do provedor. A amostra foi armazenada conforme recomendações descritas na bula ou rótulo do medicamento comercial, e detalhadas no tópico a seguir.

### 3.2 Preparação dos itens de ensaio

Para a legitimidade do EP, enviamos para os laboratórios participantes uma amostra de IVM, devidamente identificada. Além do protocolo do EP e um formulário para o registro dos resultados do ensaio interlaboratorial.

O preparo das amostras foi realizado através da compra de 1 litro de IVM em produto comercial e posteriormente transferido para 50 frascos âmbar de 60 mL, todos higienizados e com lacre de proteção. Cada item de ensaio recebeu uma quantidade de 20 mL de medicamento veterinário, conforme apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Preparação das amostras do EP de IVM em produto comercial.



Fonte: própria.

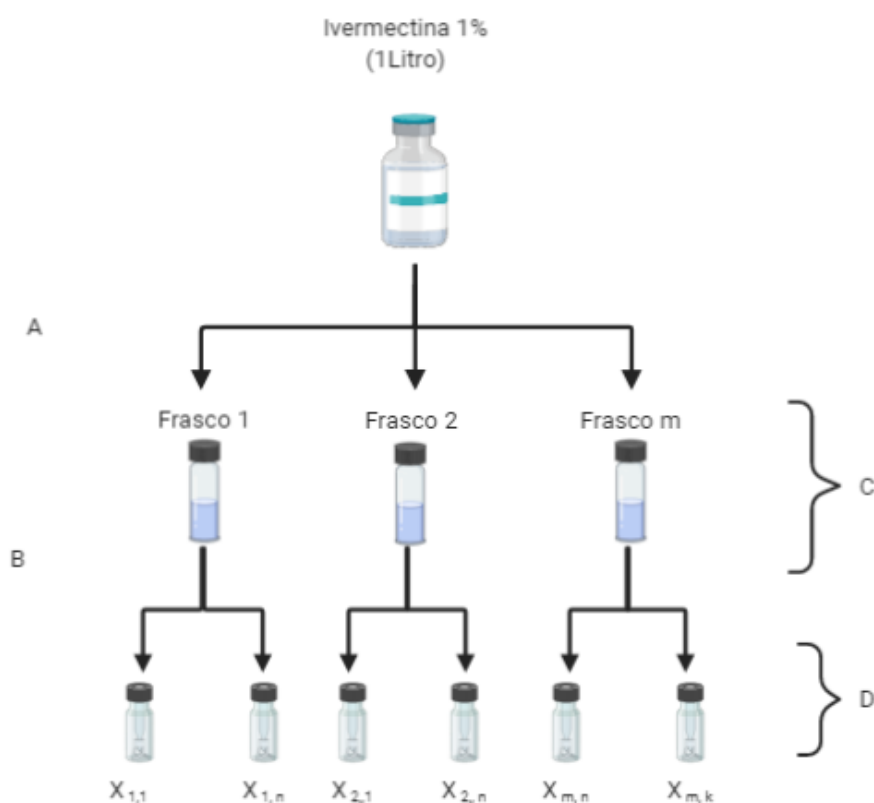
Estas amostras foram armazenadas fechadas, em local seco e ao abrigo dos raios solares, conforme recomendações descritas na bula ou rótulo do medicamento. O envio aos laboratórios participante foi por Sedex, em frascos escolhidos aleatoriamente pelo provedor e embalados em caixas de papelão devidamente lacradas e identificadas.

### 3.3 Ensaio da Homogeneidade

Um material é considerado homogêneo quando a análise de uma determinada amostra pertencente ao lote não aponta nenhuma diferença significativa entre o valor apresentado no ensaio. Assim, com o estudo da homogeneidade, comprovou-se que os itens de ensaio são equivalentes em todos os lotes.

Para um melhor planejamento, o item de ensaio de cada laboratório foi estudado de maneira que incluía uma variância “entre frascos” pelo qual se incorpora a heterogeneidade dos mensurados e uma variância “dentro de frascos” onde se abrange a incerteza da medição, transformação e sub amostragem. Para a norma ABNT/ISO GUIA 35:2020, essa abordagem seria a ideal e por isso a representamos no esquema abaixo.

Figura 17- Esquemática de um método ideal para a realização do ensaio da homogeneidade.



Legenda:

A	preparação
B	medição
C	operações que contribuem para a variação observada dentro da unidade, entre subamostra
D	operações que contribuem para a variação observada dentro da subamostra

Fonte: Adaptado de ABNT ISO GUIA 35: Materiais de Referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação, 2020.

Para a estimativa da incerteza relacionada à homogeneidade, foi considerado a abordagem da norma ISO Guia 35 e utilizado o cálculo do desvio padrão da variação entre as medições de cada amostra.

A tabela ANOVA foi a ferramenta empregada para a definição dos valores de  $MQ_{entre}$  (média quadrática entre frascos),  $MQ_{dentro}$  (média quadrática entre as replicatas de um mesmo frasco). Considerando-se o número de medições de cada frasco ( $n_0$ ), foi estabelecido o desvio padrão relacionado a repetibilidade ( $s_r$ ) e a componente associada ao desvio entre frascos ( $s_{bb}$ , do inglês *between bottles*). Essas equações são detalhadas abaixo.

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}} \quad (1)$$

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_0}} \quad (2)$$

Através da amplitude do intervalo de confiança de 95% e assim convertida para uma incerteza-padrão, pode-se desenvolver um parâmetro de confiança para  $s_{bb}$ . Com isso, é possível presumir a incerteza de variabilidade entre frascos, a qual é demonstrada na Equação 3:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n_0}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MQ_{dentro}}}} \quad (3)$$

Sendo o fator  $v_{MQ_{dentro}}$  corresponde ao número de graus de liberdade de  $MQ_{dentro}$ .

No caso de amostras líquidas, espera-se um alto grau de homogeneidade, deste modo, Monteiro e colaboradores, estipulam uma faixa de 2% de heterogeneidade como aceitável (MONTEIRO,2013). Contudo, é importante que um conceito de estimativa de incerteza relativa ao ensaio da homogeneidade seja incluído no lote de um material de referência.

Portanto, foi aplicado para este trabalho o valor de  $s_{bb}$  como a incerteza associada a variação da homogeneidade para o EP de IVM em produto comercial, visto que a norma ISO Guia 35:2020 recomenda que seja utilizado o maior valor entre  $s_{bb}$  e  $u_{bb}$ .

### 3.4 Ensaio da Estabilidade

As análises dos resultados desse estudo foram feitas a partir da média de concentração de cada mês, com isso, foi obtido um gráfico de regressão linear da concentração pelo tempo. Para a estimativa do coeficiente angular ( $\alpha$ ) da reta, foi multiplicado o desvio padrão associado ao coeficiente angular ( $s_a$ ) por um fator  $t$  para uma probabilidade de 95% e com graus de liberdade valendo  $n-2$ , onde  $n$  foi o número de meses utilizados nos testes. Essa fórmula, está representada a seguir.

$$|\alpha| < t_{0,95,n-2} \cdot s_a \quad (4)$$

Após o cálculo do coeficiente angular, conseguimos estimar a incerteza associada a estabilidade a longo prazo ( $u_{est}$ ), em um período de 5 meses (o qual corresponde ao tempo em que o medicamento veterinário foi analisado pelos laboratórios participantes), e multiplicado pelo desvio padrão relativo ao coeficiente angular ( $s_a$ ), como mostrado na equação abaixo:

$$u_{est} = s_a \cdot t \quad (5)$$

Os ensaios de homogeneidade e os ensaios de estabilidade foram realizados na dependência do laboratório de medicamentos veterinários, que faz parte do LFDA localizado na região de Campinas/SP.



### 3.5 Estudo para atribuição do Valor Designado e Incerteza Expandida

Para a definição do valor designado o VIM (Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia), cita como um valor atribuído a uma grandeza específica e aceito, as vezes por convenção, como tendo uma incerteza apropriada para uma dada finalidade (VIM, 2007)

Já a norma ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 apresenta o conceito de uma propriedade específica de um item de EP e determina como metodologias a serem implementadas para aplicação do valor designado, o uso de:

- i. Valores conhecidos – através de resultados determinados por formulação específica do item de ensaio;
- ii. Valores de referência – originado por análise, comparação ou medição do item de EP em relação a um material ou padrão de referência, rastreável a um padrão internacional ou nacional;
- iii. Valores de referência certificado – estabelecido através de ensaios ou métodos de medição definitivos (para ensaios quantitativos);
- iv. Valores de consenso de participantes – através dos métodos estatísticos informados na norma ISO 13528 e no Protocolo Internacional Harmonizado da IUPAC;
- v. Valores de consenso de participantes especialistas – é conveniente que os especialistas (os quais podem, em algumas situações, ser laboratórios de referência) tenham competência demonstrável na determinação do (s) mensurando (s) sob ensaio, utilizando métodos validados conhecidos por serem altamente exatos e precisos e comparáveis a métodos de uso geral;

Para a execução do EP da IVM em produto comercial, foi utilizado o requisito *ii* (descrito anteriormente) como metodologia para a atribuição do valor designado. O item 7.5.1, da norma ISO 13528:2015, também afirma que o valor designado pode ser determinado por um único laboratório usando um método de referência. Considerando que o LFDA utiliza um método acreditado na ISO/IEC 17025:2017, o valor designado foi atribuído com base nas análises realizadas pelo LFDA.

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011, também pondera outras informações para aplicação do valor designado, como um procedimento para estabelecer a veracidade (exatidão) definido pelo provedor de EP e um critério para a aceitação de um valor designado em termos de sua incerteza.

Ao analisar as possíveis fontes de incerteza, para a química analítica, é necessário se fundamentar em parâmetros de causa e efeito. Deste modo, a norma ISO/IEC 17025:2017, determina em alguns requisitos que podem ser relacionados a fontes de incerteza, como podemos destacar nos tópicos a seguir:

- Qualificação profissional (item 6.2 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- Condições ambientais (item 6.3 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- Equipamentos (item 6.4 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- Rastreabilidade metrológica (item 6.5 da norma ISO/IEC 17025:2017)
- Seleção, verificação e validação de métodos (item 7.2 da norma ISO/IEC 17025:2017)

Com isso, foi utilizado o software ConfLab<sup>®</sup> (por ser um programa já validado, esta de acordo com o parâmetro 7.2 detalhado acima), para encontrar o maior valor numérico dos resultados para o parâmetro da incerteza, por intermédio das 10 amostras de itens de ensaio (as mesmas amostras que foram escolhidas aleatoriamente no estudo da homogeneidade deste EP), como a incerteza do valor designado ( $u_{des}$ ).

Para encontrar a incerteza padrão combinada do item de ensaio, será necessário combinar os resultados obtidos nos ensaios através das incertezas da homogeneidade ( $u_h$ ), da estabilidade a longo prazo ( $u_{est}$ ) e do valor designado ( $u_{des}$ ).

Já o cálculo para a incerteza expandida é baseado na fórmula de Welch-Satterhwaite. O fator de abrangência ( $k$ ) é dado pela probabilidade de 95% de confiança, que irá multiplicar a somatória quadrática das incertezas. Porém o guia da EURACHEM/CITAC, em sua terceira edição, pelo item 8.3.3, recomenda-se que o valor de  $k$  seja correspondente a 2, conforme demonstrado pela equação abaixo.

$$U = 2 \sqrt{u_{des}^2 + u_{est}^2 + u_h^2} \quad (6)$$

Assim, são apresentados na Tabela 3 os resultados do tratamento estatístico para os valores de incertezas referentes as amostras de ivermectina em produto comercial, que foram utilizadas nesse projeto.

Tabela 3 - Resultados referentes ao estudo da incerteza do EP de Ivermectina.

$u_{homogeneidade}$	$u_{estabilidade}$	$u_{valor\ designado}$	K	U (%)
0,50	3,14	1,96	2	7,47

Fonte: própria.

### 3.6 Elaboração do cálculo estatístico para um número pequeno de laboratórios participantes

Pela norma ISO 13528:2015, é declarado que na realização de um EP para um número pequeno de participantes, deve-se calcular um valor geral e atribuído, de acordo com a metodologia empregada na análise, no qual será independente do número de resultados obtidos. Desta maneira, é usualmente recomendado, proceder através de comparação bilateral, de forma que o julgamento de especialistas ou das normas, com base na aptidão dos resultados desejados sejam aplicados. Existe outra forma de produzir um EP, que é a utilização de materiais de referência certificados, com isso, os participantes seriam investigados através de parâmetros estáveis e conhecidos (IUPAC/CITAC Guide, 2010).

Entretanto, nem sempre são possíveis atender as condições ideais para a elaboração do EP, com isso, os cálculos dos valores atribuídos e a incerteza padrão, devem ser determinados através dos resultados dos participantes. Porém quando existe um número pequeno de participantes, os resultados extremos geralmente não são identificados como *outliers*, mesmo utilizando testes estatísticos já conhecidos. Para um tratamento metrológico com poucos participantes, o manuseio de *outliers* se torne menos importante no desempenho do estudo, pois os valores atribuídos não serão estipulados por consenso e as pontuações serão calculadas baseadas no desvio padrão estabelecido pelos provedores do ensaio interlaboratorial (KOTYCZKA-MORANSKA et al., 2020).

Desta maneira, o cálculo do desvio padrão para avaliação estatística de EP, foi elaborado de acordo com a norma ISO 13528:2015. Utiliza-se do pressuposto apresentado originalmente por *Horwitz* (HORWITZ, 1980), pelo qual a precisão interlaboratorial será analisada em termos de um desvio padrão de reprodutibilidade, conforme definido na equação a seguir:

$$\sigma_H = 0,02 \times c^{0,8495} \quad (7)$$

Sendo:

$\sigma_H$  é o desvio padrão de *Horwitz*;

$c$  é o nível de concentração expresso em fração mássica;

Aplicando as modificações definidas por *Thompson* (THOMPSON, 2000), e também descritas pela norma ISO 13528:2015, em que são considerados diferentes níveis de concentrações do mensurando contido em fração mássica, como demonstrado nas seguintes equações 8, 9 e 10:

$$\sigma_H = 0,02 \times c, \text{ se } c < 1,2 \times 10^{-7} \quad (8)$$

$$\sigma_H = 0,02 \times c^{0,8495}, \text{ se } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \quad (9)$$

$$\sigma_H = 0,02 \times c^{0,5}, \text{ se } c > 0,138 \quad (10)$$

Sendo:  $\sigma_H$  é o desvio padrão de *Horwitz* e  $c$  é o nível de concentração expresso em fração mássica;

A AOAC (Association of Official Analytical Chemists), exemplifica os resultados de concentração, manifestado em fração mássica, que podem ser convenientes com os dados dos parâmetros estatísticos referidos em quaisquer unidades convenientes (por exemplo: %, ppm, ppb, mg/g, µg/g, µg/kg, µg/L, µg/µL, etc.), conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela 4: Critério de aceitação para reprodutibilidade.

Concentração (C)	Fração Mássica (C)	DPR predito (%)
100%	1,0	2
1%	0,01	4
0,01%	0,0001	8
1 ppm	0,000001	16
10 ppb	0,00000001	32
1 ppb	0,000000001	45

Fonte: AOAC, 2016.

Entretanto, a amostra comercial de IVM utilizada para este trabalho, foi a de concentração 1%, o que proporcionou uma fração mássica com o valor adimensional de 0,01 (de acordo com as informações estabelecida pela AOAC e demonstrada na Tabela 4).

### 3.7 Aplicação do método cromatográfico e do ensaio imunoenzimático

Para o EP de IVM em produto comercial, foram realizadas análises laboratoriais, principalmente pelo método de cromatografia líquida de alta performance e também com a utilização de ensaios imunoenzimáticos, por parte de alguns laboratórios participantes deste EP. Com isso, foram desenvolvidos alguns parâmetros analíticos, que serão informados e detalhados, nos próximos parágrafos.

As aplicações dos procedimentos de ensaio cromatográfico utilizados neste trabalho, foram determinadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo LFDA/Campinas, e estão listados a seguir:

- Coluna cromatográfica: Purospher STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 $\mu$ m), Merck, Alemanha;
- Coluna de guarda, C18, 4,0 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m;
- Temperatura da coluna: 30°C;
- Volume injetado: 5  $\mu$ L;
- Fase Móvel: Metanol: Água (83:17, v/v);
- Vazão: 1 mL/min.;

- Detecção: 245 nm (UV);

Resumo da execução do ensaio cromatográfico:

- Preparar as fases móveis e colocá-las no ultrassom por pelo menos cinco minutos;
- Verificar a existência de bolhas de ar no sistema cromatográfico e, caso houver, retirá-las através da purga no sistema;
- Injetar metanol e observar se a linha de base está retilínea e sem interferência do ruído;
- Injetar as amostras de IVM, juntamente com o padrão interno e uma amostra de controle;
- Registrar o resultado das análises;

Para as avaliações dos ensaios da homogeneidade e da estabilidade, foram realizados experimentalmente com a utilização do HPLC, através da análise dos itens de ensaio, que foram preparados conforme informado no item 3.1 deste trabalho. Separou-se 10 frascos para o controle da homogeneidade e 5 frascos para estudo da estabilidade, os quais foram analisados pela adição de padrão interno na curva de calibração, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 5 - Modelo de preparo de amostras para uma análise de IVM.

O que preparar:	Como preparar:	Observações:
Fase Móvel	Metanol, Água (83:17; v/v) (Filtrar e sonicar a fase móvel)	Ultrassom por pelo menos cinco minutos
Preparo da Solução Estoque - SE (1000 µg/mL)	10 mg do padrão em 10mL de metanol	Corrigir o peso do padrão de acordo com a pureza
Preparo da Solução De Trabalho – ST (200 µg/mL)	5mL da SE em balão de 25mL, completar com metanol	N.A.
Preparo das Amostras	Agitar o frasco manualmente por cinco minutos; Amostra 1%: 1mL em balão de 10mL Filtrar: membrana de 0,22 ou 0,45µm	Realizar o procedimento em duplicata
Preparo das curvas em balão de 10 mL	P0: 400µL amt + MeOH P1: 400µL amt + 250µL da ST + MeOH P2: 400µL amt + 500µL da ST + MeOH P3: 400µL amt + 750µL da ST + MeOH P4: 400µL amt + 1000µL da ST + MeOH	Preparar cada curva utilizando uma das amostras diluídas na etapa anterior
Controle de Qualidade	Preparar a amostra CQ e a curva de acordo com as etapas anteriores	N.A.

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Laboratório de Medicamentos Veterinários e Agrotóxicos (MVA), 2019.

Já os ensaios imunoenzimáticos, foram aplicados pelos participantes, através do kit comercial da empresa *r-biopharm*<sup>®</sup>, para análise de IVM, que contém, de acordo com o seu catálogo, seis padrões internos nas respectivas concentrações: 1,25 ng/mL; 2,5 ng/mL; 5,0 ng/mL; 10,0 ng/mL; 25,0 ng/mL e 50 ng/mL.

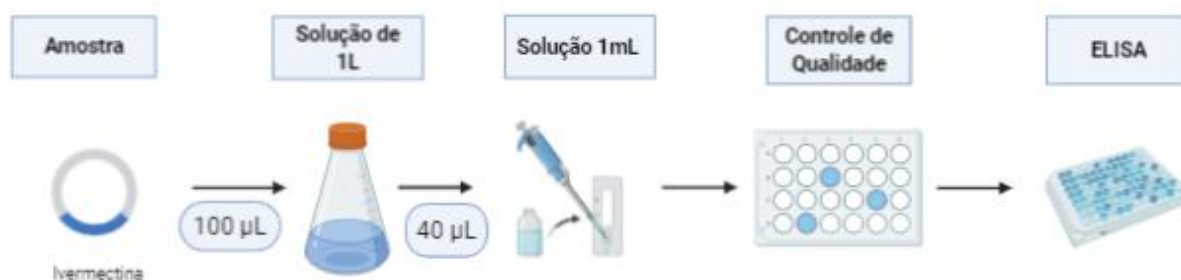
O kit comercial de IVM, consiste em uma placa de microtitulação contendo 12 tiras com 8 poços em cada tira, que será revestida com anticorpos de coelho para Imunoglobulina G (IgG) de coelho. Também apresenta anticorpo de IVM, marcado com peroxidase de rábano (-HRP) e soluções padrões de IVM.

O processo de análise é baseado no método ELISA do tipo competitivo, pelo qual, após um período de incubação, os reagentes que não conseguirem se ligar são removidos em um processo de lavagem. Com isso, o conjugado de IVM-HPR é visualizado, depois da adição de uma solução cromogênica, formando-se um produto colorido.

Para interperer a análise de ensaio imunoenzimático, deve-se adicionar o ácido sulfúrico ao poço de microtitulação, de modo que a intensidade de cor é medida fotometricamente na frequência de 450 nm. E assim, o registro dos resultados da densidade óptica, será inversamente proporcional a concentração de IVM na solução.

Entretanto, para o processo de análise da IVM em produto comercial, deve-se planejar uma metodologia em que a concentração final de IVM encontra-se na faixa dos padrões internos encontrados no kit ELISA. No caso da amostra de item de ensaio, que está na concetração de 1%, o laboratório deverá diluir a solução para que consiga uma concentração final de 40 ng/mL, conforme demonstrado na figura abaixo.

Figura 18 - Demonstração da metodologia usada para análise de IVM em ELISA.



Fonte: própria.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para rastrear o desempenho deste EP, foi necessário avaliar estatisticamente os resultados das análises de cada laboratório participante. Mediante o preenchimento de um formulário de registro de atividades (contido no apêndice C) por via eletrônica. Desta maneira, foi realizado o estudo dos parâmetros de índice  $z$  e índice  $zeta$ , por consequência, foi utilizado o software ConfLab<sup>®</sup>, para auxílio nos cálculos de avaliação da incerteza dos resultados dos laboratórios participantes. Além do estudo dos itens de ensaio, conforme sua homogeneidade e estabilidade, ambos realizados no LFDA da cidade de Campinas/SP.

### 4.1 Ensaio da Homogeneidade/Valor Designado

Para o estudo da homogeneidade, foram avaliados 10 itens de ensaio e suas concentrações estão descritas na Tabela 6 (todas as amostras foram analisadas conforme descrito pela Tabela 5). Foi encontrado um resultado médio de 0,92% da concentração de IVM, condizente com a concentração de 1% de IVM do produto comercial.

Tabela 6 - Resultados obtidos a partir do ensaio de homogeneidade.

Identificação da Amostra	Concentração (%)	
	Resultado A	Resultado B
14	0,9133	0,9192
2	0,9102	0,9161
9	0,9116	0,9174
16	0,9094	0,9152
8	0,9093	0,9151
13	0,9213	0,9272
15	0,9076	0,9135
7	0,9091	0,9150
10	0,9122	0,9181
18	0,9272	0,9330

Fonte: própria.



A norma ISO 13528:2015, aborda um estudo de homogeneidade através do cálculo do desvio padrão dos itens de ensaio e para isso a representaremos no apêndice B deste documento. Para um melhor planejamento de um ensaio de homogeneidade, o desvio padrão de proficiência será o de *Horwitz*. Os resultados estatísticos do estudo da homogeneidade estão detalhados na Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação estatística para o ensaio da homogeneidade.

<b>N° de amostras</b>	10
<b>S<sub>x</sub></b>	0,00625
<b>S<sub>w</sub></b>	0,00414
<b>S<sub>s</sub></b>	0,00553
<b>σ<sub>H</sub></b>	0,04
<b>0,3 σ<sub>H</sub></b>	0,012
<b>Resultado</b>	Homogêneo

Fonte: própria. Onde: S<sub>x</sub> = desvio padrão das amostras; S<sub>w</sub> = desvio padrão dentro das amostras; S<sub>s</sub> = desvio padrão entre as amostras e σ<sub>H</sub> = desvio padrão de *Horwitz*

Para a norma ISO 13528, as amostras são consideradas homogêneas, quando atenderem o critério estabelecido pela equação a seguir:

$$S_S \leq 0,3\sigma_H \quad (11)$$

Sendo:

S<sub>S</sub> é o desvio padrão entre as amostras;

σ<sub>H</sub> é o desvio padrão de *Horwitz*;

Entretanto, para a atribuição de valor designado, foi aplicado no software ConfLab<sup>®</sup> os resultados das amostras utilizadas para a avaliação da homogeneidade. As medidas de incerteza padrão dos 10 itens de ensaio, são informadas na tabela a seguir.

Tabela 8 - Resultados da incerteza padrão do valor designado.

Identificação da Amostra	Incerteza Padrão (%)	
	Resultado A	Resultado B
14	0,67	0,81
2	0,71	0,84
9	0,60	0,75
16	0,98	1,07
8	0,60	0,75
13	1,75	1,80
15	0,78	0,90
7	0,80	0,92
10	0,89	0,99
18	1,94	1,98

Fonte: própria. Onde: Os resultados descritos em vermelho, foram utilizados como valores de referência para a incerteza padrão do valor designado deste EP.

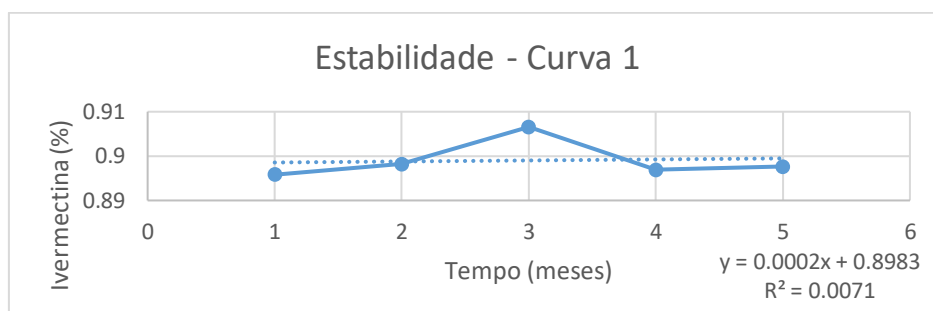
Com isso, foi aplicado o maior valor numérico dos resultados descritos na Tabela 08, como incerteza padrão do valor designado.

## 4.2 Ensaio da Estabilidade

Realizou-se um estudo de estabilidade dos itens de ensaio em um período de longo prazo, através do método isócrono, para assim assegurar as condições de repetibilidade das análises. Todo mês, o provedor desse EP retirou os itens de ensaio da temperatura de armazenamento e foram mantidos em temperatura ambiente. Com isso, foram iniciadas as medições dos analitos. Esse procedimento foi repetido num período de cinco meses e analisado através de cromatografia líquida, em triplicata.

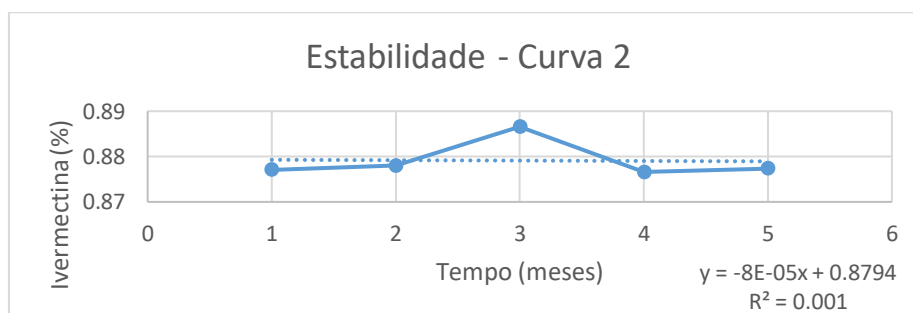
Para uma melhor avaliação deste ensaio de estabilidade, optou-se por realizar duas curvas de calibração, ambas com adição do padrão interno, e realizadas sob o mesmo procedimento e condições cromatográficas que as amostras analisadas para o estudo da homogeneidade. As Figuras a seguir, demonstram a estabilidade da ivermectina em produto comercial em relação ao período de 5 meses.

Figura 19 - Gráfico do ensaio da estabilidade, realizado pelo estudo da concentração de ivermectina x tempo, para primeira curva de calibração.



Fonte: própria.

Figura 20 - Gráfico do ensaio da estabilidade, realizado pelo estudo da concentração de ivermectina x tempo, para segunda curva de calibração.



Fonte: própria.

Os resultados obtidos a partir dos tratamentos estatístico, e apresentados pela Tabela 9, indicam que o valor do intervalo de confiança para o coeficiente angular se encontra próximo a zero (0), com isso, foi finalizado o ensaio da estabilidade.

Tabela 9 - Resultados obtidos a partir do ensaio de estabilidade.

	Coeficiente Angular	Erro Padrão	Intervalo de Confiança		Resultado
			Inferior	Superior	
Ensaio – Curva 1	0,00023	0,00157	-0,00477	0,00523	Estável
Ensaio – Curva 2	-0,00008	0,00153	-0,00496	0,00479	Estável

Fonte: própria.

### 4.3 Análise estatística dos resultados

A norma ISO 13528:2015 apresenta uma nota (contida em seu anexo D.1.3.1), que conjectura como eficiência intermediária o cálculo robusto, utilizando a mediana como o valor atribuído, para um número de participantes inferiores a 18.

Contudo, considere-se que para um número de laboratórios participantes superiores a 12, o cálculo robusto seja aceitável, caso o critério da equação a seguir seja estabelecido.

$$u(x_{EP}) = 1,25 \cdot \frac{S^*}{\sqrt{p}} \quad (12)$$

Sendo  $S^*$  é o desvio padrão robusto dos resultados. Neste caso, o resultado de um participante, é a média de todas as suas análises no decorrer do EP. Já  $p$  é o número de participantes.

De acordo com a norma ISO 13528, os estimadores como a mediana deve ser aplicável para até 2 participantes. Já para uma quantidade exata de 2 participantes, a média deverá ser adotada, e para um intervalo de 3 a 5 laboratórios participantes, o critério da mediana é mais eficiente. Além disto, para um baixo conjunto de dados, deve-se considerar a maior dispersão disponível dos resultados. Por isso, as recomendações desta norma para os cálculos robustos, em um conjunto com baixo número de participantes, são demonstrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Orientações para parâmetros de dispersões robustas em caso de poucos participantes.

Número de participantes	Avaliação do desvio padrão
$p = 2$	$\frac{ x_1 - x_2 }{\sqrt{2}}$
$p = 3$	$x_1, x_2 - \text{resultado do ensaio}$
$p \geq 4$	M-estimativo do desvio padrão

Fonte: Adaptado da norma ISO 13528:2015.

Para um conjunto envolvendo pequenos grupos de resultados, é crucial que o avaliador se atente a resistir a qualquer tendência apresentada por um pequeno agrupamento de resultados discrepantes. Por isso, a ISO 13528 sugere alguns estimadores para minimizar os erros provocados na avaliação estatística dos resultados, entre os indicadores estão o MADe, nIQR, Algoritmo A e Q/Qn.

Em caso de uma incerteza padrão do valor atribuído  $u(x_{EP})$  for grande em comparação ao valor de desvio padrão robusto de ensaio interlaboratorial, os laboratórios participantes recebem um sinal de alerta, e conseqüentemente ações corretivas podem ser realizadas. Para isso, a norma ISO 13528:2015 sugere o seguinte critério em relação ao cálculo da incerteza dos resultados desse EP:

$$u(x_{EP}) < 0,3\sigma_{EP} \quad (13)$$

*Nota* :  $0,3 \sigma_{EP}$  é equivalente a  $0,1 \delta_E$  quando  $|Z| \geq 3,0$  gera um sinal de ação.

Sendo  $\sigma_{EP}$  e  $\delta_E$  denotam o desvio padrão robusto para a estimativa de EP e o critério de erro máximo admissível para diferenças, respectivamente. Já o símbolo  $Z$ , representa a pontuação usada para avaliação da eficiência do EP.

As avaliações de testes estatísticos para remoção de *outliers* são informativas, contudo, não devem ser utilizadas para eliminar dados, exclusivos de um conjunto de resultados. Com isso, deve-se notar e averiguar a fonte e conhecer sua causa, ou seja, no caso de uma causa não for aprendida, os valores podem ser examinados com e sem a remoção de *outliers* para identificar se a presença do conjunto de dados é crucial para a análise (KOTYCZKA-MORANSKA et al., 2020).

Por essa razão, foi utilizado como critério de avaliação para a remoção de *outliers* o teste de Grubbs, como recomendado pela norma ISO 13528:2015. O teste de Grubbs, é definido pela comparação do desvio do valor suspeito em relação à média de todas as análises executadas  $(\bar{x})$ , dividido pelo desvio padrão de todos os resultados do mensurando ( $s$ ). Para descobrir o valor suspeito, utiliza-se de tabela com os valores críticos de  $G$ . A fórmula de Grubbs é detalhada na equação 14.

$$G = \frac{|valor\ suspeito - \bar{x}|}{s} \quad (14)$$

Pressupõem-se, que para um EP com número de participante inferior a 18, é estimado como indicativo de avaliação de desempenho o índice  $Z$ , conforme detalhado na equação a seguir.

$$Z = \frac{(x_i - x_{EP})}{\sigma_{EP}} \quad (15)$$

Sendo:

$X_i$  é a média aritmética dos resultados obtidos pelo laboratório participante;

$X_{EP}$  é o valor da média robusta dos laboratórios participantes;

$\sigma_{EP}$  é o desvio robusto.

Nota-se que o desvio robusto de EP será o desvio elaborado por *Horwitz*, conforme descrito na norma ISO 13528:2015. Para avaliação do índice  $Z$ , será reportada pelo seguinte critério:

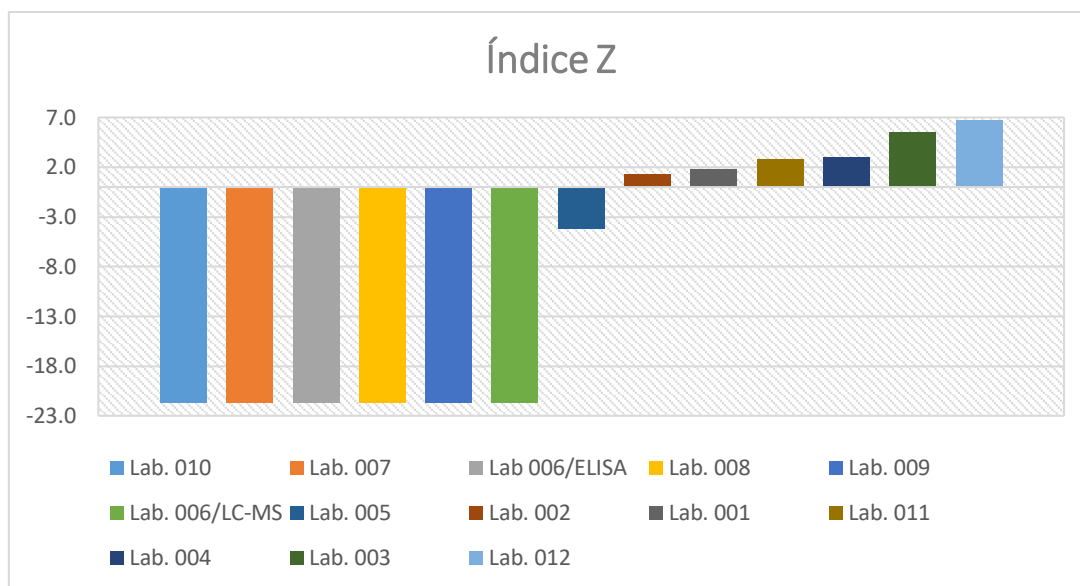
Se  $|z| \leq 2$ : indica um resultado satisfatório do laboratório;

Se  $2 < |z| < 3$ : indica um resultado questionável e estima um sinal de alerta;

Se  $|z| \geq 3$ : indica um resultado insatisfatório e estima um sinal de ação;

Com isso, é possível certificar o desempenho de cada laboratório participante através da utilização de gráfico de barras, após o cálculo do índice  $Z$ , conforme evidenciado na Figura 21.

Figura 21- Gráfico com os resultados dos laboratórios participantes a partir da avaliação do índice Z.



Fonte: própria.

- Índice Zeta

Os valores de incerteza obtidos pelos participantes do EP foram adquiridos a partir do emprego do índice *zeta* ( $\zeta$ ) conforme indicado na norma ISO 13528:2015, que são detalhados na Equação 16.

$$\zeta_i = \frac{x_i - x_{EP}}{\sqrt{u^2(x_i) + u^2(x_{EP})}} \quad (16)$$

Sendo  $u(x_i)$  é a incerteza padrão do laboratório participante calculada pelos próprios resultados  $x_i$  e o  $u(x_{EP})$  e a incerteza do valor atribuído  $x_{EP}$ .

A compreensão dos resultados do índice *zeta* será similar ao do índice Z, ou seja, com valores de exatidão menores que 3 para que os resultados desse ensaio sejam considerados confiáveis.

Nota-se que valores de índices *zeta* persistentemente baixos, podem denunciar uma inconclusiva avaliação da incerteza. Por isso, recomenda-se avaliar os índices *Z* e *zeta* em conjunto.

No caso dos laboratórios participantes obtiverem índices  $Z \geq 3$  e  $zeta < 2$ , isso evidencia que os participantes do EP obtiveram uma regularidade nos valores dos resultados de incerteza, porém não servem como desempenho esperado para o programa de ensaio de proficiência. É o caso, por exemplo, de um laboratório utilizar métodos de triagem em seus procedimentos de análises, enquanto os outros laboratórios participantes utilizam métodos quantitativos. A norma ISO 13528:2015 não recomenda nenhuma ação corretiva, caso o participante desse EP considerar que seus resultados de incerteza sejam satisfatórios.

#### **4.4 Resultado dos laboratórios participantes de EP de Ivermectina**

Os laboratórios foram convidados a participar desse projeto de acordo com um resumo do protocolo de EP (ver apêndice A). No qual obtivemos uma adesão de 15 laboratórios, sendo 12 laboratórios nacionais e 4 laboratórios internacionais (localizados na Áustria, Argentina, no Paraguai e no Peru). Infelizmente, os laboratórios internacionais foram excluídos da rodada de EP, por causa da variante do covid-19, em que os aeroportos estavam fechados para envio de amostras para os países citados nesse trabalho.

Para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, foi necessário avaliar estatisticamente os resultados das análises dos itens de ensaio através da estimativa do valor predito, identificada pela média da concentração dos resultados do ensaio de homogeneidade e com o auxílio do teste de Grubbs para a detecção de possíveis *outliers*. Gerando um resultado do valor predito de 0,8687. Já o cálculo da incerteza utilizado como segundo critério estatístico de avaliação do EP foi desenvolvido pelo provedor, baseado em todos os parâmetros detalhado pelo tópico 3.5.

Nota-se que, para um pequeno conjunto de dados, o critério de incerteza do valor atribuído  $u(x_{EP})$ , informado na equação 13, é aplicável sempre que possível. Porém a norma ISO 13528, não recomenda a utilização deste critério, no caso de um desvio padrão



com os resultados produzidos pelos laboratórios e com um número limitante de participantes ( $p \leq 12$ ).

Entretanto, foi possível obter os valores corretos para a estimativa da incerteza dos laboratórios participantes deste EP através da utilização da ferramenta de software ConfLab<sup>®</sup>, (somente para os participantes que forneceram os dados de curva de calibração). Os resultados estatísticos do desempenho dos laboratórios participantes, com os valores dos índices *z* e *zeta*, são detalhados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados dos laboratórios participantes seguindo os índices *z* e *zeta*.

Código do Laboratório	Índice Z	Índice Zeta	Índice Zeta (ConfLab)	Incerteza Exp (%) Calculado pelo laboratório	Incerteza Exp (%) Calculado pelo ConfLab
Lab. 001	1,7	1,05	*	1,27	*
Lab. 002	1,3	**	0,54	**	7,62
Lab. 003	5,5	3,33	*	1,21	*
Lab. 004	2,9	1,22	1,60	0,71	3,52
Lab. 005	-4,2	**	- 0,78	**	29,08
Lab.006/ELISA	-21,7	- 13,36	*	0,15	*
Lab. 006/ LC-MS	-21,7	- 13,35	*	0,15	*
Lab. 007	-21,7	- 13,36	- 13,36	0,05	6,98
Lab. 008	-21,7	- 13,36	- 13,36	0,04	5,26
Lab. 009	-21,7	- 13,36	- 13,36	0,13	11,02
Lab. 010	-21,7	- 13,37	- 13,37	0,03	11,50
Lab. 011	2,8	**	*	**	*
Lab. 012	6,7	**	3,39	**	4,00

Fonte: própria. Azul = questionável; Vermelho = insatisfatório. \* o laboratório participante não informou os dados da curva de calibração; \*\* o laboratório participante não informou os valores de sua incerteza (%)

Em síntese da Tabela 10, podemos compreender que ao avaliar somente os valores encontrados pelo índice *z*, são demonstrados que exclusivamente 2 laboratórios conseguiram resultados satisfatórios, 2 laboratórios com resultados questionáveis e 8 laboratórios com resultados insatisfatórios. O grupo de participantes com os códigos 006, 007, 008, 009 e 010, pertencem a mesma rede de laboratórios.

Já para considerar os dados referentes ao índice *zeta*, o laboratório de número 004, conseguiria ser aprovado pelo EP, o que não ocorreria com o laboratório de código 011,

pois o mesmo não corroborou com as informações de curvas de calibração e o valor de incerteza relativa aos seus resultados. Além disso, é notável a importância de se avaliar conjuntamente os valores de índice  $z$  e índice *zeta*. Portanto, analisaremos todos os laboratórios participantes desse ensaio, de modo individual e com as devidas justificativas de seus resultados.

- Laboratório 001

O laboratório 001 fez suas análises experimentais pelo método tradicional da cromatografia líquida e possui uma avaliação do critério de índice  $z$  satisfatório e com uma incerteza percentual calculada pelo próprio participante na faixa de 1,27%. E desta maneira, obteve classificação satisfatória pelo índice *zeta*.

Contudo, apesar deste laboratório não informar os dados da sua curva de calibração para utilizar na consideração do índice *zeta* com o resultado de incerteza percentual calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, o laboratório 001 obteve um ótimo desempenho no EP de IVM em produto comercial.

- Laboratório 002

Para o participante de código 002, os ensaios foram realizados através do kit ELISA para padrões de IVM, que seguiram uma metodologia experimental indicada pelo provedor do EP, o que proporcionou um bom desempenho do laboratório neste trabalho.

Com isso, os dados da curva de calibração foram retirados do kit ELISA, cedido pelo laboratório participante. Deste modo, os valores de absorbância seguiram com os resultados avaliados de acordo com o Log da concentração da amostra. Tais dados são informados na tabela 12.

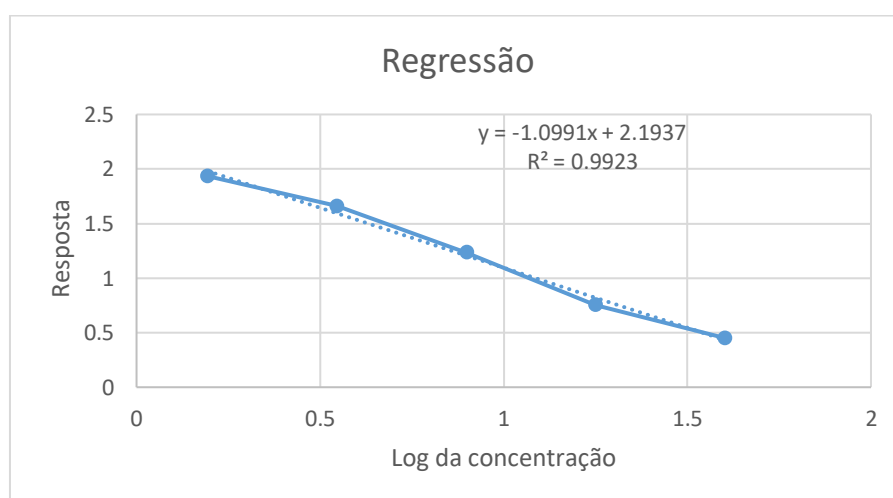
Tabela 12 – Resultados apresentados pelo participante de código 002 para a curva de calibração.

<b>Valor da concentração (<math>\frac{ng}{mL}</math>)</b>	<b>Log da concentração</b>	<b>Valor da absorbância</b>
1,560	0,193	1,935
3,510	0,545	1,659
7,900	0,898	1,236
17,780	1,250	0,755
40,000	1,602	0,451

Fonte: própria.

Para uma melhor visualização dos dados da curva de calibração, foi elaborado um gráfico de regressão linear e foi obtido um valor de  $R^2$  de 0,9923. Essas informações estão na Figura 22.

Figura 22- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 002.



Fonte: própria.

Porém este participante não enviou o seu valor de incerteza percentual, por isso, só utilizamos o valor de incerteza expandida calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, o qual é informado na Tabela 13.

Tabela 13 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 002.

<b>Incerteza Padrão (%)</b>	<b>Fator K Expansão</b>	<b>Incerteza Expandida (%)</b>
3,81	2	7,62

Fonte: própria.

Através deste resultado, foi calculado o índice *zeta*, em que o laboratório obteve um resultado considerado satisfatório. Portanto, mesmo não informando o valor de incerteza expandida de suas análises, o laboratório obteve um desempenho considerado satisfatório.

- Laboratório 003

O laboratório 003 não conseguiu obter uma avaliação satisfatória no EP, pois seu resultado referente ao índice *z* alcançou um valor superior a 2, é considerado um alerta para o participante, que deverá apresentar um sinal de ação para que suas próximas avaliações estejam na faixa do aceitável para os parâmetros de índice *z*.

Outra informação importante é que mesmo o participante apresentando um valor baixo de incerteza percentual, seu rendimento pelo critério de avaliação de índice *zeta* também foi insatisfatório. O método de análise deste laboratório foi com a utilização do HPLC e com uma fase móvel contendo 530 mL de Acetonitrila, 275 mL de Metanol e 195 mL de Água purificada, o que demonstra que o participante não utilizou o ensaio estipulado pelo provedor de EP e sim um método de análise experimental próprio.

- Laboratório 004

A avaliação do laboratório 004 mostrou-se questionável com o parâmetro de índice *z*, porém com auxílio dos valores de incerteza e dados de calibração fornecidos pelo próprio laboratório, foi possível estipular os parâmetros de índice *zeta* e também do índice *zeta* com o uso da incerteza calculada pelo software ConfLab<sup>®</sup>. Além disso, os dados da curva de calibração foram descritos pela tabela 14.

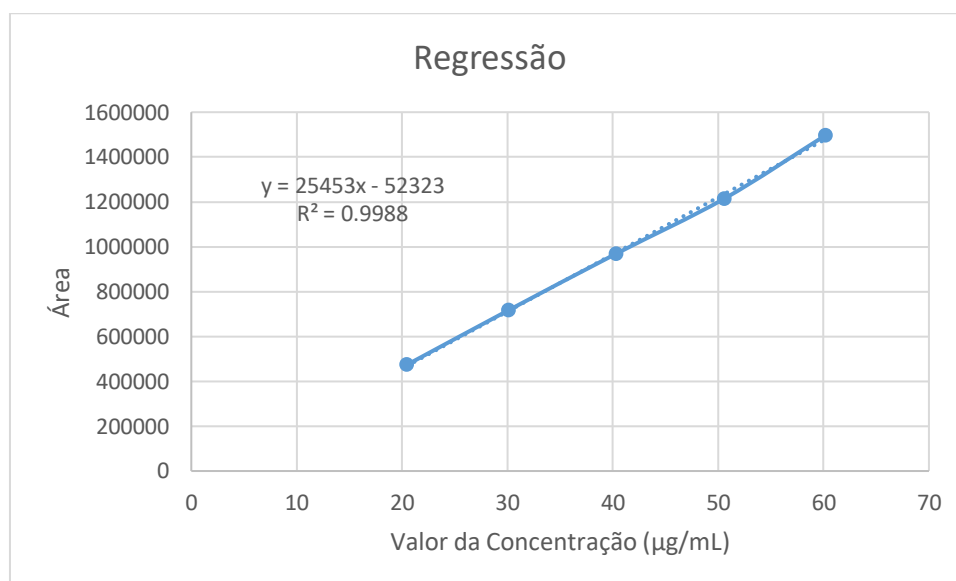
Tabela 14 – Resultados apresentados pelo participante de código 004 para a curva de calibração.

<b>Valor da concentração (<math>\frac{\mu g}{mL}</math>)</b>	<b>Área</b>
20,471	473856,302
30,105	716773,685
40,341	969546,837
50,576	1215087,560
60,210	1497467,441

Fonte: própria.

Para compreensão destas informações de curva de calibração, a Figura 23 representa a regressão linear, com um gráfico de área versus o valor de concentração na unidade de  $\mu g/mL$ .

Figura 23- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 004.



Fonte: própria.

Com ajuda do software ConfLab<sup>®</sup> são avaliados os valores de incerteza padrão, incerteza expandida e fator K de expansão, conforme demonstrado pela Tabela 15. Para avaliação do índice *zeta*, utilizou-se o resultado de incerteza expandida em porcentagem.

Tabela 15 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 004.

<b>Incerteza Padrão (%)</b>	<b>Fator K Expansão</b>	<b>Incerteza Expandida (%)</b>
1,76	2	3,52

Fonte: própria.

Por isso, podemos observar quem em conjuntura os índices demonstraram uma melhora na avaliação deste laboratório, sem a necessidade de um sinal de alerta. Comprovando a necessidade do laboratório em calcular corretamente os seus dados de incerteza expandida e de realizar um ensaio laboratorial com profissionais treinados (neste caso, foi empregado um equipamento para cromatografia líquida).

- Laboratório 005

Este participante foi o que apresentou os resultados mais controversos, desse modo, estudaremos com uma maior cautela todos os seus dados apresentados para o EP. Os experimentos do laboratório 005 foram realizados por um cromatógrafo líquido, acoplado a um espectrômetro de massas, o que demonstrou um alto nível de precisão das suas análises.

O resultado discutível apresentado por esse laboratório, o qual teve a sua reprovação a partir da avaliação do índice  $z$ , casou uma certa preocupação, provocando um sinal de alerta, que foi suspenso, quando se avalia o índice zeta, utilizando o valor de incerteza expandida (calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>), demonstrado na Tabela 16.

Tabela 16 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 005.

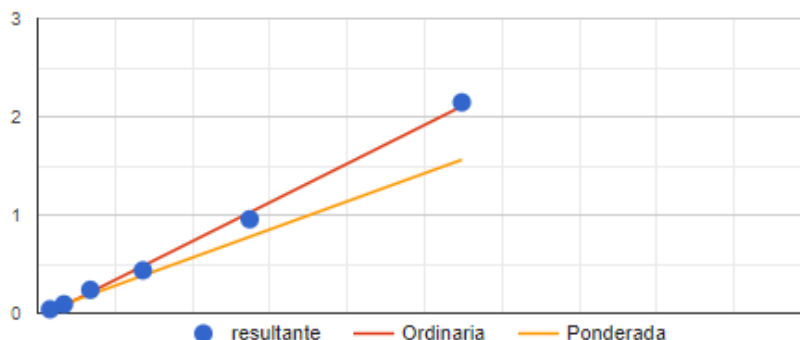
<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
14,54	2	29,08

Fonte: própria.

Para avaliação gráfica, o participante forneceu os dados da sua curva de calibração, com adição de padrão interno, através de uma regressão do tipo ponderada. Entretanto, em suas análises, o laboratório descreveu uma curva com 6 níveis de concentração, pelo qual, os dois primeiros níveis realizados em duplicatas e os 4 níveis restantes de concentração, foram injetados em unicata.

Com o auxílio do software ConfLab<sup>®</sup>, conseguimos visualizar como são as curvas de regressão ponderada e ordinária, já calculados com os valores do padrão interno. O gráfico foi elaborado pelo software, e ilustrado na Figura 24.

Figura 24- Gráfico que apresenta a regressão ordinária e ponderada para os resultados do laboratório 005.



Fonte: ConfLab®.

Também podemos observar os resultados da regressão ordinária e ponderada, pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), de acordo com a Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados do  $R^2$  para os critérios de regressão ordinária e ponderada

<b>Parâmetros</b>	<b>Regressão Ordinária</b>	<b>Regressão Ponderada</b>
Equação	$Y = 0,08x - 0,06$	$Y = 0,06x - 0,01$
Coefficiente de correlação (r)	0,9984	1,0000
Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	0,9969	1,0000

Fonte: ConfLab®.

Se pensarmos no significado de linearidade, o guia EURACHEM/CITAC em sua terceira edição, caracteriza como uma propriedade importante de ensaios para realizar medições em uma faixa de concentração, além de ser uma especialidade geralmente não quantificada, porém pode ser verificada utilizando testes de significância para não linearidade. Para isso, o software ConfLab®, fornece auxílio com recursos estatísticos, para avaliação da linearidade.

O software, também avalia a presença de heterocedasticidade dos valores de regressão de mínimos quadrados, através do teste de *Cochran*. Para o laboratório 005, suas análises apresentaram uma tendência heterocedastica, de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 18 – Avaliação da homocedasticidade para o laboratório 005.

<b>Avaliação da Homocedasticidade (teste Cochran)</b>				
Calculado	0,98	Tabelado	0,78	Heterocedastico

Fonte: própria.

Portanto, com o desempenho comprovado matematicamente, pelo alto valor de incerteza, calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, o que demonstra que seus dados de calibração, tratados através de uma regressão ponderada, foram realizados de modo a garantir a linearidade e exatidão dos seus resultados, por isso, não precisará de um sinal de ação para este laboratório.

Destaca-se que este laboratório, apesar de ser reprovado pelo índice  $z$  (o que identifica um problema na exatidão do resultado), na verdade foi aprovado pelo índice *zeta* devido a uma alta incerteza da sua curva de calibração, levando a concluir que o laboratório fornece resultados corretos porém com uma alta incerteza, a qual poderia ser melhorada realizando um melhor tratamento da curva de calibração com mais pontos de calibração, maior número de replicatas por ponto de calibração ou uma menor faixa de trabalho.

- Laboratório 006

Para o laboratório de códigos 006, foram realizados experimentos utilizando cromatografia líquida e ensaios em ELISA. Contudo, ambos os métodos apresentaram um valor discrepante para o critério de índice  $z$ . O que demonstra que a metodologia para análise de IVM, depende de fatores como condições de equipamento, utilização de padrão interno dentro do prazo de validade, condições laboratoriais adequadas, equipamentos calibrados e treinamento profissional adequado.

Este participante também informou o seu valor de incerteza expandida, em que apresenta um valor mais baixo que os demais laboratórios (excluindo os laboratórios de código 007,008, 009 e 010). Desta maneira, o laboratório recebeu um sinal de alerta, no qual medidas preventivas devem ser providenciadas, para que ocorra uma conformidade em uma nova rodada de EP.



- Laboratório 007

Este participante desempenhou análises pelo método de ELISA, em que gerou dados para curva de calibração, que posteriormente foram utilizados para o cálculo da incerteza expandida, com auxílio do software ConfLab<sup>®</sup>. Os valores experimentais, estão detalhados na tabela a seguir.

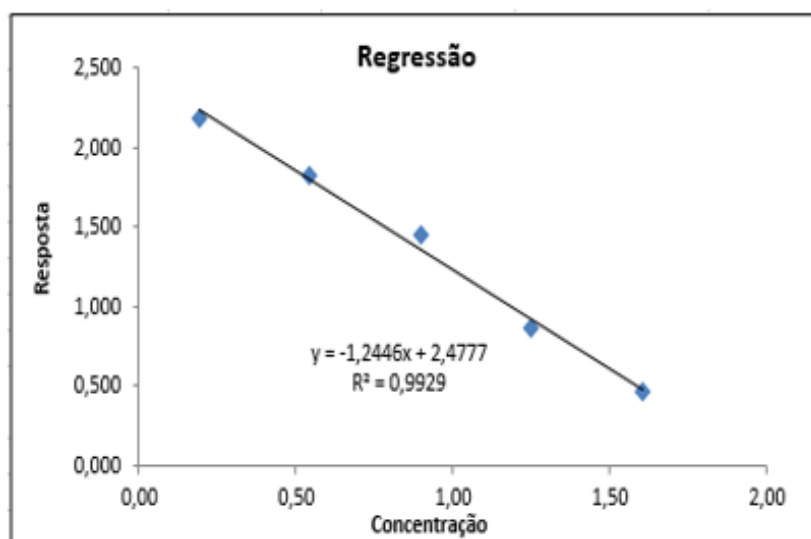
Tabela 19 – Resultados apresentados pelo participante de código 007 para a curva de calibração.

<b>Valor da concentração (<math>\frac{ng}{mL}</math>)</b>	<b>Log da concentração</b>	<b>Valor da absorbância</b>
1,560	0,193	2,184
3,510	0,545	1,831
7,900	0,898	1,445
17,780	1,250	0,871
40,000	1,602	0,472

Fonte: própria.

O gráfico da regressão linear, esta expressado na Figura 25, gerou um resultado de coeficiente de determinação de 0,9929. Embora, tenha obtido um ótimo desempenho em sua curva de calibração, este laboratório apresentou uma incerteza expandida pelo software ConfLab<sup>®</sup>, na ordem de 6,98%, e pelas contas do próprio participante, a incerteza é de 0,05%.

Figura 25- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 007.



Fonte: própria.

A Tabela 20 informa com mais clareza os resultados de incerteza padrão e incerteza expandida, ambos os critérios estão em porcentagem, como unidade de medida.

Todos estes dados foram estatisticamente produzidos por software.

Tabela 20 – Dados calculado pelo software ConfLab®, para avaliação do laboratório 007.

<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
3,49	2	6,98

Fonte: própria.

Ao avaliar o índice  $z$ , o participante confirma o seu desempenho como insatisfatório para esse EP de IVM em produto comercial, além de ter subestimado a incerteza de medição. Devido ao alto valor encontrado para os índices  $z$  e  $zeta$ , pode ter ocorrido algum erro grosseiro durante a análise, como erros de diluição por exemplo.

- Laboratório 008

Como detalhado pelo laboratório de código 007, este também avaliou seus experimentos por ELISA, e através da curva de calibração, notamos uma semelhança com os resultados dos participantes que fazem parte da rede de laboratórios de códigos 006 a 010 deste ensaio interlaboratorial. Os dados para a curva de calibração, estão demonstrados na tabela a seguir.

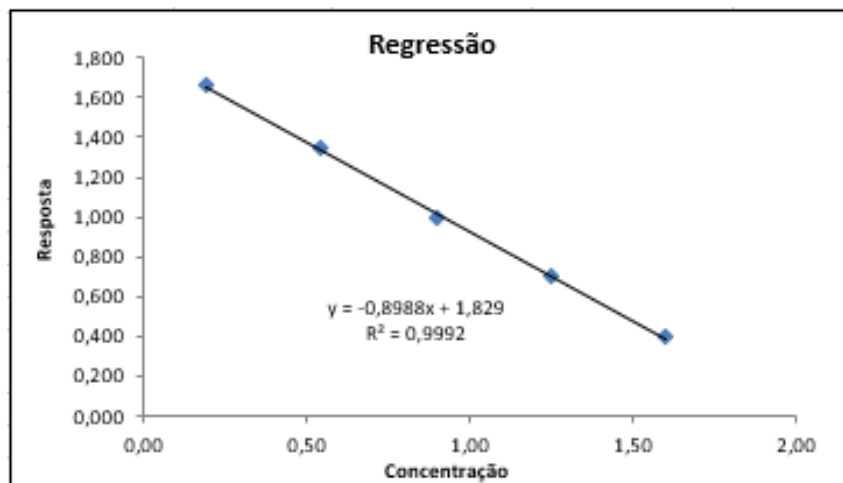
Tabela 21 – Resultados apresentados pelo participante de código 008 para a curva de calibração.

<b><i>Valor da concentração (<math>\frac{ng}{mL}</math>)</i></b>	<b><i>Log da concentração</i></b>	<b><i>Valor da absorbância</i></b>
1,560	0,193	1,660
3,510	0,545	1,348
7,900	0,898	0,998
17,780	1,250	0,708
40,000	1,602	0,397

Fonte: própria.

Pelo gráfico a seguir, o laboratório apresentou um bom resultado de  $R^2$ , cujo valor foi de 0,9992. O que demonstra que o método de ensaio ELISA é confiável para análises com medicamentos veterinários.

Figura 26- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 008.



Fonte: própria.

E novamente foi considerado o critério de índice *zeta*, com os conceitos de incerteza expandida, fornecidos pelo próprio laboratório e também pelo software ConfLab<sup>®</sup>. Para processo de informação, a Tabela 22 fornece os resultados do software.

Tabela 22 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 008.

<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
2,63	2	5,26

Fonte: própria.

Portanto, mesmo com um valor de incerteza expandida de 5,26%, os resultados de avaliação dos índices *z* e *zeta*, em conjunto, deixam o laboratório com um sinal de alerta, o participante também desvalorizou a incerteza de medição. O qual, apresentou um alto valor para os índices *z* e *zeta*, devido algum erro grosseiro ocorrido durante a análise. Podemos exemplificar os erros grosseiros, através da imprecisão da diluição do item de ensaio.

- Laboratório 009

Para este laboratório, os valores de índice  $z$  foram bem abaixo do esperado, e deste modo, necessitamos novamente dos resultados da curva de calibração, para o cálculo da incerteza expandida. Os valores da curva de calibração estão informados na Tabela 23.

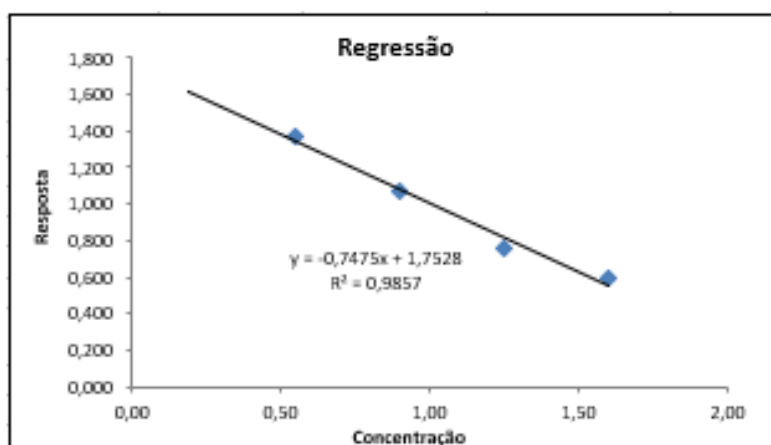
Tabela 23 – Resultados apresentados pelo participante de código 009 para a curva de calibração.

<b>Valor da concentração (<math>\frac{ng}{mL}</math>)</b>	<b>Log da concentração</b>	<b>Valor da absorbância</b>
1,560	0,193	*
3,510	0,545	1,368
7,900	0,898	1,075
17,780	1,250	0,764
40,000	1,602	0,594

Fonte: própria.

A regressão linear finalizou em um resultado de coeficiente de determinação perto da faixa do aceitável. Porém, não o suficiente para garantir um bom desempenho para um ensaio interlaboratorial.

Figura 27- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 009.



Fonte: própria.

Como já discutido anteriormente, os dados de incerteza padrão e incerteza expandida, foram analisados pelo software ConfLab<sup>®</sup>, e assim, detalhados na Tabela 24.

Tabela 24 – Dados calculado pelo software ConFLab®, para avaliação do laboratório 009.

<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
5,51	2	11,02

Fonte: própria.

Contudo, examinando os índices  $z$  e  $zeta$  ao mesmo tempo, este participante continua com a sua avaliação insatisfatória, além de ter subestimado a incerteza de medição, necessitando uma ação corretiva por parte desse laboratório. Igualmente aos laboratórios de código 008 e 009, este participante também apresenta erros grosseiros durante as análises.

- Laboratório 010

O último dos laboratórios do grupo que obteve resultados divergentes para índice  $z$ , também realizou ensaios com ELISA e deste modo, auxiliou o cálculo da incerteza expandida, com o fornecimento dos seus resultados de curva de calibração. A Tabela 25 aborda os dados experimentais do laboratório 010.

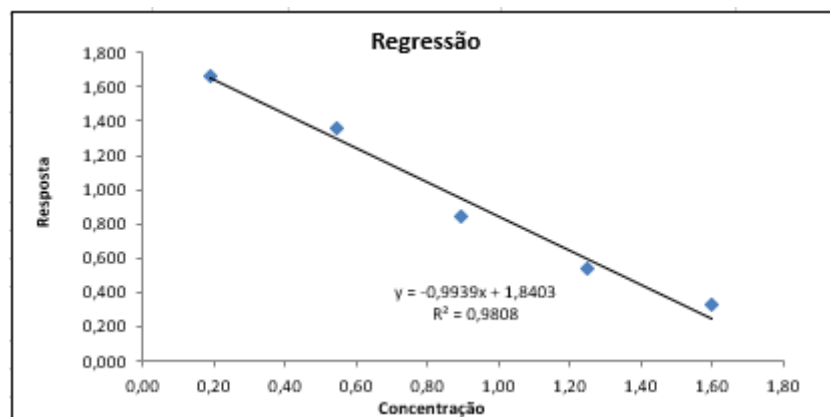
Tabela 25 – Resultados apresentados pelo participante de código 010 para a curva de calibração.

<b><i>Valor da concentração (<math>\frac{ng}{mL}</math>)</i></b>	<b><i>Log da concentração</i></b>	<b><i>Valor da absorbância</i></b>
1,560	0,193	1,668
3,510	0,545	1,360
7,900	0,898	0,843
17,780	1,250	0,545
40,000	1,602	0,325

Fonte: própria.

Graficamente, esse participante apresentou uma regressão linear com resultado de  $R^2$  no valor de 0,9808.

Figura 28- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 010.



Fonte: própria.

Ao apresentar um valor de incerteza expandida (calculada pelo participante no valor de 0,03%), deixa evidente que o laboratório precisa reavaliar a sua forma de calcular um parâmetro de incerteza e de como auxiliar seus profissionais na transcrição correta das unidades de medidas, no momento do preenchimento do formulário de resposta desse ensaio.

Por isso, é fundamental ter um software de confiança, que auxilie os laboratórios nos cálculos estatísticos. No caso deste trabalho, usamos o ConfLab<sup>®</sup>, para confrontar com os resultados de incerteza calculados pelo participante e assim, descrever estes dados, conforme a tabela a seguir.

Tabela 26 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 010.

<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
5,75	2	11,50

Fonte: própria.

Em resumo, o laboratório 010 recebeu um sinal de alerta, por apresentar os valores de critérios de índices z e zeta, numa faixa de resultados, inferior ao que se recomenda para um EP, ou seja, o participante desconsiderou os valores de incerteza de medição, à medida que demonstra alguns erros grosseiros em suas rotinas de análises.

- Laboratório 011

O penúltimo participante desse EP, mostrou valores de índices  $z$ , numa faixa bem perto da recomendada para aprovação. E com as análises realizadas através do uso de cromatografia líquida.

Entretanto o laboratório 011, continua com o seu desempenho questionável, já que não foi possível estimar os valores de índice  $zeta$ , já que o mesmo não forneceu os dados de incerteza e nem os resultados de curva de calibração para que o provedor conseguisse realizar o cálculo de incerteza com a ferramenta de software ConfLab®.

- Laboratório 012

Finalizando o EP, temos mais um participante que usou o equipamento de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas e forneceu seus dados de curva de calibração e incerteza expandida, para que fosse possível a comparação a partir do índice  $zeta$ . Os dados de curva de calibração, estão representados na Tabela 27.

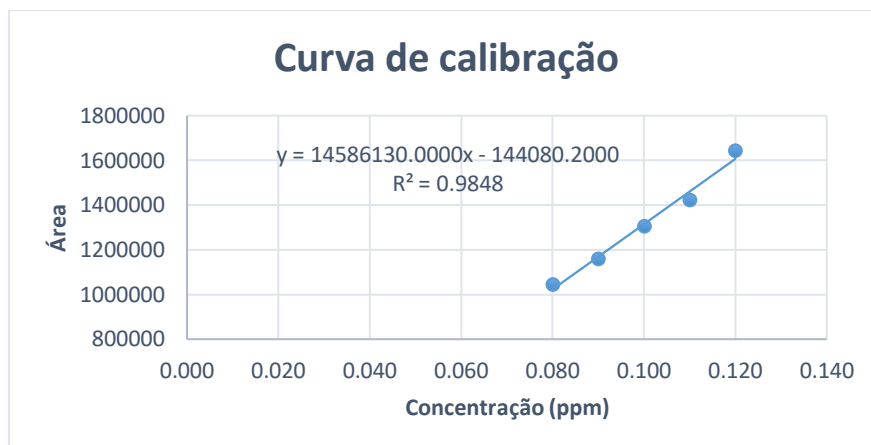
Tabela 27 – Resultados apresentados pelo participante de código 012 para a curva de calibração.

<b>Valor da concentração (ppm)</b>	<b>Área</b>
0,080	1044060
0,090	1159230
0,100	1304944
0,110	1422897
0,120	1641533

Fonte: própria.

Já o gráfico de regressão linear, com os dados da curva de calibração, forneceu os resultados conforme apresentado pela Figura a seguir.

Figura 29- Gráfico com os resultados da regressão linear, para o laboratório 012.



Fonte: própria.

Os valores de incerteza expandida calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup> (informado pela Tabela 28), demonstraram bons resultados comparado aos demais participantes.

Tabela 28 – Dados calculado pelo software ConfLab<sup>®</sup>, para avaliação do laboratório 012.

<b><i>Incerteza Padrão (%)</i></b>	<b><i>Fator K Expansão</i></b>	<b><i>Incerteza Expandida (%)</i></b>
2,00	2	4,00

Fonte: própria.

Por fim, o laboratório 012 foi reprovado tanto pelo critério de índice  $z$ , como pela avaliação de índice  $zeta$ , utilizando a incerteza calculada pelo software ConfLab<sup>®</sup>.



## 5. CONCLUSÕES

Os fatores de estudo para o planejamento e aplicação de um ensaio interlaboratorial de IVM em produto comercial foram definidos a partir da análise das normas ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 e a ISO 13528:2015.

No que diz respeito à matriz utilizada nesse projeto, garantimos a conformidade e rastreabilidade das amostras, através dos ensaios da estabilidade, homogeneidade e atribuição do valor designado. Os ensaios de homogeneidade foram avaliados através dos critérios estabelecidos pelas normas ISO guia 35:2020 e a ISO 13528:2015. O ensaio de estabilidade, também foi elaborado pela norma ISO 13528. Já a atribuição de valor designado, foi desenvolvido com os resultados das amostras utilizadas para a avaliação da homogeneidade, e com auxílio do teste de Grubbs, para a remoção de *outliers*.

Outro conceito importante deste trabalho, foi validar o desvio robusto para um EP, para um limite de participantes. Por isso, escolhemos o desvio padrão de *Horwitz*, o qual provou ser um ótimo critério de reprodutibilidade para amostra de IVM em produto comercial para um ensaio interlaboratorial com 12 laboratórios participantes.

Para os cientistas Rudaz e Feinberg a incerteza de medição poderia ser avaliada como um “parâmetro final, único e global” ou como um critério único, ou seja, os analistas devem considerar os resultados como confiáveis pelo correto conhecimento da incerteza, que é respaldada pela validação de um determinado método analítico e pela verificação das análises de rotina. Com isso, o procedimento para o cálculo da incerteza de medição, em métodos quantitativos, poderia ser considerado como critério único, na medida que existir um método de estimativa universalmente aprovado (RUDAZ; FEINBERG, 2018).

Em síntese, com a comparação estatística dos resultados dos valores de consenso e da incerteza de medição para os 12 laboratórios participantes de EP, avaliamos a capacidade dos laboratórios em fornecer resultados reprodutíveis. Desta maneira, podemos concluir que, nesta rodada de EP, foram 4 laboratórios aprovados (de códigos 001, 002, 004 e 005), o participante de código 011 continuou com o seu rendimento como questionável, e os 7 laboratórios restantes foram reprovados (lembrando que os

participantes de códigos 006 a 010, pertencem a mesma rede e com análise de rotina similares).

No caso de uma avaliação negativa, é de responsabilidade do laboratório participante investigar as causas das variações, além de providenciar as devidas ações corretivas. Podemos destacar como potenciais fontes de erros, as seguintes medidas: Falha no treinamento do analista; falha do equipamento (ajuste, manutenção ou calibração); utilização de padrões vencidos; não cumprimento das condições ambientais adequadas; erro de unidade de medida ou no preparo das soluções de estoque ou de trabalho; entre outros.

Por fim, ao avaliar os resultados (e por consequência os métodos de ensaio) dos laboratórios participantes desse EP, notamos que para analisar a IVM em produto comercial, as principais ferramentas são dependentes de equipamentos como o HPLC e dos ensaios imunoenzimático (ELISA). Porém, a tecnologia da cromatografia líquida requer algumas considerações importantes, como treinamento adequado do profissional (que irá manusear este tipo de instrumento), alto valor de instalação e manutenção, análises complexas e demoradas. Já os métodos em ELISA, são mais baratos, possuem um tempo menor de preparo para amostras, e com um treinamento pessoal, são menos complexos do que os métodos instrumentais (SHIWEN et al., 2009).

Com isso, apesar da maioria dos laboratórios participantes desse EP que usaram o ensaio imunoenzimático como ferramenta de detecção da IVM tenham sido reprovados, ainda é um método que pode ser considerado bem-sucedido para análises de medicamentos veterinários. Desta maneira, torna-se necessária mais uma rodada de EP, com um protocolo específico para o ensaio em ELISA e outro protocolo para o método de cromatografia líquida. Destacando quanto a exigência para que o participante informe seus dados de curva de calibração, para que o provedor tenha mais de uma ferramenta estatística e assim aplique uma avaliação de desempenho mais ampla do EP.

Com o resultado deste trabalho, foi possível estabelecer um protocolo adequado para a realização de um ensaio de EP em produto comercial de IVM, o qual poderá ser aplicado pelos LFDAs aos laboratórios que monitoram a concentração de IVM em produto comercial, colaborando com a avaliação de desempenho destes laboratórios e contribuindo assim com a melhora na qualidade do monitoramento deste importante produto.

## 6. TRABALHOS FUTUROS

- Repetir o contato com os laboratórios participantes para uma nova rodada de EP.
- Realizar o segundo EP de IVM em produto comercial.
- Otimizar o protocolo de EP para métodos cromatográficos e ensaio imunoenzimático.
- Exigir dos laboratórios participantes os dados da curva de calibração.
- Utilizar o software ConfLab<sup>®</sup> para realizar os cálculos de incerteza dos laboratórios participantes.
- Avaliar os resultados da segunda rodada de EP de IVM, através dos índices  $z$  e  $zeta$ .

## REFERÊNCIAS

- ALBERS-SCHONBERG, G.; ARISON, B. H.; CHABALA, J. C.; DOUGLAS, A. W.; ESKOLA, P.; FISHER, M.H.; LUSI, A.; MROZIK, H.; SMITH, J.L.; TOLMAN, R. L. Avermectins: structure determination. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 103, p. 4216-4221, 1981.
- AOAC INTERNATIONAL. AOAC Official methods of analysis. **Guidelines for standard method performance requirements**. Appendix F. Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO GUIA 35**: materiais de referência – princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17043**: avaliação de conformidade – Requisitos gerais para ensaios de proficiência Rio de Janeiro, 2011.
- AZIZ, M. A.; DIALLO, S.; DIOP, I. M.; LARIVIERE, M.; PORTA, M. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. **Lancet**, London, v. 320, n. 8291, p. 171-173, 1982.
- BALSAM, J.; OSSANDON, M.; BRUCK, H.A.; LUBENSKY, I.; RASOOLY, A. Low-cost technologies for medical diagnostics in low-resource settings. **Expert Opinion on Medical Diagnostics**, London, v. 7, n. 3, p. 243-255, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório de Medicamentos Veterinários e Agrotóxicos (MVA). **Determinação de avermectinas em medicamentos veterinários injetáveis**. Campinas: LFDA, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes – PNCRC**. Brasília: MAPA, 2019.
- BROOKMAN, B.; MANN, E. (ed.). **Eurachem guide**: selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes. 3. ed. [S. l.]: Eurachem, 2021.
- BURG, R.W.; STAPLEY, E.O. Isolation and characterization of the producing organism. *In*: CAMPBELL, W.C. **Avermectin and abamectin**. New York: Springer-Verlag, 1989. 363 p.
- CALY, L.; DRUCE, J. D.; CATTON, M. G.; JANS, D. A.; WAGSTAFF, K. M. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. **Antiviral Research** Amsterdam, v. 178, 2020.
- CAMPBELL, W. C. **Ivermectin**: a reflection on simplicity. Nobel Lecture. Stockholm: The Nobel Prizes, 2015.
- CAMPOS, V. F. **TQC**. Controle da qualidade total (no estilo japonês). Belo Horizonte: Editora QFCO, 1992.

CAMPOS, V. F. **Qualidade total**: padronização de empresas. Belo Horizonte: Editora QFCO, 1992.

CERKVENIK- FLAJS, V.; MILCINSKI, L.; SÜSSINGER, A.; HODOSCEK, L.; DANAHER, M.; ANTONIC, J. Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 663, n. 2, p.165-171, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS. International Food Standards **Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods**. CX/MRL 2-2018. [S. l.]: FAO, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXM%2B2%252FMRL2e.pdf>. Acesso em 05 maio 2021.

CONFLAB. **Incerteza**: software para cálculos de incerteza. Versão 1.0.0.0. [S.l.]: São Carlos, QualiLab, 2018. Disponível em: <https://www.conflab.com.br/home>. Acesso em: 20 set 2020.

COSTA, F. M.; PEREIRA NETTO, A. D. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n.3, p.616-622, 2012.

CROWTHER, J. F. **ELISA**: theory and practice. Methods in molecular immunology. Totowa: Humana Press, 1995. v. 42.

DANAHER, M.; HOWELLS, L. C.; CROOKS, S. R. H.; CERKVENIK- FLAJS, V.; O'KEEFFE, M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. **Journal of Chromatography. B**, analytical technologies in the biomedical and life sciences, Amsterdam, v. 844, n. 2, p. 175-203, 2006.

DEBONIS, K.; PIERRE, J. M. Psychosis, ivermectin toxicity, and "Morgellons disease". **Psychosomatics**, New York, v. 52, n. 3, p. 295-6, 2011.

DOBROVOLSKAIA, E.; GAM, A.; SLATER, J. E. Competition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be a sensitive method for the specific detection of small quantities of allergen in a complex mixture. **Clinical and Experimental Allergy**, Chichester, v. 36, p. 525-530, 2006.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. (ed.). **EURACHEM/CITAC guide**: quantifying uncertainty in analytical measurement. 3. ed. [S. l.]: Eurachem, 2012.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

EPTIS. **Base de dados provedores de ensaio de proficiência de ivermectina**. Berlin: EPTIS, 2021. Disponível em: <http://www.eptis.bam.de/pts137331>. Acesso em: 30 maio 2021.

GAN, S. D.; PATEL, D. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, Oxford, v. 133, p. 1-3. 2013.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Kuby immunology**. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 2000. p. 162.

HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Cary, v. 63, n.6, p. 1344-1354, 1980.

INMETRO. Laboratório. **Escopo da acreditação – ABNT NBR ISO/IEC 17025 – ensaio**. Brasília: INMETRO, 2021. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/RBle/docs/CRL0389.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2021.

INMETRO. **Provedores acreditados em ensaio de proficiência no Brasil**. Brasília: INMETRO, 2021. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre\\_prod\\_ep.asp](http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/acre_prod_ep.asp). Acesso em 25 mar. 2021.

INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora SENAI, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13528**: statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: ISO, 2015.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 78., 2013, Geneva. **Proceedings...** Rome: FAO/WHO, 2014. Tema: Residues of veterinary drugs.

JURAN, J. M. **Controle da qualidade handbook**. São Paulo: Makron Books, 1991. v. 1-2.

KOCH, M. Changes to proficiency testing in developing countries over the last 10 years. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 24, p. 9-12, 2019.

KOLBERG, D. I. S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.20, n.7, p. 1220-1226, 2009.

KOTYCZKA-MORANSKA, M.; MASTALERZ, M.; PLIS, A.; SCIAZKO, M. Inter-laboratory proficiency testing of the measurement of gypsum parameters with small numbers of participants. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 25, p. 373-381, 2020.

KUSELMAN, I.; FAJGELJ, A. IUPAC/CITAC guide: selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants – chemical analytical laboratories (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 82, n.5, p. 1099-1135, 2010.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LONGO, R. M. J. **Gestão da qualidade**: evolução histórica, conceitos básicos e aplicação na educação. Rio de Janeiro: IPEA, 1996.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MERCK. **Merck statement on ivermectin use during the COVID-19 pandemic**. [S. l.]: Merck, 2021. Disponível em: <https://www.merck.com/news/merck-statement-on-ivermectin-use-during-the-covid-19-pandemic/>. Acesso em 05 fev. 2021.

MONTEIRO, T.; RODRIGUES, J.; REGO, E.; ROCHA, W.; MATTOS, J.; NUNES, F.; CUNHA, V.; LA CRUZ, M. H. C.; SOUZA, V. Development of a certified reference material

for cachaça: an effective material for quality assurance. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 18, p. 197-206, 2013.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2019.

POSSAS, J. L. S. **Pré-validação do ensaio imunoenzimático para quantificação do teor de ovoalbumina na vacina contra febre amarela**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012. 48 p.

R-BIOPHARMA. **Kit comercial - ELISA para análise de Ivermectina**. Darmstadt, 1988. Disponível em: <https://food.r-biopharm.com/products/europroxima-ivermectin/>. Acesso em: 08 mai 2021.

RUDAZ, S.; FEINBERG, M. From method validation to result assessment: established facts and pending questions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 105, p. 68-74, 2018.

SHIWEN, X.; SHU, L.; DONGBO, S.; DONGHUA, G. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against avermectina. **Hybridoma**, New Rochelle, v. 28, n. 3, p. 173-177, 2009.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Thomson, 2006.

SUNG, Y. -F.; HUANG, C. -T.; FAN, C. -K.; LIN, C. -H.; LIN, S. -P. Avermectin intoxication with coma, myoclonus, and polyneuropathy. **Clinical Toxicology**, Philadelphia, v. 47, n. 7, p. 686-8, 2009.

SZEWCZAK, E.; BONDARZEWSKI, A. Is the assessment of interlaboratory comparison results for a small number of tests and limited number of participants reliable and rational? **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 21, p. 91-100, 2016.

TAVERNIERS. I.; DE LOOSE. M.; BOCKSTAELE. E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. The international harmonised protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 78, p. 145-196, 2006.

THOMPSON, M. **Proficiency testing in analytical chemistry**. [S. l.]: Elsevier, 2009.

THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. **Analyst**, Princeton, v. 125, p. 385-386, 2000.

VAN DER VEEN, A.M.H.; LISINGER, T.P.J.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 6, p. 20-25, 2001.

VAN WEEMEN, B. K.; SCHUURS, A. H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. **FEBS Letters**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 232-236, 1971.

## **APÊNDICE A**

### **Protocolo Resumido: Ensaio de Proficiência (EP) de Ivermectina em Produto Comercial**

#### **Objetivo**

Considerando a importância da Ivermectina como medicamento (o que levou aos pesquisadores que realizaram sua descoberta receberem o Nobel em Medicina no ano de 2015), este protocolo possui o objetivo de apresentar (de forma resumida) aos laboratórios participantes toda sistemática que será aplicada na realização do ensaio de proficiência para ivermectina em produto comercial (realizado de acordo com as normas ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 e a ISO 13528:2015), contribuindo para os seguintes fatores:

- Proporcionar uma melhor rastreabilidade e reprodutibilidade nos resultados das medições para a análise de ivermectina;
- Qualificar o desempenho de laboratórios em um ensaio interlaboratorial;
- Auxiliar os laboratórios participantes em identificar e solucionar problemas;

#### **Análise das amostras pelos laboratórios**

Cada laboratório irá receber 20mL de produto comercial de ivermectina, podendo analisar com seus próprios métodos. A título orientativo, será enviado juntamente com a amostra o protocolo completo do EP com uma sugestão de método de análise

#### **Estudos de Homogeneidade e Estabilidade**

Estes estudos serão realizados pelo provedor e apresentados quando da emissão do relatório final. Todos os cálculos serão embasados na ISO 13528:2015.



### **Valores Designados e Incerteza**

Os valores designados serão calculados a partir da média, porém também serão realizadas considerações estatísticas caso exista um número pequeno de participantes, conforme orientações da ISO 13528:2015. O valor designado e a incerteza será atribuída ao lote do produto comercial de ivermectina fornecido para análise, de maneira que este possa ser utilizado como Material de Referência nos controles de rotina do laboratório (estas informações irão constar no relatório final).

### **Avaliação de desempenho dos laboratórios participantes**

O desempenho será avaliado a partir do cálculo do Z-Score (utilizando a média e desvio padrão robusto). Para aqueles laboratórios que informarem a incerteza de seu resultado, também será avaliado o desempenho conforme o índice zeta. A avaliação gráfica será realizada pelo gráfico de barras.

### **Confidencialidade**

Este projeto está sendo desenvolvido pela aluna de mestrado Paula Souza da Silva Gomes Lima sob a orientação do Prof. Dr. Igor Renato B. Olivares (IQSC/USP), que assumem o compromisso em garantir a confidencialidade de todos os dados fornecidos. Desta maneira, será atribuído um código unívoco para cada participante, sendo este código apenas de conhecimento do participante. Qualquer publicação ou apresentação dos resultados deste projeto, em nenhuma hipótese fará qualquer identificação capaz de associar os resultados com os participantes deste EP.

## APÊNDICE B

Primeiramente, seleciona-se aleatoriamente um número  $n$  (onde  $n \geq 10$ ) de amostras do lote de itens de ensaio preparado. Retiram-se duas porções de testes de cada item de ensaio e realizam-se as análises de todas as porções ( $2n$ ) de forma aleatória, utilizando a ferramenta RANDOM.ORG, completando-se todas as séries de medição sob condições de repetibilidade.

Calcula-se a média ( $x_t$ ) entre as duas porções de itens de ensaio ( $x_{t,1}$  e  $x_{t,2}$ ), duplicatas das amostras, e em seguida, calcula-se a média geral,  $\bar{X}$ , definida como a média das médias de cada amostra. A partir destes valores, calcula-se o desvio padrão das médias das amostras,  $s_x$ , conforme a Eq. 1 e as diferenças entre as porções de itens,  $w_t$ , também para cada amostra, a partir da Eq. 2.

$$S_X = \sqrt{\sum (X_{t,.} - \bar{X})^2 / (n - 1)} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$w_t = |X_{t,1} - X_{t,2}| \quad (\text{Eq. 2})$$

A partir dos valores definidos acima, calcula-se o desvio padrão das amostras  $s_w$ , e o desvio padrão entre as amostras  $s_s$ , conforme as Eq. 3 e 4 a seguir:

$$S_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2n)} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$S_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2 / 2)} \quad (\text{Eq. 4})$$

As amostras podem ser consideradas adequadamente homogêneas para este ensaio de proficiência, se for atendido o critério definido na Eq. 5:

$$S_s \leq 0,3 \sigma_H \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo  $\sigma_H$  é o desvio padrão, obtido através da equação de Horwitz, pela concentração média da amostra de ivermectina em produto comercial.

Caso este critério não seja alcançado, as amostras serão consideradas heterogêneas devido a Eq. 6 descrita abaixo:

$$S_S \geq 0,3 \sigma_H \quad (\text{Eq. 6})$$

A norma ISO 13528:2015 permite ainda a inclusão da variação existente entre as amostras, no desvio padrão para avaliação de proficiência, conforme a Eq. 7:

$$\sigma_H' = \sqrt{\sigma_H^2 + S_S^2} \quad (\text{Eq. 7})$$

**APÊNDICE C****Formulário de Registro de Resultados do Ensaio de Proficiência de Ivermectina em Produto Comercial**

Todos os laboratórios participantes receberam um formulário de registro de atividades, no qual constava as seguintes informações:

**INSTRUÇÕES:**

- 1) Preencher todos os campos em fundo branco do formulário conforme os dados solicitados nas planilhas. As células com fundo azul não estão protegidas, mas não devem ser alteradas pelo participante.
- 2) O participante deverá realizar as medições seguindo o item "Análise de Ivermectina" do Protocolo de Ensaio de Proficiência.
- 3) Para preenchimento dos resultados, deve-se adotar a seguinte formatação numérica: Ivermectina em  $\mu\text{g/mL}$ : 7 casas decimais.
- 4) Informações pertinentes ao processo de medição (mudanças ambientais, troca de operador, troca de equipamento, etc), devem ser devidamente registradas no item "observações", abaixo.
- 5) O arquivo, deve ser enviado à coordenação deste Ensaio de Proficiência, através do e-mail: [lima.paula@usp.br](mailto:lima.paula@usp.br)

**OBSERVAÇÕES:**

--

RQA Labs		REGISTRO DE RESULTADOS	
		Ensaio de Proficiência de Ivermectina em Produto Comercial - 1ª Rodada	
CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO:	Lab XX/2020	Método	
1. CONDIÇÕES AMBIENTAIS			
Altitude (m)			
2. MÉTODO DE ANÁLISE:			
3. CONDIÇÕES DE ANÁLISE:			
4. EQUIPAMENTO (marca e modelo)			
Ivermectina (µg/mL)			
5. DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA			
Ivermectina (µg/mL)			

RQA Labs		REGISTRO DE RESULTADOS				
		Ensaio de Proficiência de Ivermectina em Produto Comercial - 1ª Rodada				
CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO:	Lab XX/2020	Resultados				
Componente	Data de análise	Resultados	Incerteza Combinada (Uc)	Fator de Abrangência (k)	Incerteza Expandida (Uexp)	Reportar resultados de acordo com o n° de casas decimais abaixo
Ivermectina (µg/mL)	medida 1					7 casas decimais
	medida 2					
	medida 3					
	medida 4					
	medida 5					
PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO						
		Procedimento do protocolo <input type="checkbox"/>		Procedimento próprio <input type="checkbox"/>		

RQA Labs		REGISTRO DE RESULTADOS	
		Ensaio de Proficiência de Ivermectina em Produto Comercial - 1ª Rodada	
CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO:	Lab XX/2020	Gráfico da Curva de Calibração	