

MESTRADO PROFISSIONAL  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Márcia Cristina de Abreu Garcia

**DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA CLAE: UMA  
FERRAMENTA DA QUALIDADE APLICADA NA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS  
DE OFLOXACINO 400 mg**

Rio de Janeiro  
2013

Márcia Cristina de Abreu Garcia

**DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA CLAE: UMA  
FERRAMENTA DA QUALIDADE APLICADA NA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS  
DE OFLOXACINO 400 mg**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Kátia Christina Leandro

Rio de Janeiro  
2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Garcia, Márcia Cristina de Abreu

Determinação da Incerteza de Medição na CLAE: uma Ferramenta da Qualidade Aplicada na Análise de Comprimidos de Ofloxacino 400 mg/  
Márcia Cristina de Abreu Garcia. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

xxii, 110 f.: il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) –  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de  
Janeiro, 2013.

Orientadora: Kátia Christina Leandro

1. Incerteza de Medição. 2. Cromatografia líquida de alta pressão. 3.  
Qualidade. 4. Ofloxacino. I Título

Título: Determination of Measurement Uncertainty in HPLC: A Quality Tool to be used  
on Analysis of tablets Ofloxacin 400 mg Márcia Cristina de Abreu Garcia

**DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO NA CLAE: UMA  
FERRAMENTA DA QUALIDADE APLICADA NA ANÁLISE DE COMPRIMIDOS  
DE OFLOXACINO 400 mg**

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Rio, em \_\_\_\_\_ de abril de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Silvana do Couto Jacob (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Prof. Dr. Otávio Henrique dos Santos Figueiredo (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**ORIENTADORA**

---

Dra. Katia Christina Leandro (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Rio de Janeiro  
2013

Dedico este trabalho a meus filhos Theofane e Nicole e a meu esposo Ricardo. Neles encontrei o significado da palavra família: alegria, consolo e motivação para superar os momentos difíceis.

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Laboratório Farmacêutico da Marinha que me apoiou e incentivou neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da FIOCRUZ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus por me ensinar que sempre é tempo de aprender.

À Ricardo, meu esposo amado, meu amigo, companheiro e grande encorajador para novos projetos.

À Theo e Nicole, alegrias do meu dia-a-dia, por compreender os momentos em que estive ausente.

À minha Mãe por seu amor e compreensão em todos os momentos.

À professora Dra. Kátia Christina Leandro, minha orientadora e amiga pelas idéias, orientações e grande incentivo.

Agradecimento especial ao querido amigo e professor Msc. Sérgio Alves da Silva pelas orientações sempre pertinentes e esclarecedoras. Palavras não poderiam expressar minha gratidão pela sua paciência e dedicação ao me ensinar estatística, pela disponibilidade em todos os momentos que precisei e pelo apoio e incentivo durante a caminhada.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Farmacêutico da Marinha, pela ajuda, auxílio e compreensão.

Ao Msc. Paulo Ricardo de Souza e Souza, companheiro de profissão e irmão de armas, pela orientação, apoio e disponibilidade nos momentos em que precisei.

Aos colegas Andréia Bispo e Arthur pela ajuda e cooperação.

Aos funcionários da Biblioteca e da secretaria do INCQS pela disponibilidade irrestrita.

“Uma mente que se abre a uma nova idéia,  
jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein



## RESUMO

A expressão da incerteza de medição é uma indicação quantitativa da qualidade de um resultado, demonstrando a precisão que o acompanha e acrescentando mais confiabilidade ao mesmo. Em função da CLAE ser um método amplamente utilizado no controle da qualidade de medicamentos, este projeto teve por objetivo o desenvolvimento de um instrumento metodológico para cálculo de incerteza de medição em resultados analíticos obtidos por tal metodologia. Para o desenvolvimento do projeto foi então escolhido o ensaio analítico farmacopeico para quantificação do teor de ofloxacino, um antimicrobiano usado no tratamento da tuberculose multirresistente, doença que se apresenta como um grave problema de saúde pública em nível mundial. A elaboração do diagrama de causa e efeito demonstrou ser uma ferramenta essencial no delineamento das fontes que influenciam a incerteza. Por outro lado a elaboração de tabelas, identificando os tipos de incerteza advindas de cada fonte, foi fundamental para permitir a construção das planilhas para cálculo da incerteza padronizada e do grau de liberdade efetivo associados ao resultado, bem como do fator de abrangência e da respectiva incerteza expandida. A demonstração passo a passo da execução dos cálculos foi essencial para a compreensão destes. Com os resultados obtidos foi possível concluir que as principais contribuições para a incerteza padrão combinada do resultado analítico do teor de Ofloxacino foram a incerteza do padrão analítico, a incerteza oriunda da amostragem do lote e as incertezas de massa. O resultado obtido para o lote analisado de LFM-Ofloxacino 400 mg mostrou-se satisfatório em relação ao teor do fármaco, de acordo com a especificação farmacopeica. Este estudo permitiu concluir que o cálculo da incerteza expandida proporciona o conhecimento do intervalo em torno do resultado que abrange uma extensa fração de distribuição de probabilidade, caracterizada por aquele resultado e sua incerteza padrão combinada, tornando o resultado mais completo, permitindo que aqueles que o utilizem possam avaliar sua confiabilidade para tomada de decisão em relação ao produto analisado.

Palavras-chave: Incerteza de medição. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Qualidade. Ofloxacino.

## ABSTRACT

The expression of uncertainty in measurement is a quantitative indication of the quality of the result, demonstrating its precision and adding more reliability to itself. In view of HPLC is a method widely used in quality control of medicines, this project aimed to the development of a methodological tool for calculating measurement uncertainty in analytical results obtained by this method. For the development of the project was chosen the analytical essay pharmacopeic to quantify the content of ofloxacin, an antimicrobial used to treat mutirresistent tuberculosis disease that presents itself as a serious worldwide public health problem. The development of the cause and effect diagram shown to be an essential tool in delineating the sources that influence the uncertainty that accompanies the analytical test result. Moreover the preparation of tables, identifying the types of uncertainty arising from each source was essential to allow the construction of spreadsheets to calculate the standard uncertainty and effective degrees of freedom associated with the test result as well as the coverage factor and the respective expanded uncertainty. The demonstration step by step implementation of the calculations was essential for understanding these. With these results we concluded that the main contribution to the combined standard uncertainty of the analytical result of the content of ofloxacin were of reference standard uncertainty, uncertainty arising from sampling and uncertainties batch of dough. The result obtained for the batch analyzed LFM-ofloxacin 400 mg was satisfactory with the contents of the drug, according to pharmacopoeial specification. This study concluded that the calculation of the expanded uncertainty interval provides knowledge about the result which covers an extensive fraction probability distribution, characterized by that result and its combined standard uncertainty, making the results more completely, allowing those who use to assess their reliability and its compliance assessment for decision making to the product analyzed.

Key-words: Uncertainty measure. High-Performance Liquid Chromatography. Quality. Ofloxacin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição de Probabilidade Normal	35
Figura 2	Distribuição de Probabilidade Uniforme	36
Figura 3	Distribuição de Probabilidade Triangular Simétrica	37
Figura 4	Diferença entre Exatidão e Precisão	39
Figura 5	Diagrama de Causa e Efeito	44
Figura 6	Estrutura básica de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	51
Figura 7	Estrutura Química do Ofloxacino	51
Figura 8	Incidência Mundial de Tuberculose em 2008	52
Figura 9	Distribuição de países que relataram ao menos um caso de TB extensivamente resistente em 2009	55
Figura 10	Fluxograma demonstrativo da metodologia de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg	75
Figura 11	Fórmula para cálculo de teor da metodologia de quantificação em comprimidos de Ofloxacino 400 mg	76

- Figura 12 Diagrama de Causa e Efeito Principal: identificação das principais fontes de incerteza de medição para a metodologia de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg 77
- Figura 13 Diagrama de Causa e Efeito Detalhado: identificação detalhada das fontes de incerteza de medição para a metodologia de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg 78
- Figura 14 Sinais Analíticos do Ofloxacino (padrão) e do LFM-Ofloxacino 400mg (amostra) obtidos com sistema cromatográfico CLAE (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5µm, 180 mm x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20µL 86
- Figura 15 Sinais Analíticos do Ofloxacino (padrão) obtidos com sistema cromatográfico CLAE (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5µm, 180 mm x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20µL 87
- Figura 16 Sinais Analíticos do LFM-Ofloxacino 400mg (amostra) obtidos com sistema cromatográfico CLAE (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5µm, 180 mm x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20µL 88

- Figura 17 Histograma da frequência da variação de temperatura ambiente na sala de análise no período de Julho/2011 a Junho/2012 90
- Figura 18 Gráfico Comparativo das principais contribuições de incerteza no resultado da quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre características da metrologia física e química	31
Tabela 2	Número de países que relataram dados de resistência à drogas anti-TB de 2ª linha por região da OMS	54
Tabela 3	Condições Cromatográficas de Análise	69
Tabela 4	Descrição dos fatores de incerteza relacionados às fontes de incerteza principais	79
Tabela 5	Identificação do tipo de incerteza quanto à classificação A e B	80
Tabela 6	Determinação da Incerteza Tipo A do Balão Volumétrico 10 mL	81
Tabela 7	Determinação da Incerteza Tipo A do Balão Volumétrico 100 mL	82
Tabela 8	Determinação da Incerteza Tipo A da Pipeta Volumétrica 2 mL	83
Tabela 9	Determinação da Incerteza Tipo A da Balança Analítica	84
Tabela 10	Determinação da Incerteza Tipo A do Injetor do CLAE	85
Tabela 11	Determinação da Incerteza Tipo A da Homogeneidade da Amostra	89
Tabela 12	Determinação da Incerteza Tipo A das Vidrarias Volumétricas em função da Variação da Temperatura Ambiente	91
Tabela 13	Determinação da Incerteza Tipo A da Contribuição do Operador para a Precisão da Metodologia	92
Tabela 14	Determinação da Incerteza Tipo B do Balão Volumétrico 10 mL	92
Tabela 15	Determinação da Incerteza Tipo B do Balão Volumétrico 100 mL	93
Tabela 16	Determinação da Incerteza Tipo B da Pipeta Volumétrica 2 mL	93
Tabela 17	Determinação da Incerteza Tipo B do Conjunto de Peso Padrão	93
Tabela 18	Determinação da Incerteza Tipo B da Balança Analítica	94

Tabela 19	Determinação da Incerteza Tipo B do Termohigrômetro	94
Tabela 20	Determinação da Incerteza Tipo B do Padrão de Referência do Ofloxacino	95
Tabela 21	Planilha de Cálculo da Incerteza Padrão Combinada	96
Tabela 22	Planilha de Cálculo do Grau de Liberdade Efetivo, do Fator de Abrangência e da Incerteza Expandida	97
Tabela 23	Probabilidade de Resultados Não Conformes obtidos para valores de teor considerando como critério de aprovação a faixa de 90 a 110%	99

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN -	Acetonitrila
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\beta$ -	Coeficiente de Expansão Volumétrica
BK -	Bacilo de Koch
BPF -	Boas Práticas de Fabricação
BPL -	Boas Práticas de Laboratório
CBPF -	Certificado de Boas Práticas de Fabricação
CGCRE -	Coordenação Geral de Acreditação
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQ -	Controle de Qualidade
DOQ -	Documento da Qualidade
EA -	European Co-operation for Accreditation
FB -	Farmacopéia Brasileira
FDA -	Food and Drug Administration
FT-	Ficha Técnica de Análise
GQ -	Garantia da Qualidade
IAAC -	InterAmerican Accreditation Cooperation
IEC -	International Electrotechnical Commission
IFA -	Insumo Farmacêutico Ativo
ILAC -	International Laboratory Accreditation Cooperation
IM -	Incerteza de Medição
INCQS -	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO -	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO -	International Organization for Standardization



K -	Fator de Abrangência
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -	Fosfato de potássio monobásico
LACEN-	Laboratório Central de Saúde Pública
LO-	Laboratório Farmacêutico Oficial
LFM -	Laboratório Farmacêutico da Marinha
u -	incerteza padrão
u <sub>c</sub> -	incerteza padrão combinada
µL -	Microlitro
µm -	Micrometro
mg -	miligrama
mL -	mililitro
mm -	milímetro
min -	minuto
MR-	Material de Referência
MRC-	Material de Referência Certificado
MS -	Ministério da Saúde
nm -	nanômetro
NBR -	Norma Brasileira
OMS -	Organização Mundial de Saúde
RBC -	Rede Brasileira de Calibração
RDC -	Resolução da Diretoria Colegiada
REBLAS -	Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde
SGQ -	Sistema de Qualidade
SIDA/ AIDS-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SUS -	Sistema Único de Saúde
TB-	Tuberculose
TB MR-	Tuberculose Multirresistente

U -	Incerteza Expandida
UV/VIS-	Ultra Violeta Visível
VISA -	Vigilância Sanitária
v -	Grau de Liberdade
$v_{\text{eff}}$ -	Grau de Liberdade Efetivo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	23
1.1 BREVE HISTÓRICO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA	23
1.2 A QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS	25
1.3 A QUALIDADE NOS LABORATÓRIOS ANALÍTICOS	27
1.4 A CONFIABILIDADE METROLÓGICA	30
1.5 A INCERTEZA DE MEDIÇÃO NO RESULTADO ANALÍTICO	34
1.5.1. Especificação do Mensurando	43
1.5.2. Identificação das Fontes de Incerteza.	43
1.5.3. Quantificação dos Componentes da Incerteza	44
1.5.4. Cálculo da Incerteza Combinada	44
1.5.5. Cálculo do Fator de Abrangência	46
1.5.6. Cálculo da Incerteza Expandida	47
1.6. ANÁLISE DE SENSIBILIDADE	47
1.7. A CLAE NA ANÁLISE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS	48
1.7.1 Principais Componentes de um Sistema de CLAE	49
1.7.1.1 <i>Fase Móvel</i>	49
1.7.1.2 <i>Bombas</i>	49
1.7.1.3 <i>Injeção de Amostras</i>	50
1.7.1.4 <i>Colunas</i>	50
1.7.1.5 <i>Detector</i>	50
1.8 O OFLOXACINO E O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE	51
1.8.1 Ofloxacino	51
1.8.2 Histórico e Situação Atual da Tuberculose	52
1.8.3 A Qualidade dos Medicamentos Antituberculose	55
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	58

<b>3 OBJETIVO</b>	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
<b>4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS</b>	60
4.1 EQUIPAMENTOS	60
4.2 REAGENTES E MATERIAIS	60
4.2.1 Amostra	60
4.2.2 Reagentes	60
4.2.3 Padrões	61
4.2.4 Acessórios	61
<b>5 METODOLOGIA</b>	63
5.1 ESPECIFICAÇÃO DO MENSURANDO	63
5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA	63
5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DA INCERTEZA	64
5.3.1 Determinação das Incertezas Tipo A	64
5.3.1.1 <i>Vidrarias Volumétricas</i>	64
5.3.1.2 <i>Balança Analítica</i>	66
5.3.1.3 <i>Injetor do CLAE</i>	66
5.3.1.4 <i>Homogeneidade da Amostra</i>	69
5.3.1.5 <i>Influência da Variação da Temperatura Ambiente no Volume das Vidrarias</i>	70
5.3.1.6 <i>Contribuição do Operador para a Precisão da Metodologia</i>	71
5.3.2 Determinação das Incertezas Tipo B	72
5.3.2.1 <i>Vidrarias Volumétricas</i>	72
5.3.2.2 <i>Conjunto de Peso Padrão e Balança Analítica</i>	72
5.3.2.3 <i>Termohigrômetro</i>	72

5.3.2.4 <i>Padrão de Referência</i>	73
5.4 CÁLCULOS E DETERMINAÇÕES	73
5.4.1 Cálculo da Incerteza Combinada	73
5.4.2 Cálculo do número de Graus de Liberdade Efetivo do Fator de Abrangência e da Incerteza Expandida	73
5.4.3 Análise de sensibilidade	74
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
6.1 RESULTADOS DA ESPECIFICAÇÃO DO MENSURANDO	75
6.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE CAUSA E EFEITO	76
6.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DA INCERTEZA	79
6.3.1 Determinação das Incertezas tipo A	81
6.3.1.1 <i>Vidrarias Volumétricas</i>	81
6.3.1.2 <i>Balança Analítica</i>	83
6.3.1.3 <i>Injetor do CLAE</i>	85
6.3.1.4 <i>Homogeneidade da Amostra</i>	89
6.3.1.5 <i>Vidrarias Volumétricas em função da Variação da Temperatura Ambiente</i>	89
6.3.1.6 <i>Contribuição do Operador</i>	91
6.3.2 Determinação das Incertezas Tipo B	92
6.3.2.1 <i>Vidrarias Volumétricas</i>	92
6.3.2.2 <i>Conjunto de Peso Padrão e Balança Analítica</i>	93
6.3.2.3 <i>Termohigrômetro</i>	94
6.3.2.4 <i>Padrão de Referência</i>	94
6.4 RESULTADOS DOS CÁLCULOS E DETERMINAÇÕES	95
6.4.1 Resultados do Cálculo da Incerteza Combinada	95
6.4.2 Resultados do Cálculo do número de Graus de Liberdade Efetivo, do Fator de Abrangência e da Incerteza Expandida	97

6.4.3 Resultados da Análise de sensibilidade	100
<b>7 CONCLUSÃO</b>	101
<b>REFERÊNCIAS</b>	103
<b>ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO STUDENT</b>	110

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BREVE HISTÓRICO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

As ações de Vigilância Sanitária iniciaram-se na Antiguidade e tinham como objetivo o controle sobre as práticas de cura, meio ambiente e sobre produtos relacionados à saúde e doença. No final do século XVIII na França, surgiu o conceito de salubridade beneficiando a saúde, sendo um marco histórico na vigilância sanitária. Tal conceito ajudou na prática de ações sanitárias estruturadas por políticas-científicas e firmou-se no século XX com a criação de órgãos nacionais de controle (COSTA; ROZENFELD; 2000).

No século XIX, a família real chega ao Brasil e a partir desse momento o país é inserido na rota comercial inglesa. Dessa forma, com o intuito de possibilitar as relações comerciais tornou-se necessário um controle sanitário que viabilizasse a aceitação dos produtos brasileiros no mercado e que evitassem a disseminação de doenças no país, originando as primeiras ações de vigilância sanitária realizadas em território nacional (COSTA; ROZENFELD; 2000).

Apesar da evolução ocorrida no período compreendido entre os séculos XVII e XIX relacionadas aos conceitos e ações sanitárias, o estabelecimento da Vigilância Sanitária como atividade permanente baseada no controle de qualidade ocorreu apenas no século XX com a criação da Lei nº 6.360/76 a chamada Lei de Vigilância Sanitária, quando então surgiu a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Com a Lei nº 6.437 em 1977 foram estabelecidas sanções penais e administrativas que estão sujeitas às infrações sanitárias e tornados oficialmente públicos os instrumentos que são utilizados pela Vigilância Sanitária no exercício de suas funções até hoje. Como exemplos podem ser citados: a aplicação de autos de infração, notificação, defesa, impugnação, apreensão de amostras, inutilização de produtos e cancelamento de registros (COSTA, 2004).

A década de 1980 foi fundamental para as mudanças ocorridas na saúde pública brasileira. O momento político solicitava uma abertura democrática, o que contribuiu para o desenvolvimento de uma consciência cidadã da sociedade,

gerando questionamentos relacionados às ações do Estado quanto às ações de defesa da saúde da população no país (COSTA, 2004).

A reforma sanitária, ocorrida no final da década de 1980, foi a grande responsável pela geração de mudanças no sistema de saúde adotado no país, após uma equipe de sanitaristas assumir o órgão nacional de Vigilância Sanitária, de forma inédita, em 1985. O reconhecimento pela Constituição Brasileira de que a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas econômicas e sociais que visem à redução do risco de doenças e outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1988), surgiu da proposta formulada durante este processo de reforma sanitária (COSTA, 2004).

A reforma sanitária obteve como conquista a Lei nº 8.080/1990, conhecida como Lei Orgânica da Saúde, que regulamentou o Sistema Único de Saúde (SUS) e definiu um novo conceito de Vigilância Sanitária:

Um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que direta ou indiretamente, se relacionam com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos da produção ao consumo, e o controle da prestação de serviços que se relacionem direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990, p.2).

A partir dessa época, a vigilância sanitária passou a ter sua importância reconhecida no Brasil. Apesar disso as políticas públicas estabelecidas não promoveram a adequada capacitação institucional de maneira a atender toda a demanda existente na época e as críticas sobre a atuação da Vigilância Sanitária aumentaram (COSTA; ROZENFELD; 2000).

Na década de 1990, o Brasil foi marcado por diversos escândalos, especialmente na área de medicamentos, com denúncias de falsificação e ineficácia levando a sociedade a tomar conhecimento do que já era claro para os órgãos reguladores da saúde no país: a fragilidade e a precariedade dos modelos de regulação e controle sanitário brasileiros. Dessa forma ficou explícita a necessidade de implementar novas medidas para a contenção dessas e de outras ocorrências que geravam riscos para a saúde da população e propostas de reformulação do modelo passaram a ganhar força (LUCCHESI, 2001).



Como resultado em substituição à Secretaria Nacional foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 26 de janeiro de 1999 mediante a Lei nº 9782/1999. Essa autarquia do Ministério da Saúde (MS) baseia-se no Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos da América. Sua finalidade institucional foi definida como a promoção e a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária (VISA), inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras (COSTA; ROZENFELD, 2000).

A ANVISA dispõe das vigilâncias sanitárias estaduais e municipais bem como da colaboração dos Laboratórios Centrais de Análise (LACEN) e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) para a realização do controle sanitário dos medicamentos após a comercialização. Os LACEN e o INCQS apresentam como uma de suas funções a avaliação analítica de alimentos, produtos biológicos, medicamentos e produtos para saúde, para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária, e vem ao longo dos anos analisando e comprovando a baixa qualidade de muitos medicamentos disponíveis no mercado (COSTA, 2004).

## 1.2 A QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS

Desde a sua criação, a ANVISA vem realizando ações com o objetivo de reduzir falsificações, ineficácia e outros problemas provocados pela fabricação de medicamentos com qualidade duvidosa. Inicialmente com a sua criação foi intensificada a fiscalização mais rigorosa das indústrias com a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 134/2001.

Posteriormente a ANVISA publicou em 2003, a RDC nº 210, em substituição à RDC nº 134/2001, determinando a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das boas práticas para fabricação de medicamentos, com base no risco potencial de qualidade e segurança, relacionados aos processos produtivos (BRASIL, 2003a).

A RDC nº 210/2003 contribuiu significativamente para a melhoria dos processos fabris vinculados à produção de medicamentos, entretanto, com o passar

dos anos ela mostrou algumas deficiências. Em virtude disto a ANVISA revisou a referida RDC, caminhando para um maior rigor na qualidade dos produtos fabricados pela indústria de medicamentos tendo publicado em 2010, a RDC nº 17.

Assim a criação da ANVISA representa um grande marco na saúde pública do país, com a definição de critérios que desencadearam uma nova fase para a indústria farmacêutica no Brasil. A produção e a comercialização de medicamentos passaram a ser submetidas a regras mais rígidas, em conformidade com normas complementares, constantes de RDC publicadas por aquela Agência. Essas normativas visam à definição de critérios específicos para cada tipo de medicamento, envolvendo aspectos de qualidade, eficácia, segurança e intercambialidade, seguindo o padrão internacional, principalmente, o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (CASTANHEIRA; MELLO; OLIVEIRA, 2008).

A ANVISA vem ao longo de sua existência regulando o mercado farmacêutico por meio de resoluções normativas que orientam a produção farmacêutica, e em consonância com a tendência mundial, vem demonstrando uma preocupação constante com a melhoria contínua da qualidade dos medicamentos comercializados no mercado nacional. Dessa forma é importante a busca por métodos de análise mais eficazes bem como a aplicação de ferramentas que possam contribuir para tal eficácia, acrescentando confiabilidade no controle da qualidade dos fármacos (LA ROCA et al., 2007).

A RDC nº 17/2010 define a Garantia da Qualidade (GQ) como “a totalidade das ações sistemáticas necessárias para assegurar com confiança adequada que um produto (ou serviço) cumpre seus requisitos de qualidade” (BRASIL, 2010, p.13) para que possam ser utilizados para os fins propostos.

As Boas Práticas de Fabricação (BPF), preconizadas pela RDC nº 17/2010 da ANVISA, estabelecem o cumprimento de vários requisitos para que o laboratório produtor tenha capacidade de produzir, controlar e garantir a qualidade do medicamento fabricado. Para a liberação dos lotes deve ser assegurada a conformidade com as especificações estabelecidas mediante ensaios laboratoriais (BRASIL, 2010). Nesse aspecto a análise do teor do insumo farmacêutico ativo (IFA) no produto terminado com total confiabilidade é fundamental para garantir a sua qualidade.

### 1.3 A QUALIDADE NOS LABORATÓRIOS ANALÍTICOS

Os conceitos de GQ, de BPF, e de Boas Práticas de Laboratório (BPL) são aspectos inter-relacionados no gerenciamento da qualidade e as suas relações são de fundamental importância para a fabricação de produtos farmacêuticos com qualidade (BRASIL, 2010). A qualidade de um produto não está restrita apenas às características intrínsecas deste, mas na sua avaliação, as variáveis eficácia e segurança devem estar necessariamente presentes (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Para a fabricação de medicamentos, um sistema de garantia da qualidade implantado é fundamental e deve assegurar que estes sejam fabricados em cumprimento às BPF, que a produção e o Controle de Qualidade (CQ) tenham operações especificadas e escritas, que as responsabilidades de cada gerência estejam bem definidas, bem como, que exista controle quanto à fabricação, suprimento e correta utilização das matérias-primas e materiais de embalagem e que todos os controles necessários às matérias-primas, produtos intermediários, produtos a granel e produto acabado sejam realizados, além dos controles de processos, das calibrações e das validações. Além disso, os medicamentos devem ser armazenados, distribuídos e manuseados de forma que a sua qualidade seja mantida durante todo o prazo de validade, e por último, que sejam realizadas auditorias internas regularmente, para avaliar a aplicação e a efetividade do Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ) (BRASIL, 2010).

Embora o cumprimento das exigências dos órgãos reguladores seja obrigatório e necessário para garantir a permanência da indústria farmacêutica no mercado, com a globalização e a crescente competitividade estabelecida nas últimas décadas no mundo corporativo foi criado pelo International Organization for Standardization (ISO), organismo das Nações Unidas, um conjunto de normas técnicas que trata exclusivamente da gestão da qualidade denominado ISO série 9000, de forma a padronizar internacionalmente as normas de qualidade (ROSENBERG, 2001).

A Certificação por meio da ABNT NBR ISO 9001:2008 tem por objetivo demonstrar a capacidade da organização para produzir bens ou serviços em conformidade com as exigências estabelecidas pela referida norma, sendo o reconhecimento de que a organização possui um SGQ. Essa norma se refere principalmente à gestão da qualidade para organizações que executam produção ou

prestam serviços, incluindo análises químicas e tornou-se uma referência internacional para requisitos de qualidade de serviços nas relações entre empresas (ABNT, 2008). A conquista dessa certificação por uma empresa comprova que esta utiliza métodos e ferramentas de gestão que possibilitam ganhos de eficiência e maior satisfação de seus clientes (ROSENBERG, 2001).

Entretanto, em questões analíticas, o surgimento de novas e complexas tecnologias gerando a necessidade de resultados com confiabilidade assegurada tem tornado difícil para os clientes, a tarefa de determinar de maneira simples, quais laboratórios de ensaio são capazes de fornecer resultados com qualidade. Em consequência vários organismos e sistemas de acreditação foram desenvolvidos com o intuito de assegurar dados de qualidade, através de aproximações regulatórias, contratuais e outras similares (DEMPSEY; PETTY, 1991).

Por definição, acreditação é o procedimento oficial e formalizado pelo qual uma entidade autorizada concede reconhecimento de que uma organização é competente para realizar tarefas específicas. De acordo com o documento da qualidade (DOQ) nº 001 da Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) publicado em 2010:

A acreditação de laboratórios pela CGCRE/INMETRO representa o reconhecimento formal da competência do laboratório para realizar calibrações e/ou ensaios específicos, claramente definidos nos documentos que formalizam a acreditação. A acreditação não é concedida para atividades de natureza subjetiva ou interpretativa, tais como expressão de opinião, investigação de falhas ou consultoria, mesmo que essas atividades sejam baseadas em resultados de ensaios objetivos (INMETRO, 2010, p. 6).

A acreditação pode ser um grande benefício para um laboratório de ensaios analíticos. Um bom programa de acreditação assegura aos clientes quais laboratórios são capazes de produzir resultados com qualidade. Se o cliente tem confiança no sistema de acreditação, então terá confiança no laboratório que realizou o ensaio (ALMEIDA; PIRES, 2006).

Os sistemas de certificação e acreditação são produtos da crescente necessidade em determinar desempenho e competências de laboratórios de ensaio. A certificação é o procedimento pelo qual uma terceira parte fornece uma garantia

por escrito, de que o produto, processo ou serviço está em conformidade com os requisitos especificados (BRASIL, 2010). Ela difere primariamente da acreditação pois esta última está relacionada à competência técnica do laboratório (ABNT, 2005).

A importância da certificação e da acreditação depende do mercado em que cada laboratório está inserido exercendo suas atividades. Nos mercados mais exigentes a acreditação é a condição mínima para se iniciar uma negociação e mesmo nos mercados onde o grau de exigência não é tão elevado, a acreditação trará sempre benefícios em termos competitivos pela preferência que clientes potenciais darão a um laboratório acreditado (ALMEIDA; PIRES, 2006).

No Brasil, o decreto nº 6275 de 28 de novembro de 2007, estabelece que a CGCRE/Inmetro é o órgão ao qual compete atuar como organismo de acreditação, Tal organismo é signatário de vários acordos multilaterais de reconhecimento multilateral de cooperações internacionais e regionais de acreditação que formam uma rede. Essa rede é gerenciada por organismos internacionais como o International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), o InterAmerican Accreditation Cooperation (IAAC) e o European Co-operation for Accreditation (EA), das quais a CGCRE/Inmetro é signatária. Esses acordos têm por objetivo evitar a acreditação por vários organismos signatários ao mesmo tempo, bem como a cooperação mútua levando ao desenvolvimento de todos (INMETRO, 2010).

As normas ISO para a acreditação representam o alicerce de uma rede de reconhecimento de competências em âmbito internacional que é assegurada nacionalmente pelo organismo nacional de acreditação. O ILAC tem trabalhado no sentido de alcançar a sensibilização da indústria e das autoridades governamentais em relação à importância de reconhecimento de competências, com a intenção de aumentar a procura por organismos acreditados e a aceitação dos resultados produzidos por estes, incluindo aqueles produzidos em outros países (ALMEIDA; PIRES, 2006).

A Certificação das Boas Práticas de Fabricação (CBPF) da Indústria Farmacêutica pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) traduz-se no cumprimento das BPF pela mesma. Entretanto com a globalização dos mercados, assegurar a qualidade dos serviços prestados de acordo com normas internacionais passou a ser uma mola propulsora para a competitividade. O diferencial reside não somente em alcançar a satisfação das necessidades do consumidor e estar em

conformidade com as normas ditadas pela ANVISA, mas em demonstrar competência para assegurá-las (MARINHO; NETO, 1997).

A necessidade em assegurar níveis aceitáveis de qualidade nos serviços prestados pelos laboratórios que realizam ensaios analíticos levou ao desenvolvimento de normas e guias de referência que definem requisitos técnicos e gestão para acreditação (ALMEIDA; PIRES, 2006).

A acreditação obtida junto ao INMETRO segundo a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, é uma forma de acrescentar mais confiabilidade e credibilidade aos resultados emitidos por um laboratório analítico. Assim é possível promover o desenvolvimento de um processo permanente de avaliação e de certificação da qualidade dos serviços realizados, permitindo o aprimoramento contínuo, de forma a assegurar cada vez mais, a qualidade dos ensaios realizados (PALLASTRELLI; FUMCK; MILÃO, 2009).

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 amplia o conceito de garantia da qualidade quando afirma que técnicas estatísticas devem ser aplicadas para análise dos resultados de maneira a monitorar os resultados dos ensaios e que os laboratórios de ensaios analíticos devem possuir e aplicar procedimentos para a estimativa das incertezas de medição (ABNT, 2005).

A ANVISA publicou no ano de 2012, a RDC nº 12, que estabelece os critérios de habilitação para funcionamento dos laboratórios analíticos em saúde junto à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). Esta RDC estabelece a concessão de licença sanitária pela secretaria de vigilância sanitária estadual, porém a acreditação do laboratório é concedida mediante auditoria do INMETRO segundo a norma vigente ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 (BRASIL, 2012).

#### 1.4 CONFIABILIDADE METROLÓGICA

A metrologia compreende a ciência da medição e suas aplicações. Ela reúne todas as características teóricas e práticas da medição, qualquer que seja a incerteza de medição e a área de aplicação de forma a obter o valor de uma grandeza (INMETRO, 2012a).

A metrologia vem sendo amplamente aplicada na área física, nas medições

de comprimento, massa e tempo, utilizando abordagens e terminologias extensamente conhecidas pelos profissionais dessa área (ALVES; MORAES, 2003). O avanço da metrologia química no contexto internacional conduz à previsão de que a médio prazo haverá mais exigência do mercado para produtos com qualidade assegurada, ou seja que apresentem resultados analíticos exatos e mais confiáveis (PONÇANO; CARVALHO, 2006).

As abordagens de conceitos claramente definidos em metrologia física como unidades de medida, padrões, cadeias de rastreabilidade e incertezas tornam-se mais complexas em seu entendimento quando aplicadas à medição química, em função da grande quantidade de substâncias a serem determinadas em níveis de grandes concentrações de átomos, dispersos em um universo maior ainda de matrizes analíticas. Além desse aspecto outro fator de complexidade é decorrente da maioria das medições químicas ser realizada indiretamente, por meio da medição de uma ou mais propriedades físicas, como a emissão ou absorção de luz, ou ainda de uma grandeza elétrica, como potencial, resistência ou corrente. Assim esse tipo de medição torna-se uma medição relativa e nunca absoluta (ALVES; MORAES, 2003).

Alves e Moraes (2003) ressaltam que nos laboratórios de ensaios químicos analíticos, assim como nos físicos, é necessária a preparação de padrões de forma a permitir a comparabilidade das medidas e conseqüente rastreabilidade. A tabela 1 apresenta uma comparação entre as características dos padrões físicos e os químicos, demonstrando a complexidade deste último.

Tabela 1

Comparação entre características da metrologia física e química		
	<i><b>Metrologia Física</b></i>	<i><b>Metrologia Química</b></i>
<b>Padrão</b>	Não destrutivo	Destrutivo
<b>Medição</b>	Direta	Indireta
<b>Unidade</b>	Bem definida	Não padronizada
<b>Incerteza</b>	Bem caracterizadas	Complexas

Fonte: ALVES; MORAES, 2003

No processo de obtenção de resultados de medição confiáveis, há necessidade de obedecer a uma hierarquia na área de metrologia. De acordo com o Vocabulário Internacional de Medição a rastreabilidade metrológica é conceituada como:

a propriedade de um resultado de uma medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a um referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição (INMETRO, 2012a, p. 28).

Para se obter a confiabilidade metrológica é necessário o estabelecimento de procedimentos, rotinas e métodos adequados, os quais contribuirão para a garantia da qualidade em laboratórios de análises químicas ao gerar credibilidade técnica para as medidas obtidas (BORGES, 2006).

Dentre as muitas operações unitárias envolvidas em uma análise química, a medição é uma fase cujo resultado depende de como essas operações foram aplicadas e principalmente da utilização de conceitos BPL, que evitam operações desnecessárias e acrescentam cuidados durante as etapas mais críticas (ALVES; MORAES, 2003).

Segundo Paiva (2001), os principais elementos envolvidos na obtenção da confiabilidade metrológica são:

- Material de Referência Certificado,
- Programas Interlaboratoriais,
- Análise Estatística,
- Metodologias Referendadas,
- Validação,
- Manutenção de Instrumentos,
- Treinamento,
- Rastreabilidade.

Para assegurar que a calibração de sistemas de medição seja realizada com a exatidão pretendida, metrologicamente devem ser considerados alguns requisitos para se obter a garantia da qualidade que compreendem: equipamentos de medição, sistema de comprovação metrológica, incerteza de medição, condições ambientais, rastreabilidade da medição e calibração; calibração e métodos de



ensaio, certificados de calibração e intervalos de calibração (NOVASKI; FRANCO, 2000).

A rastreabilidade está associada à qualidade de uma medição. A cadeia de rastreabilidade é fundamental em todas as áreas inclusive na área de medições químicas. Os resultados das medições devem estar relacionados a referências internacionalmente reconhecidas de forma a assegurar sua aceitabilidade. Este relacionamento é realizado através de padrões reconhecidos e validados (PONÇANO; CARVALHO, 2006).

Segundo Ellison e Williams (2012) o estabelecimento da rastreabilidade do resultado de um procedimento analítico completo deve ser obtido pela combinação dos seguintes fatores:

- Uso de padrão rastreável para calibrar os equipamentos de medição;
- Uso ou comparação de um método primário;
- Uso de material de referência (MR) de substância pura;
- Uso de material de referência certificado (MRC) com uma matriz apropriada e,
- Uso de procedimento aceito e rigorosamente definido.

De acordo com Filho (2003) a importância da avaliação da variabilidade dos resultados de uma medição está no fato desta levar a um conhecimento amplo e controle eficiente das variáveis que impactam sobre o resultado da medida propriamente dita. Em geral as etapas de um ensaio podem ser divididas em quatro e devem ser controladas de forma a reduzir a variabilidade nos resultados obtidos:

1ª) Confiabilidade instrumental: obtida pela qualificação instrumental e refere-se a todos os instrumentos críticos usados no ensaio.

2ª) Identificação dos gargalos da análise: relacionados às etapas críticas do ensaio.

3ª) Significância do resultado: relacionada ao mensurando ou o dado bruto ao universo amostrado, ou seja, a interpretação dos dados gerados no ensaio, por profissional experiente e conhecedor de todos os passos da análise.

4ª) Cumprimento de requisitos legais: onde os dados gerados no ensaio e contidos no relatório de análise serão confrontados com algum valor máximo ou mínimo exigidos legalmente.

Paiva (2001) afirma que os esforços em metrologia têm o objetivo primordial de realizar a medição com a melhor precisão e exatidão possíveis. A produção de dados laboratoriais necessita da presença de três contribuições que são:

- A ação dos técnicos de laboratório, habilitados para realizar a medição;

- A existência da metodologia com referência descrevendo os passos a serem realizados pelo operador no processo de obtenção de uma medida;
- O instrumento aferido/calibrado que torna possível realizar a correção da medição segundo a metodologia a ser executada pelo operador.

A metrologia é a ciência que realiza o estudo destas três contribuições, as quais são denominadas fatores metrológicos e impactam na confiabilidade de um resultado.

## 1.5 A INCERTEZA DE MEDIÇÃO NO RESULTADO ANALÍTICO

Os organismos de acreditação têm a responsabilidade de garantir que os laboratórios credenciados demonstrem competência para cumprir os requisitos estabelecidos pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. A norma requer métodos apropriados para serem usados na estimativa da incerteza da medição (IM). Entretanto a determinação de tal estimativa deveria ser incentivada mesmo quando não fosse obrigatório estabelecê-la, tendo em vista que a identificação das fontes de incerteza que realmente afetam o resultado da medição contribui para um entendimento mais amplo do ensaio, o que pode ser utilizado como uma excelente ferramenta para que melhorias possam ser introduzidas nos métodos analíticos originando benefícios (SANTOS et al., 2005).

A IM é uma importante característica de uma medida e por isso observa-se ao longo dos anos que a determinação da incerteza está gradativamente se tornando um requisito padrão nos resultados de análises químicas. Apesar disso não houve muito progresso no desenvolvimento de metodologias para a estimativa de incerteza de medição em ensaios analíticos nos últimos anos. Assim, considerando as peculiaridades da metrologia química, muito ainda precisa ser feito com o objetivo de alcançar uma situação satisfatória nessa área (LEITO et al., 2006).

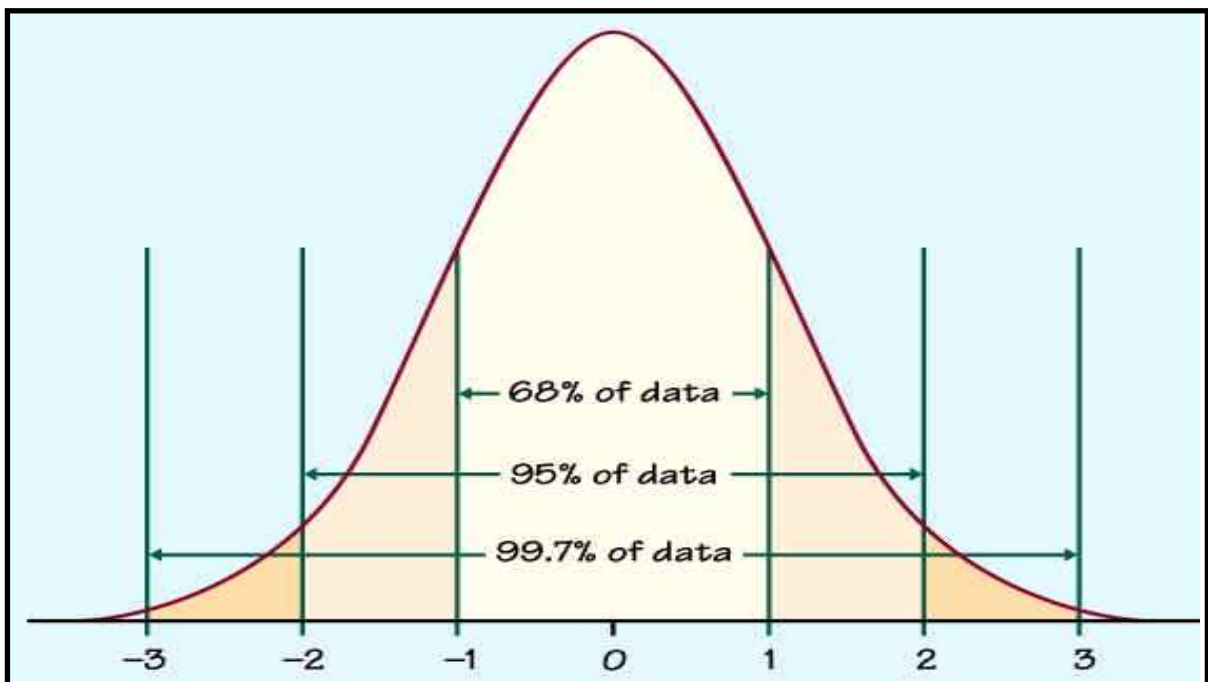
A avaliação das incertezas de medição em ensaios analíticos tem sido implementada gradualmente, em conformidade com a evolução dos requisitos exigidos pelo referencial que normatiza a acreditação dos laboratórios. Inicialmente era obrigatória a identificação das fontes de incerteza que impactavam no resultado do ensaio, depois era necessária uma estimativa simplificada da incerteza de medição e atualmente de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, os laboratórios devem ter e aplicar procedimentos para cálculo das incertezas de

medição (SOUZA et al., 2007). Segundo a Eurachem, rede de organizações na Europa que tem por objetivo estabelecer um sistema para a rastreabilidade internacional de medições químicas e a promoção de boas práticas de qualidade, a determinação da incerteza de medição será um dos maiores desafios para laboratórios que atuam no campo da química analítica a curto-médio prazo (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

A incerteza de medição bem como o desvio padrão de uma medida estão relacionados com o termo precisão. Estas são medidas de dispersão e apresentam-se como valores que representam o quão dispersos encontram-se os resultados de um experimento com relação a um valor de tendência central (média, moda ou mediana). A exatidão refere-se à conformidade com o valor real e está relacionada com algum tipo de medida de tendência central. O desvio padrão é a forma mais comum de expressar dispersão, pois apresenta-se na mesma unidade de grandeza do mensurando (BUSSAB; MORETTIN, 2005; INMETRO, 2012).

A grande maioria das variáveis aleatórias contínuas apresenta uma distribuição de densidade de probabilidade normal. Isso significa que se um ensaio, por exemplo, for repetido infinitas vezes, a distribuição de probabilidade desses resultados será representada por um gráfico semelhante ao da figura 1, que representa a distribuição normal reduzida de Gauss (BUSSAB; MORETTIN, 2005).

Figura 1: Distribuição de Probabilidade Normal

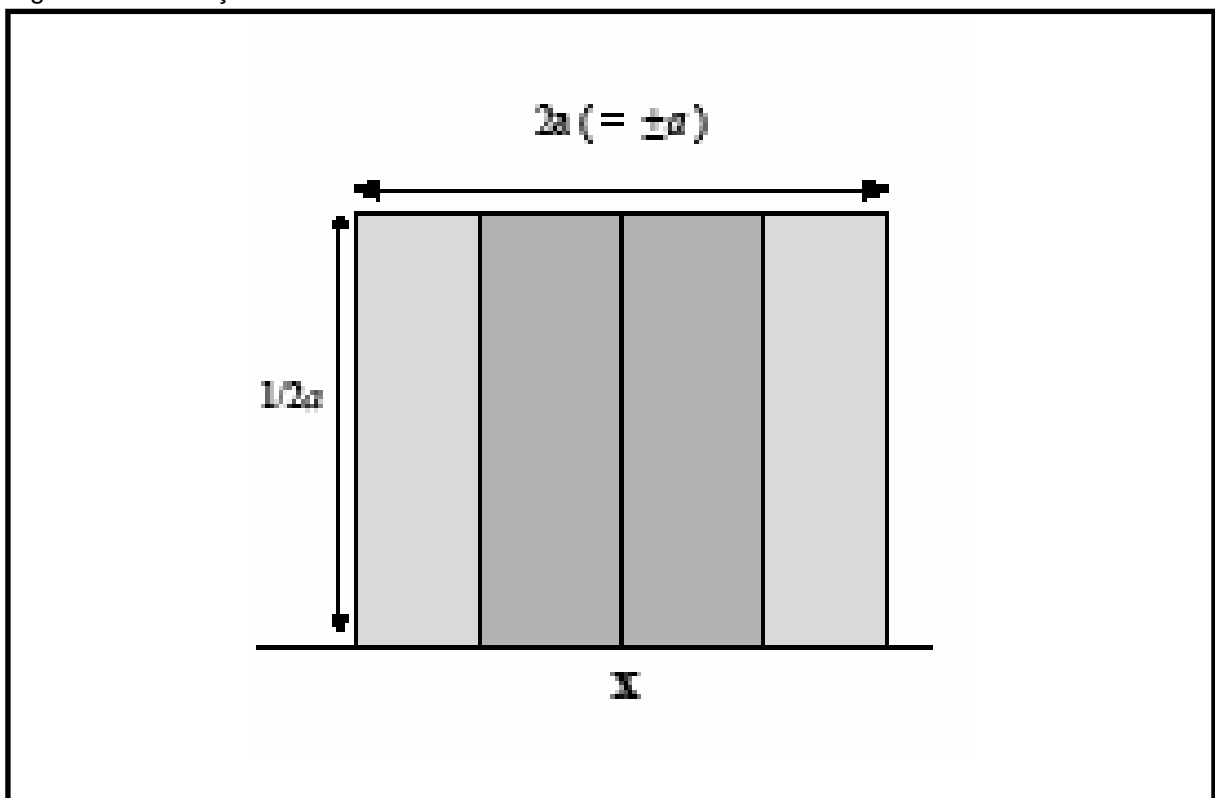


Fonte: (BUSSAB; MORETTIN, 2005).

A distribuição normal reduzida é uma distribuição perfeitamente simétrica e apresenta média zero (0) e desvio padrão um (1). O desvio padrão, para uma distribuição normal, é de grande importância, pois temos uma probabilidade de 0,68 de encontrarmos o valor verdadeiro da grandeza dentro do intervalo definido pela média menos um desvio padrão e média mais um desvio padrão (BUSSAB; MORETTIN, 2005).

Entretanto também é comum observar em muitos sistemas de medida comportamentos diferentes da distribuição normal, caracterizando uma distribuição de densidade de probabilidade diferente. No cálculo de incerteza de medição são muito utilizadas a distribuição retangular ou uniforme e a distribuição triangular, além da distribuição Student. Na distribuição retangular ou uniforme de frequência, representada pela figura 2, considera-se que todos os valores dentro de um determinado intervalo de medida possuem a mesma probabilidade de ocorrência. Essa distribuição é a que leva a um maior valor de variabilidade, em função de apresentar probabilidade constante para intervalos de valores iguais (INMETRO, 2012).

Figura 2: Distribuição de Probabilidade Uniforme



Fonte: (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

O desvio padrão da distribuição uniforme é dado pela equação 1:

$$s = a / \sqrt{3} \quad (1)$$

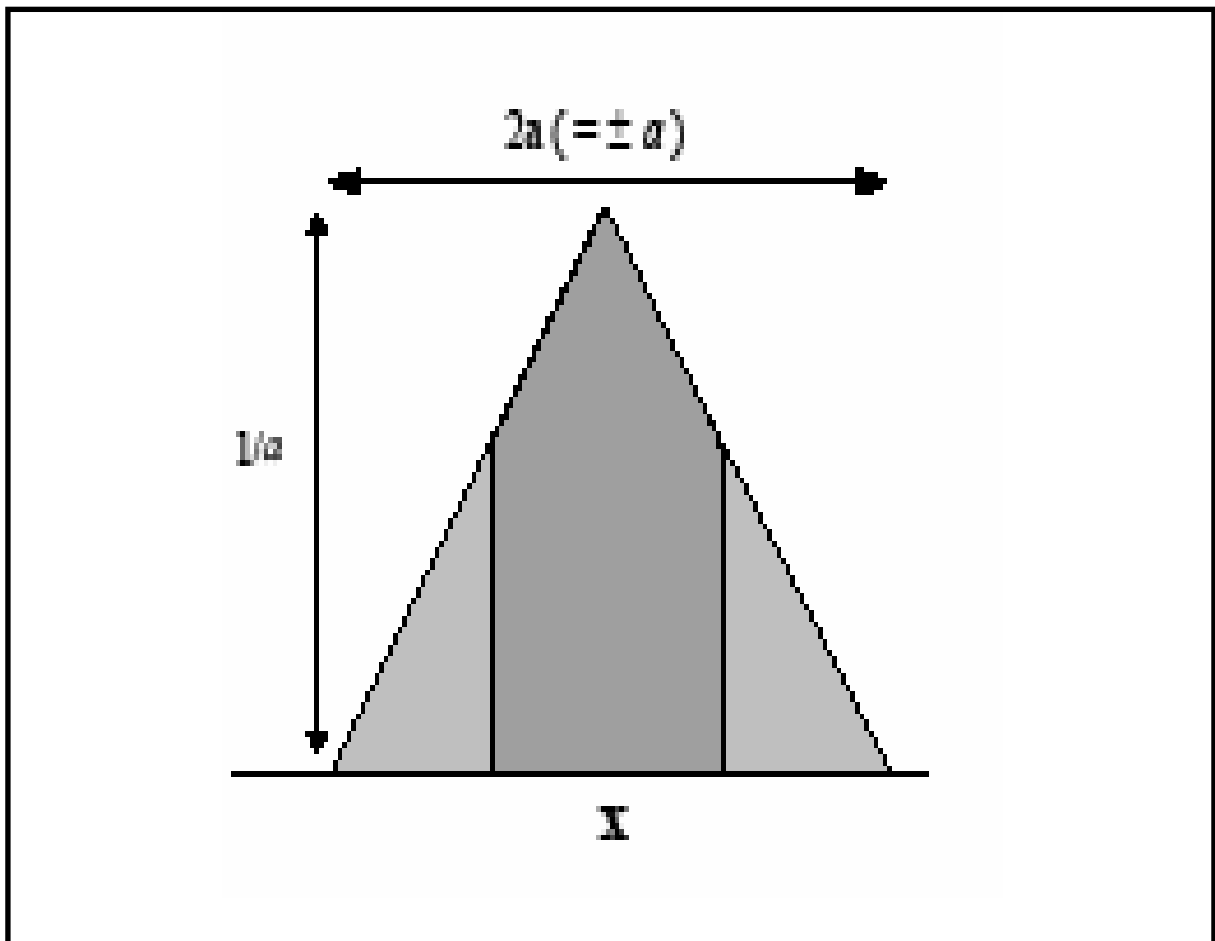
onde:

s = desvio padrão

a = amplitude

Na distribuição de frequência triangular simétrica, representada pela figura 3 considera-se que os valores centrais possuem uma maior probabilidade de ocorrência dentro de um determinado intervalo de medida e esta probabilidade decresce de forma linear quando nos afastamos do valor central (INMETRO, 2012).

Figura 3: Distribuição de Probabilidade Triangular Simétrica



Fonte: (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Ao considerar essa distribuição de probabilidade, assume-se um menor valor de variabilidade quando comparada a uma distribuição retangular. Dessa forma passa-se a ter uma incerteza menor. Nesse caso o desvio padrão é dado pela equação 2 (INMETRO, 2012).

$$s = a / \sqrt{6} \quad (2)$$

onde:

s = desvio padrão

a = amplitude

A distribuição Student apresenta uma distribuição de densidade de probabilidade similar à distribuição normal, mas apresentando uma grande dependência do tamanho amostral. O desvio padrão da distribuição Student é obtido pela equação 3 (INMETRO, 2012).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

onde:

s = desvio padrão amostral

$\bar{x}$  = média amostral

$x_i$  = valor individual de uma repetição

n = nº de elementos da amostra

Uma fonte de erro muito comum quando se inicia o cálculo da incerteza de medição é considerar o intervalo de confiança como sendo a própria incerteza. Quando é definido o intervalo de confiança mais provável para o resultado de um

ensaio analítico, tal intervalo levará em consideração o número de amostras, a média aritmética e o desvio padrão para os valores obtidos naquele experimento. Entretanto esse intervalo de confiança representa um corte transversal daquele momento analítico, pois tal intervalo será calculado considerando apenas os valores resultantes da mensuração propriamente dita que darão origem à média aritmética para o resultado analítico e seu respectivo desvio padrão, que demonstrará a dispersão dos valores obtidos em relação à média aritmética dos mesmos (VOGEL, 2002; ELLISON; WILLIAMS, 2012; INMETRO, 2012).

O cálculo da incerteza de medição inerente a uma medida de um resultado analítico reúne todos os fatores e variáveis que podem influenciar na dispersão dos resultados que acompanham a medida de tendência central. Dessa forma a incerteza de medição acrescenta qualidade a um resultado analítico, tornando possível a percepção das possíveis fontes de incerteza que podem ter impacto negativo na qualidade do resultado, bem como a visualização com mais clareza de possíveis investimentos para obtenção de melhorias nos processos analíticos gerando a possibilidade de redução de custos e reprocessos (ELLISON; WILLIAMS, 2012; INMETRO, 2012).

A incerteza de medição é definida como sendo um parâmetro associado ao resultado de uma medição, seja ela uma calibração ou um ensaio, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (INMETRO, 2012). O conhecimento da dispersão desses valores possibilita conhecer a precisão do resultado (Figura 4).

Figura 4: Diferença entre Exatidão e Precisão;



Fonte: (BUSSAB; MORETTIN, 2005).

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 tem como uma de suas diretrizes a garantia da confiabilidade dos resultados de medição e para isso estabelece como um dos requisitos a determinação da incerteza de medição do resultado de forma padronizada. Geralmente, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando, tornando-se completo somente quando acompanhado pela declaração da incerteza dessa estimativa. Dessa forma, a incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando, contribuindo como uma indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade (CRUZ, et.al., 2010; MOURA, et.al., 2011).

É muito importante distinguir o termo erro, em um resultado de medição, do termo incerteza de medição. O termo erro é o resultado da diferença entre o resultado de uma medição individual e o valor verdadeiro do mensurando. O termo incerteza da medição apresenta-se sob a forma de uma faixa e caracteriza-se pela dispersão dos resultados atribuídos ao mensurando. O valor da incerteza não pode ser usado para corrigir o resultado de uma medição, pois é considerado como uma dúvida que acompanha o resultado (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Existem dois tipos de erro: erro aleatório e erro sistemático. O erro aleatório é oriundo das variações não previstas que impactam nos resultados das medições. Ele está sempre presente e não pode ser compensado, mas em geral pode ser reduzido pelo aumento do número de observações. O erro sistemático é decorrente de uma falha no projeto de um experimento ou em uma falha de um equipamento ou uma falha em não considerar o branco do reagente. É reproduzível se o experimento for conduzido várias vezes da mesma maneira. Ele é independente do número de medições feitas e não pode, portanto, ser reduzido pelo aumento do número de análises sob condição de medições constantes (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

O resultado de uma medição é o valor atribuído a um mensurando obtido por medição, devendo sua expressão completa incluir informações sobre a incerteza de medição, que é empregada com frequência para verificação do desempenho de laboratórios. Se dimensionada inadequadamente, a incerteza de medição pode apontar, indevidamente, incompatibilidade de resultados de medições (SARAIVA, 2009). Os laboratórios de ensaios analíticos devem ter procedimentos para cálculo das incertezas de medição para os métodos de ensaio analíticos que são utilizados em sua rotina diária (ABNT, 2005).



Apesar do nome “incerteza” este parâmetro não traz em sua definição uma característica de dúvida. Esta seria descrita de forma mais adequada como sendo o intervalo onde poderemos encontrar com certo grau de certeza o valor da medida avaliada. A avaliação da incerteza é baseada na identificação e quantificação dos efeitos dos parâmetros que influenciam a incerteza global e requer a compreensão do procedimento de medição e das incertezas associadas a cada um dos fatores que influenciam o resultado (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Alguns componentes da incerteza podem ser estimados por meio de desvio padrão experimental ou avaliados por meio de distribuição de probabilidades assumidas. De acordo com Ellison e Williams (2012) a incerteza pode ser apresentada como:

- incerteza padrão, quando um componente da incerteza é expresso por meio de um desvio padrão;
- incerteza padrão combinada, sendo esta a incerteza padrão do resultado de uma medição quando este resultado é obtido por meio dos valores de várias outras grandezas;
- incerteza expandida, que fornece um intervalo dentro do qual se acredita com uma alta probabilidade de abrangência, que o valor do mensurando esteja ali contido. Conforme a equação 4, o valor da incerteza expandida é obtido pela multiplicação da incerteza padrão combinada por um fator de abrangência, sendo este fator baseado na probabilidade de abrangência desejada.

$$U = u_c \cdot k \quad (4)$$

Onde:

U = Incerteza Expandida

$u_c$  = Incerteza combinada

k = Fator de Abrangência

A incerteza padrão classifica-se em tipo A e tipo B. O objetivo dessa classificação é a indicação das duas formas de avaliar as componentes da incerteza. Ambos os tipos de avaliação baseiam-se em distribuições de probabilidade e os componentes da incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variância ou desvios padrão.

- Incerteza padrão Tipo A: é resultado de um método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações obtidas sob condições definidas de medição.
- Incerteza padrão Tipo B: é resultado de um método de avaliação da incerteza por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações usando, por exemplo, especificações de equipamentos, valores publicados em compêndios oficiais e valores de certificados de calibração. (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Os componentes das incertezas padrão do Tipo A e do Tipo B, independente de suas classificações, são modelados pelo tipo de distribuição de probabilidade e quantificados pela variância ou pelo desvio padrão. Normalmente a incerteza padrão do tipo A é utilizada na obtenção do valor de repetitividade de um processo de medição, exibido em um dado momento. Para a determinação deste tipo de incerteza deve-se executar uma série de repetições em iguais condições (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

A incerteza de uma medida é uma representação final da propagação de um grande número de incertezas que se encontram associadas a um determinado mensurando. As incertezas intermediárias são representadas por desvios-padrão e são chamadas de incertezas padronizadas ( $u_i$ ). Combinando as incertezas padronizadas obtemos a incerteza padronizada combinada ( $u_c(y)$ ). Por uma questão de segurança multiplicamos a incerteza combinada por um fator  $k$  que chamamos fator de expansão ou abrangência, obtendo a incerteza expandida ( $U$ ) (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Uma forma simples de se chegar à incerteza de uma determinada medida é por meio de uma retroanálise, ou seja, realizando uma análise da expressão matemática que define o mensurando de forma a encontrar as incertezas das variáveis principais. Assim para cada variável principal é determinada a incerteza das variáveis a ela relacionadas. Tal procedimento é executado de forma recorrente até que sejam alcançados níveis onde as incertezas já não representem peso

substancial na incerteza do mensurando (DIAS; CAMÕES; OLIVEIRA, 2008). Para realizar tal análise Ellison e Williams (2012) recomendam que sejam percorridas as etapas descritas a seguir:

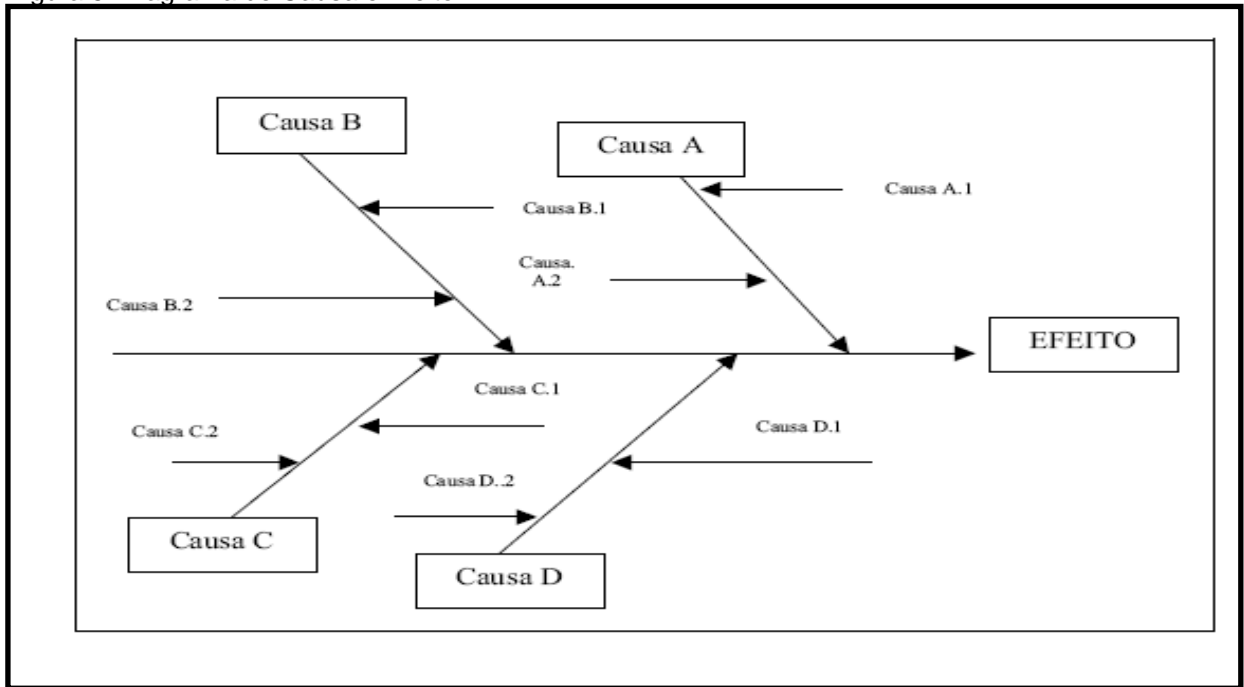
#### 1.5.1 Especificação do Mensurando

A especificação do mensurando consiste na definição clara do que será medido, relacionando por meio de expressões matemáticas, as variáveis que interferem direta ou indiretamente no valor daquilo que se está medindo. Nesta etapa é definida a metodologia que será empregada na obtenção do valor do mensurando (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

#### 1.5.2 Identificação das Fontes de Incerteza

Para identificação e análise das possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas a serem avaliadas, os procedimentos aplicados em cada etapa devem ser detalhadamente estruturados de forma a garantir a máxima abrangência, evitando assim a duplicidade de fontes de incerteza. Com o objetivo de se obter uma visão da contribuição dessas fontes para a incerteza final é comumente construído um diagrama denominado de causa e efeito ou diagrama de Ishikawa, conforme figura 5, o qual foi originalmente proposto por Kaoru Ishikawa em 1943 e é bastante utilizado como uma ferramenta gráfica para identificar, organizar e apresentar de modo estruturado as causas e problemas em processos, no entanto quando usado na determinação da incerteza de medição, permite estruturar hierarquicamente, de forma gráfica e sintética, as fontes de determinada incerteza que têm influência sobre a qualidade dos resultados, proporcionando melhor visualização (BRANDÃO, 2008).

Figura 5: Diagrama de Causa e Efeito



Fonte: BRANDÃO, 2008

### 1.5.3 Quantificação dos Componentes da Incerteza

Nesta etapa, de acordo com Ellison e Williams (2012) são medidos ou estimados os valores dos componentes das incertezas associados a cada fonte potencial de incerteza identificada na etapa anterior. As principais formas de quantificação das incertezas são:

- Determinação experimental (todas as grandezas do tipo A);
- Incertezas oriundas de certificados de calibração;
- Incertezas estimadas, considerando conhecimento do comportamento da grandeza;
- Incertezas de grandezas não mensuráveis.

### 1.5.4 Cálculo da Incerteza Combinada

A incerteza da medida é um parâmetro de propagação das incertezas de todas as etapas envolvidas para o cálculo da medida analítica.

O cálculo da incerteza de medição pode ser feito basicamente de duas formas:

- O método das incertezas por derivadas parciais e
- O método das incertezas relativas.

Quando o cálculo da incerteza de medição é aplicado a métodos relacionados à química analítica, o método das incertezas relativas é o mais recomendado. Tal fato é consequência da dificuldade encontrada no método das derivadas parciais em representar algumas incertezas que matematicamente não podem ser descritas na equação do mensurando. Essas incertezas podem ser exemplificadas pela incerteza oriunda da repetitividade de avolumação ou da incerteza proveniente do analista, as quais analiticamente não podem ser descritas na expressão de obtenção do mensurando. Assim torna-se impossível o cálculo da derivada parcial da função de interesse com relação a essa grandeza (GONÇALVES JR, 2004; INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

O cálculo da incerteza de medição pelo método das incertezas relativas é feito propagando-se a incerteza combinada de cada etapa analítica segundo a expressão da lei das propagações. Assim considerando uma variável  $y$  que depende das variáveis  $a$ ;  $b$ ;  $c$ ;...;  $n$  e estas apresentem unidades diferentes, ou seja, a unidade de “ $a$ ” é diferente da unidade de “ $b$ ” que é diferente da unidade de “ $c$ ”, etc (equação 5) (GONÇALVES, 2004; INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012)..

$$y = a + b + c + \dots + n \quad (5)$$

O cálculo da incerteza combinada será dado pela equação 6:

$$\left(\frac{u_y}{y}\right)^2 = \left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_n}{n}\right)^2 \quad (6)$$

Então a incerteza de  $y$  é dada pela equação 7:

$$u_y = (y) \cdot \sqrt{\left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_n}{n}\right)^2} \quad (7)$$

#### 1.5.5 Cálculo do Fator de Abrangência

O fator de abrangência ( $k$ ) é um parâmetro multiplicador da incerteza combinada  $u_c(y)$  para obtenção da incerteza expandida  $U(y)$  (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

O fator de abrangência é obtido por meio da tabela de distribuição de Student. Tal distribuição apresenta uma grande semelhança com a distribuição Normal, entretanto é uma distribuição que representa de forma mais adequada os sistemas com um tamanho amostral pequeno. Quando uma distribuição é aplicada para determinar um intervalo, é necessário que o nível de significância ( $\alpha$ ) seja definido, em função deste estar relacionado ao grau de confiança estabelecido para aquele intervalo. Geralmente o nível de significância é definido como 0,05, por serem considerados válidos 0,95 de toda distribuição. Assim quando é estabelecido um grau de confiança de 95%, consideram-se válidos 95% de todos os resultados possíveis (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

O número de graus de liberdade e o nível de significância são parâmetros fundamentais no cálculo da incerteza de medição. No processo de cálculo da incerteza, o grau de liberdade é denominado grau de liberdade efetivo e é obtido pela propagação do grau de liberdade de todas as incertezas do tipo A apontadas no diagrama de causa e efeito. Assim considerando que a equação da grandeza a ser medida é dada pela equação 8 (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

$$y = x_1 + x_2 + \dots + x_n \quad (8)$$

Então o número de graus de liberdade é dado pela equação 9 (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012):

$$v_{eff} = \frac{u_y^4}{\sum_{i=1}^N \frac{u_{X_i}^4}{v_{X_i}}} \quad (9)$$

Onde  $v_{eff}$  = é o número de graus de liberdade efetivo

$u_y$  : incerteza padrão combinada do mensurando

$u_{x_i}$  : incerteza padrão da variável  $x_i$

$v_{x_i}$  : graus de liberdade da variável  $x_i$

Para incertezas do tipo A, o grau de liberdade é dado pelo número de repetições menos um, enquanto que incertezas do tipo B apresentam graus de liberdade infinito. (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

#### 1.5.6 Cálculo da Incerteza Expandida

A incerteza expandida (U) é obtida pela multiplicação do fator de abrangência (k) pela incerteza combinada ( $u_c$ ) do mensurando conforme equação 10 (INMETRO, 2012; ELLISON; WILLIAMS, 2012).

$$U(y) = k \cdot u_c(y) \quad (10)$$

#### 1.6 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE

A análise de sensibilidade é uma análise comumente aplicada nos estudos de viabilidade econômica e financeira, com o intuito de mensurar a sensibilidade dos

indicadores de viabilidade a determinadas variáveis fundamentais da análise e dessa forma medir o grau de risco daquilo que é obtido como conclusão (NUNES, 2009). Pode-se inferir por analogia a sua aplicação em um estudo da sensibilidade dos resultados obtidos em um ensaio com relação às fontes de incerteza identificadas em uma metodologia analítica e suas contribuições para a incerteza padrão combinada do resultado analítico (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

Quando a incerteza de uma determinada medida é calculada, a verdadeira variabilidade da grandeza passa a ser conhecida. Sendo assim, o cálculo da incerteza pode ser utilizado para avaliação do impacto dos parâmetros metodológicos, que levaram àquela incerteza, na qualidade de um determinado produto. Nesta avaliação é determinado o grau de importância de cada parâmetro na incerteza final do mensurando. Quando são tratados parâmetros que avaliam a conformidade de um determinado produto, comumente pequenas variações de grandezas podem apresentar grande representatividade na incerteza do mensurando, levando à consideráveis variações deste e, tornando o resultado analítico pouco confiável perante a decisão de aprovar ou reprovar o referido produto. Para avaliação da sensibilidade da incerteza do mensurando com relação à incerteza padrão de cada item metodológico são construídos gráficos que relacionam a incerteza relativa de cada componente de incerteza e a incerteza final (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

## 1.7 CLAE NA ANÁLISE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método amplamente utilizado no controle da qualidade de medicamentos na indústria farmacêutica, sendo freqüentemente preconizado nas monografias de compêndios oficiais como método de escolha para análise quantitativa de fármacos e medicamentos.

A CLAE é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases, a fase estacionária finamente dividida e a fase móvel líquida. A fase estacionária é o “suporte” revestindo o interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente. Estes sistemas são capazes de separar misturas de complexidade elevadas. Os componentes da amostra vão sendo retidos de forma seletiva na fase estacionária, o que resulta em migrações em



tempos diferentes, definidas pela maior ou menor afinidade da amostra com a fase móvel. São consideradas como principais características da CLAE : o alto poder de resolução, as separações rápidas, a possibilidade de monitoramento contínuo do eluente e a exatidão das medidas quantitativas (VOGEL, 2002).

### 1.7.1 Principais componentes de um sistema de cromatografia líquida de Alta Eficiência

#### 1.7.1.1 *Fase Móvel*

A separação satisfatória do analito está relacionada à interação entre o soluto, a fase móvel e a fase estacionária. Com o objetivo de garantir a repetitividade do desempenho os solventes utilizados devem apresentar o maior grau de pureza possível. Atualmente o mercado oferece solvente grau CLAE, inclusive água, sendo necessário degaseificá-lo. O poder de eluição da fase móvel é determinado por sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e pela natureza do analito (VOGEL, 2002).

#### 1.7.1.2 *Bombas*

As principais características de uma bomba a ser utilizada na CLAE são: a capacidade de gerar pressões de até 6000 psi, saída com ausência de pulsação, vazões que encontrem-se na faixa de 0,1 a 1,0 mL/min e resistência à corrosão por vários tipos de solventes (VOGEL, 2002).

### 1.7.1.3 *Injeção de Amostras*

As formas mais comuns de injeção de amostras na CLAE são: manual com seringa ou automática com válvulas de amostragem. As válvulas de amostragem são mais utilizadas atualmente, e permitem a entrada de amostra de forma reprodutiva, sem interrupções significativas do fluxo da fase móvel (VOGEL, 2002).

### 1.7.1.4 *Colunas*

As colunas mais utilizadas são as de tubo de aço inox que apresentam diâmetro interno de 4 a 5 mm e comprimentos que variam de 7,5 a 30 cm. É comum o empacotamento feito por partículas porosas de sílica menores que 10µm, sendo utilizadas em quase todas as colunas de CLAE. O número de pratos teóricos da coluna é proporcional ao comprimento da mesma e à velocidade da análise. Dessa forma o tamanho da coluna pode influenciar a resolução da amostra (HARRIS, 2008).

### 1.7.1.5 *Detector*

O detector na CLAE mais utilizado é o de absorção no ultravioleta, ele mede a quantidade de luz UV/VIS absorvida durante a passagem do eluente por uma pequena célula de fluxo colocada no caminho ótico do feixe de radiação (VOGEL, 2002). A figura 6 mostra um sistema simplificado de CLAE.

Figura 6 - Estrutura básica de um cromatógrafo líquido de alta eficiência



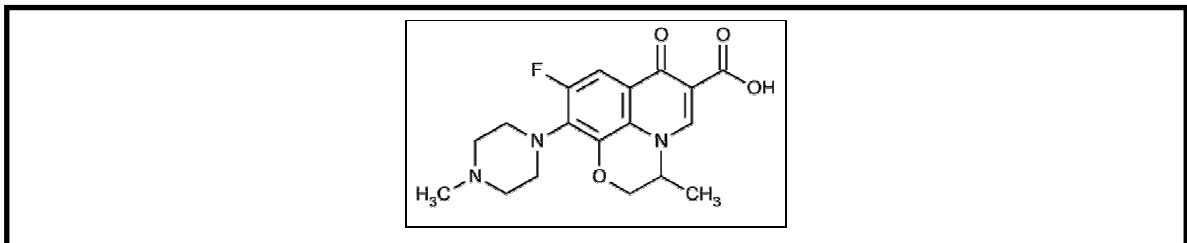
Fonte: <http://images.google.com.br> (Acesso em 10 de julho de 2012).

## 1.8 O OFLOXACINO E O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

### 1.8.1 Ofloxacino

O Ofloxacino,  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ , (Figura 7) pertence a uma importante classe de antimicrobianos sintéticos, as fluoroquinolonas, que devido ao seu amplo espectro, são usadas com sucesso no combate à Tuberculose (TB), sendo frequentemente indicados nos casos de Tuberculose Multirresistente (TB MR). Seu mecanismo de ação é baseado na inibição da DNA girase bacteriana, enzima envolvida na replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano (CASTRO, 2010).

Figura 7: Estrutura Química do Ofloxacino



Fonte: FARMACOPEIA, 2010.

O Ofloxacino faz parte da lista de medicamentos inclusos no programa de

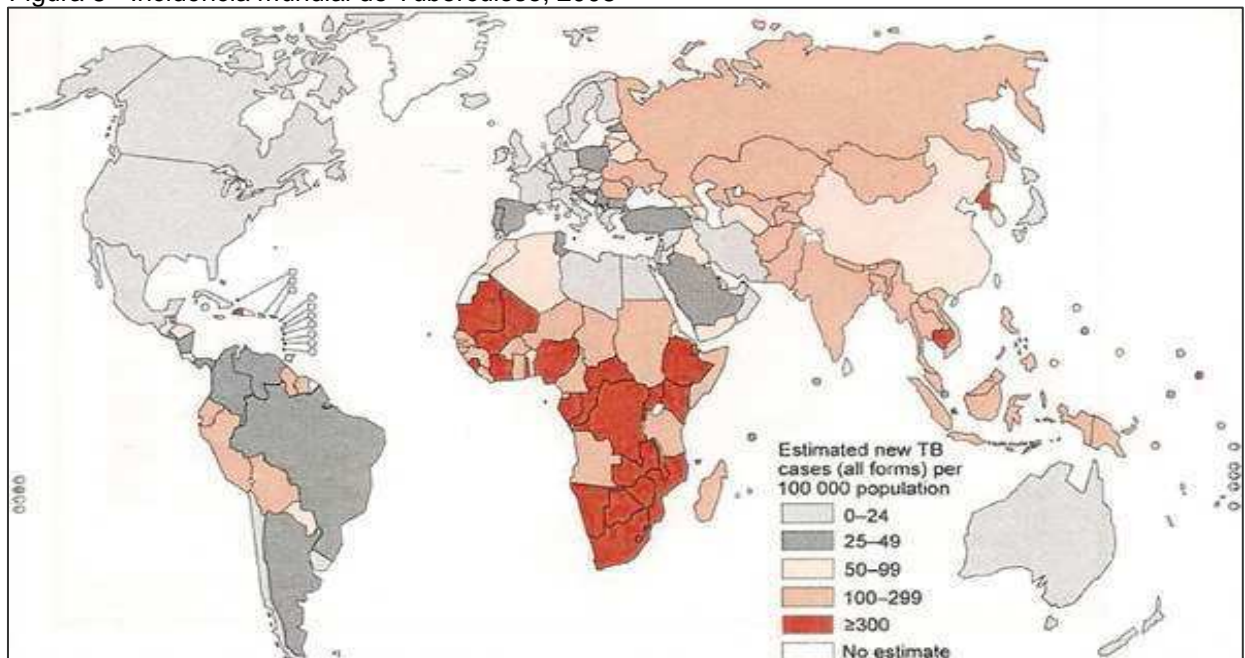
tratamento da TB da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da linha de produtos fabricados pelo Laboratório Farmacêutico da Marinha (LFM), laboratório oficial (LO), que produz medicamentos para o MS.

### 1.8.2 Histórico e Situação Atual da Tuberculose

A TB é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria conhecida como Bacilo de Koch (BK). É uma doença que está registrada nos relatos da Grécia e da Roma antigas e que continua sendo uma das principais causas de morte por doença infecciosa no mundo (SOUZA; VASCONCELOS, 2005; JUNIOR, 2007). A TB é transmitida pelo ar, atingindo principalmente os pulmões, mas podendo também desenvolver-se em outras partes do organismo, como ossos, laringe, articulações, rins, pele, meninges e intestino (CARDOSO et al., 2009).

A tuberculose apresenta uma distribuição em nível mundial, conforme demonstrado pela Figura 8.

Figura 8 - Incidência mundial de Tuberculose, 2008



Fonte: WHO, 2010.

Atualmente, a TB ainda apresenta-se como um grave problema de saúde

pública, representando uma das principais doenças infectocontagiosas em países em desenvolvimento. Alguns fatores responsáveis pela disseminação dessa doença são: a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento populacional, o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos medicamentos e o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) (SOUZA; VASCONCELOS, 2005).

Cerca de 80% dos casos novos estão distribuídos em 22 países do mundo, que são em ordem decrescente de incidência: Índia, China, Indonésia, Nigéria, Bangladesh, Paquistão, Etiópia, Filipinas, África do sul, Congo, Rússia, Quênia, Vietnã, Tanzânia, Brasil, Uganda, Zimbábue, Moçambique, Tailândia, Afeganistão, Camboja e Mianmar (WHO, 2010).

A TB é uma doença de elevada prevalência, que apresenta um alto custo social, em função de acometer principalmente adultos jovens na sua fase produtiva, excluindo-os do mercado de trabalho por incapacidade funcional (XAVIER, 2006). No Brasil, 50% dos casos notificados ao Sistema de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, são de pacientes entre 20 e 40 anos (DALCOLMO; ANDRADE; PICON, 2007).

Dalcolmo; Andrade; Picon (2007) acrescentam ainda que em países emergentes, as desigualdades sociais acarretam crescimento populacional, aumento da condição de pobreza e falta de acesso a serviços que repercutem negativamente em pandemias como a SIDA/AIDS e doenças endêmicas como a própria TB. Essas situações sociais acarretam então, a deterioração dos programas de controle da TB e, conseqüentemente um aumento expressivo de resistência aos fármacos existentes para tratamento da TB bem como o aparecimento das formas de TB MR e no ano de 2006 o surgimento de uma forma ainda mais grave denominada tuberculose extensivamente resistente.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB caracteriza-se como TB MR quando o bacilo é resistente simultaneamente à rifampicina e isoniazida, medicamentos de primeira linha no tratamento da TB. Quando a TB, além de classificada como TB MR, também apresenta resistência a uma fluoroquinolona e um agente injetável de segunda linha é classificada como TB extensivamente resistente (WHO, 2009).

De acordo com a OMS, o aumento dos casos de resistência ao longo dos anos é consequência de vários fatores como tratamento não supervisionado, tratamento medicamentoso inadequado, disponibilidade de tuberculostáticos sem

prescrição médica ou controle, métodos inadequados para declarar pacientes curados e para controle de infecção bem como a deficiência na qualidade dos medicamentos fornecidos para o tratamento da doença (WHO, 2009).

Os principais fatores que contribuem para manutenção e agravamento do problema são a persistência da pobreza em nossa sociedade e a ocorrência de SIDA/AIDS nos grandes centros. O Brasil, de acordo com dados do MS em 2010, encontrava-se em 19º lugar no mundo em número de casos da doença. O Rio de Janeiro é o estado brasileiro que apresenta a maior incidência da doença: cerca de 69 casos para cada 100 mil habitantes (MS, 2010).

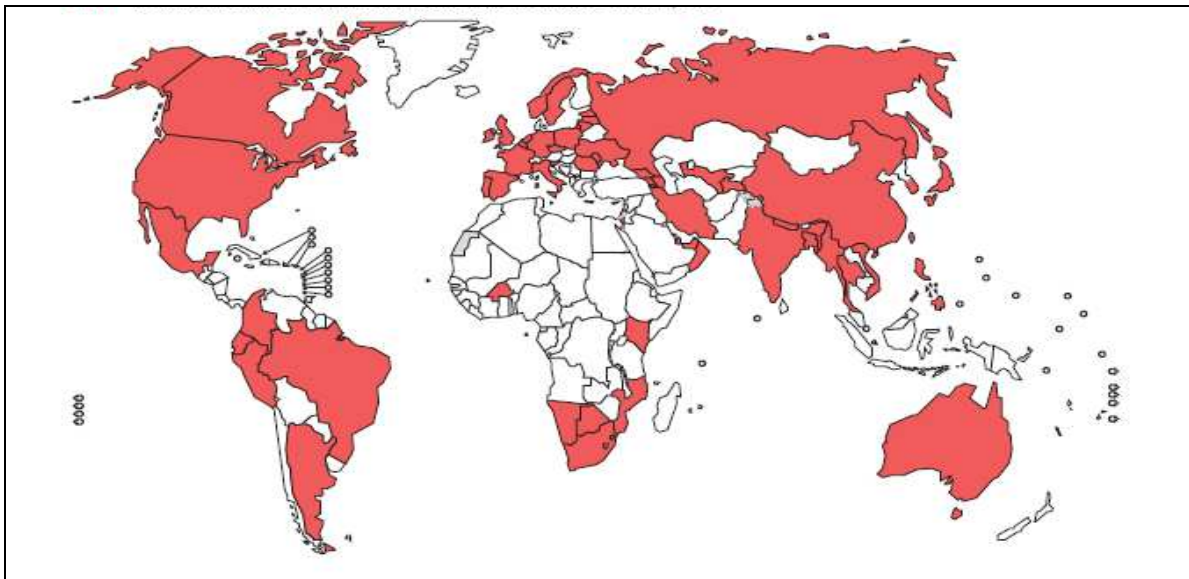
Segundo dados da OMS em 2010 ocorreram mundialmente cerca de 10 milhões de novos casos de TB e aproximadamente 1 milhão de casos recidivos em 2007. Deste total, aproximadamente 511.000 eram casos de TB MR e 50.000 eram casos de TB de extensa resistência, inclusive aos medicamentos de 2ª linha. Como agravante, cerca de 1,4 milhões de casos desta doença estão associados a pacientes portadores de SIDA/AIDS. Foi estimado também que aproximadamente 500.000 pacientes morram de coinfeção de SIDA/AIDS/TB e que cerca de 2 milhões de pessoas morram anualmente de todas as formas de TB (WHO, 2010). Vide Tabela 2 e Figura 9.

Tabela 2

Número de países que relataram dados de resistência à drogas anti-TB de 2ª linha por região	
<i>Região da OMS (Nº de Países)</i>	Nº de Países que relataram resistência 2ª linha (%)
África(46)	3(7)
Américas (35)	3(9)
Mediterrâneo Leste (21)	1(5)
Europa (53)	31(58)
Sudeste Ásia	2(18)
Oeste do Pacífico	6(22)
Total	46(24)

Fonte: WHO, 2010.

Figura 9 - Distribuição de países que relataram ao menos 1 caso de TB extensivamente resistente em 2009.



Fonte: WHO, 2010.

Segundo o MS (2010) no Brasil o principal procedimento que tem sido aplicado para evitar o surgimento da TB MR, é o de aumentar a adesão do paciente ao tratamento, de forma a assegurar a cura e evitar o abandono. Um dos fatores que contribui para a baixa taxa de TB MR é a utilização da apresentação de isoniazida e rifampicina, associadas em uma única cápsula, assim como a ausência de tuberculostáticos à venda em farmácias no mercado brasileiro.

Organismos internacionais de combate à TB, em especial a OMS estabeleceram, um programa de tratamento supervisionado denominado Directly Observed Treatment Short (DOTS). Este programa tem como objetivo a promoção do cumprimento de metas para alcançar um mundo livre de TB. A meta é a redução até 2015 em 50% a prevalência e as mortes registradas em 1990, eliminando a TB como problema de saúde pública, limitando a doença a um caso por milhão de habitantes até o ano de 2050 (WHO, 2009).

### 1.8.3 A Qualidade dos Medicamentos Antituberculose

No Brasil, segundo Dalcolmo, Andrade e Picon (2007) existem protocolos padronizados para o tratamento da TB, segundo critérios como forma clínica, idade,

história de tratamento anterior e resultado do tratamento. O tratamento resulta de uma associação de fármacos realizado em duas fases: primeira fase, inicial ou de ataque, e tem a finalidade de rápida redução da carga bacteriana, evitando a resistência; segunda fase, de manutenção, tem o objetivo de eliminação das cepas resistentes (de crescimento lento), evitando a reativação da doença. Os medicamentos antituberculose que compõem os regimes de tratamento são:

- a) Grupo 1- de primeira linha, oral: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida.
- b) Grupo 2- injetáveis: estreptomicina, canamicina, amicacina, capreomicina, (devendo ser usado na fase inicial da TB MR).
- c) Grupo 3- quinolonas: ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacina (de primeira escolha na TB MR).
- d) Grupo 4- de segunda linha: etionamida, protionamida, cicloserina ou terizidona, ácido paraminosalicílico.
- e) Grupo 5- fármacos de reforço: amoxicilina/clavulanato, clofazimina, tiosemicarbazona, altas doses de isoniazida.

De acordo com a OMS, entre os vários fatores que promovem o aumento de casos da TB encontram-se o fornecimento irregular e a deficiência na qualidade dos medicamentos disponibilizados ao tratamento (WHO, 2009). Assim, com o intuito de reduzir tais fatores, a OMS criou em 2001 em parceria com as Agências Reguladoras de diversos países, um programa para pré-qualificação de medicamentos essenciais para programas de combate à doenças como a TB (WHO, 2010).

O programa de pré-qualificação de medicamentos tem por objetivo assegurar que medicamentos de alta qualidade estarão disponíveis à população. Padrões de aceitação de qualidade, segurança e eficácia são verificados por meio de inspeção aos fabricantes de medicamentos. Somente após aprovação, tais fabricantes tornam-se integrantes do programa de fornecimento de medicamentos para controle da TB (WHO, 2010).

Ainda segundo dados da OMS, é bastante claro que a utilização de medicamentos de baixa qualidade contribui para a falência no tratamento de uma doença, bem como para o aparecimento de reações adversas, resistência a medicamentos e até mesmo morte. O programa para pré-qualificação de medicamentos essenciais de âmbito global facilita o acesso a medicamentos de padrões de qualidade reconhecidos e é uma contribuição ao controle de TB em



países com acesso limitado a medicamentos com qualidade. Esses medicamentos quando disponíveis com preços acessíveis, com qualidade segura e adequadamente utilizados são capazes de salvar vidas e melhorar a saúde da população (WHO, 2010).

## 2 JUSTIFICATIVA

A determinação da incerteza de medição na CLAE é uma indicação quantitativa da qualidade do resultado obtido, sendo, portanto, uma ferramenta da qualidade que pode ser aplicada para acrescentar mais confiabilidade aos resultados analíticos contribuindo para aumentar a segurança dos resultados das análises realizadas por CLAE no INCQS e LFM, LO produtor de medicamentos que são distribuídos à população brasileira por meio do Ministério da Saúde.

Em função da importância do uso do Ofloxacino 400 mg no tratamento da tuberculose no Brasil e no mundo e por este pertencer à linha de fabricação do LFM, a metodologia de quantificação por meio de CLAE deste fármaco foi escolhida para determinação da incerteza de medição considerando que tem sido alvo da OMS assegurar que medicamentos de alta qualidade, atendendo a padrões de segurança e eficácia estejam disponíveis para a população vítima de tal enfermidade de forma a contribuir para o processo de controle e redução do número de casos da doença.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um instrumento metodológico para cálculo de incerteza de medição em resultados analíticos obtidos por metodologias que utilizem a CLAE.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a incerteza de medição no ensaio analítico de quantificação do teor em comprimidos revestidos de LFM - Ofloxacino 400 mg, que utiliza a CLAE em sua metodologia;
- b) Realizar análise das variáveis envolvidas no cálculo da incerteza de medição e suas respectivas contribuições para a incerteza padrão combinada;
- c) Demonstrar por meio da análise de sensibilidade das variáveis envolvidas, as vantagens da utilização da incerteza de medição como ferramenta para indicar quais as fontes de incerteza que apresentam impacto significativo no resultado obtido em um ensaio analítico, proporcionando benefícios pelo conhecimento amplo e profundo do processo;
- d) Estimar por meio de análise de sensibilidade o impacto do cálculo da incerteza de medição no resultado analítico do teor em comprimidos de LFM - Ofloxacino 400 mg, bem como tentar inferir sua possível relação com a eficácia do medicamento;
- e) Contribuir para afirmar a importância do conhecimento da incerteza de medição como um requisito que acrescenta qualidade aos resultados analíticos na quantificação de teor dos medicamentos.

## 4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Os equipamentos, reagentes e materiais utilizados neste projeto foram disponibilizados pelo LFM.

### 4.1 EQUIPAMENTOS

- a) Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Young Lin com detector ultravioleta - visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos YL 9160 PDA – Detector 294nm, compartimento de Coluna YL 9130, bomba quaternária YL 9101, injetor automático YL e degaseificador YL 9101;
- b) Aparelho de ultrassom, fabricante Nova Ética modelo Unique;
- c) Balança analítica com resolução de 0,001 mg, fabricante Marte, modelo AW220’;
- d) Medidor de pH fabricante WTH modelo pH720 ;
- e) Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Millipore modelo A-10

### 4.2 REAGENTES E MATERIAIS

#### 4.2.1 Amostra

LFM - Ofloxacino 400mg comprimido revestido Lote: 1111024

#### 4.2.2 Reagentes

- a) Água grau CLAE (0,22 µm) purificada por meio do sistema de purificação Milli-Q-

Millipore;

b) Acetonitrila grau CLAE - Vetec;

c) Ácido fosfórico (conc) - Merck;

d) Metanol grau UV/CLAE - Merck;

e) Ácido acético glacial - Merck;

#### 4.2.3. Padrões

Padrão de Referência USP Lote G11182 (Lote Corrente) – Ofloxacino – Teor:99,9%.

#### 4.2.4 Acessórios

a) Balões volumétricos de 10 mL e 100 mL calibrados;

b) Pipetas volumétricas de 2 mL calibradas;

c) Vidrarias de uso comum em laboratório;

d) Coluna de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18) de partícula 5 µm de tamanho e dimensões de 4,0 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento, fabricante Restek, Catalog Number 9174564, Serial Number 12090425R, Lote nº 120735P.

e) Membrana filtrante de acetato de celulose, porosidade de 0,45 µm;

f) Navetas;

g) Gral e pistilo de porcelana;

h) Termohigrômetro calibrado;

## 5 METODOLOGIA

A metodologia de pesquisa deste projeto foi estabelecida com base na 3ª edição do Guia Determinando a Incerteza na Medição Analítica da Eurachem/ Citac (ELLISON; 2012). Seu desenvolvimento foi realizado no laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico do Departamento da Qualidade do LFM.

### 5.1 ESPECIFICAÇÃO DO MENSURANDO

O Estudo foi iniciado pela especificação do mensurando. Para isso elaborou-se um fluxograma de maneira a esquematizar as etapas do ensaio analítico de quantificação do teor de ofloxacino em comprimidos de Ofloxacino 400 mg e definiu-se a fórmula matemática para cálculo do referido teor. A metodologia utilizada foi obtida da Farmacopeia Brasileira (FB) 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010).

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

A metodologia analítica de quantificação de teor em comprimidos de ofloxacino foi analisada minuciosamente com o intuito de identificar e avaliar os fatores relacionados à incerteza de medição para o ensaio, tais como a pureza do padrão analítico, as condições ambientais, as incertezas de massa, as calibrações de vidraria, instrumentos e equipamentos, a repetitividade de pesagem e avolumação.

Foram construídos diagramas de causa e efeito de forma a organizar e apresentar de modo estruturado e passo a passo, as contribuições de cada fator identificado à incerteza da medição.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DA INCERTEZA

Com base em cada fonte de incerteza identificada, foi verificado qual o tipo de incerteza que estava a ela relacionada, bem como qual o método mais adequado para proceder à sua determinação e cálculo. Foram identificadas as incertezas do tipo A e do tipo B, observando atentamente as contribuições que eram comuns a mais de uma fonte de incerteza para que não houvesse cálculo em duplicidade.

Foram então executadas as etapas para determinação das incertezas de medição tipo A e tipo B. Para execução das etapas de determinação das incertezas tipo A, todos os equipamentos, instrumentos e vidrarias utilizados estavam qualificados e/ ou calibrados e aprovados para uso. Durante toda a execução das análises foram utilizados reagentes com grau analítico compatível com CLAE e as condições ambientais foram monitoradas.

#### 5.3.1 Determinação das Incertezas tipo A

##### 5.3.1.1 Vidrarias volumétricas

As incertezas do tipo A foram determinadas para as vidrarias volumétricas por cálculo do desvio padrão após verificação repetidas vezes na balança analítica da massa correspondente ao volume resultante da avolumação de balões volumétricos de 10 mL e 100 mL e pipetas volumétricas de 2 mL.

De acordo com a metodologia analítica de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg foi necessário utilizar sete balões volumétricos de 100 mL, um balão volumétrico de 10 mL e 4 pipetas volumétricas de 2 mL.

Para a seleção dos balões volumétricos para uso foi adotado como critério a escolha daqueles que apresentavam massas semelhantes na mesma ordem de grandeza. Dos sete balões volumétricos de 100 mL selecionados, foi verificada a repetitividade de avolumação para 4 deles. Então utilizando-se luvas de procedimento, verificou-se a massa de cada balão seco em balança analítica e posteriormente adicionou-se água grau CLAE até completar o volume com auxílio de



pipeta conta-gotas, observando atentamente a linha imaginária que tangencia o ponto de contato do menisco formado pelo líquido e a linha de marcação de volume do balão. Após verificação da ausência de gotas na parte externa do frasco, verificou-se a massa correspondente ao volume de água por diferença entre a massa inicial e a massa final registrada, observando atentamente a centralização do balão no prato da balança e monitorando as condições ambientais. Este procedimento foi repetido por 20 vezes para cada balão volumétrico.

Para as pipetas volumétricas selecionadas para uso foi adotado o seguinte procedimento: utilizando-se luvas de procedimento, verificou-se em balança analítica a massa de cada volume de água grau CLAE adicionado à pipeta após esvaziamento da mesma em becher de 20 mL seco, cuja massa foi verificada anteriormente. A avolumação e o esvaziamento da pipeta volumétrica foram realizados com auxílio de um pipetador automático. Observou-se atentamente o ponto de contato tangenciando o menisco formado pelo líquido e a linha de marcação de volume na pipeta, e a ausência de gotas na ponta da pipeta no processo de avolumação. No processo de esvaziamento foi observada atentamente a ausência de gota na ponta da pipeta, assegurando-se o seu esvaziamento completo. Este procedimento foi repetido por 20 vezes para cada pipeta volumétrica.

Os valores obtidos para cada avolumação em massa correspondente em gramas foram convertidos em volume na unidade de mililitros, considerando a densidade da água de acordo com a temperatura ambiente registrada no termohigrômetro da sala de pesagem durante o procedimento. Foi calculado o desvio padrão para cada balão volumétrico e para cada pipeta volumétrica selecionada e o valor obtido foi dividido pela raiz quadrada do número de repetições realizadas.

Adotou-se como critério a escolha para cada tipo de vidraria volumétrica, entre o conjunto utilizado, do resultado de maior valor obtido da divisão do desvio padrão pela raiz quadrada do número de repetições realizadas como incerteza padrão tipo A.

### 5.3.1.2 *Balança analítica*

A incerteza do tipo A foi determinada para a balança analítica por repetitividade no processo de verificação da massa na balança analítica do peso padrão correspondente à massa de 10 mg.

Em balança analítica devidamente nivelada, limpa e estabilizada, utilizando-se luvas de procedimento e com o auxílio de uma pinça de aço inox, verificou-se a massa do peso padrão de 10mg, repetindo a operação por 20 vezes. Foi então calculado o desvio padrão dos valores obtidos e dividido pela raiz quadrada do número de repetições realizadas, e então registrado como incerteza tipo A.

### 5.3.1.3 *Injetor do CLAE*

As incertezas do tipo A foram determinadas para o injetor do CLAE por avaliação da repetitividade na obtenção de resultados durante a execução do ensaio analítico de quantificação em comprimidos de ofloxacino 400 mg. Na fase de injeção, programou-se uma série de 10 injeções para cada uma das três soluções amostrais preparadas independentemente a partir de um mesmo pool de comprimidos de ofloxacino 400 mg oriundo de uma amostra representativa do lote analisado e uma série de 10 injeções da solução de padrão de ofloxacino.

Para cada conjunto de resultados obtidos para as áreas dos cromatogramas da solução padrão e das soluções amostras foi calculado o desvio padrão e dividido pela raiz quadrada do número de repetições realizadas. O valor obtido foi considerado como a incerteza de medição tipo A oriunda do injetor do CLAE.

Para execução das etapas do ensaio analítico, as condições cromatográficas adotadas para a quantificação do ofloxacino foram conforme as estabelecidas na monografia do produto publicada na FB 5ª edição (BRASIL, 2010). Parâmetros como fase móvel, fluxo, coluna, volume de injeção foram seguidos conforme publicação.

O ensaio foi realizado conforme descrito a seguir:

a) Preparo das Soluções:

a.1) Ácido fosfórico diluído

Diluiu-se 6,9 mL de ácido fosfórico a 100 mL com água ultrapura e procedeu-se à homogeneização.

a.2) Solução tampão

Dissolveu-se 2,72 g de fosfato de potássio monobásico em 1000 mL de água ultrapura e ajustou-se com solução de ácido fosfórico diluído a pH  $3,3 \pm 0,1$ .

a.3) Solução fase móvel

Preparou-se 1 litro de uma solução com solução tampão e acetonitrila CLAE na proporção de 88 partes para 12, respectivamente. Levou-se ao ultrassom por 15 minutos e posteriormente filtrou-se a vácuo.

a.4) Solução diluente 1

Preparou-se 500mL de uma solução de metanol CLAE e ácido acético glacial na proporção de 75 partes para 25, respectivamente. Procedeu-se à homogeneização.

a.5) Solução diluente 2

Preparou-se 500mL de uma solução de água ultrapura e acetonitrila HPLC na proporção de 90 partes para 10, respectivamente. Procedeu-se à homogeneização.

a.6) Solução Padrão

Pesou-se aproximadamente 10 mg de ofloxacino padrão de referência e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se e diluiu-se ao volume com a solução diluente 1. Pipetou-se então 2,0 mL

volumetricamente para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a solução diluente 2. Procedeu-se à homogeneização.

#### a.7) Solução Amostra

Pesou-se 20 comprimidos de LFM-Ofloxacino 400 mg, que representassem comprimidos amostrados no início, meio e fim do processo de fabricação do lote de nº 1111024. Determinou-se o peso médio. Triturou-se, então, os comprimidos a pó fino com auxílio de gral e pistilo e pesou-se cerca da quarta parte do peso médio anteriormente determinado. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 70 mL da solução diluente 1 e levou-se ao ultrassom por 20 minutos. Completou-se o volume com a solução diluente 1 e homogeneizou-se. Filtrou-se uma porção da solução em filtro de porosidade 0,45 µm, desprezando-se os primeiros mililitros do filtrado. Transferiu-se então uma alíquota de 2,0 mL do filtrado, volumetricamente, para Balão Volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com a solução diluente 2. Procedeu-se à homogeneização. Esta solução foi denominada solução amostra 1.

Procedeu-se da mesma forma no preparo da solução amostra 2 e da solução amostra 3.

#### a.8) Solução do branco

Transferiu-se volumetricamente 1,0 mL da solução diluente 1 para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a solução diluente 2. Homogeneizou-se.

#### b) Procedimento

Equilibrou-se o sistema cromatográfico por 60 minutos com fluxo de 1,0 mL/minuto. Injetou-se 20 µL da solução do branco e procedeu-se à programação de 10 injeções de 20 µL da solução padrão e das soluções amostrais 1, 2 e 3.

As condições cromatográficas de análise são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3

Condições Cromatográficas de Análise.

Fase Móvel	88% Solução Tampão de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 12% ACN pH 3,3
Fluxo	1 mL/min
Coluna	C18 (150 mm x 4 mm) 5 µm
Volume de Injeção	20 µL
Comprimento de onda	294 nm
Equipamento	Cromatógrafo a líquido de alta eficiência com DAD marca Young Lin

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - fosfato de potássio monobásico

ACN- Acetonitrila

DAD- Detector por arranjos de diodos

#### 5.3.1.4 Homogeneidade da amostra

A incerteza oriunda da homogeneidade da amostra foi classificada como incerteza tipo A e foi determinada por meio da análise dos registros de dados contidos no dossiê de fabricação do lote 1111024 de LFM-Ofloxacino 400 mg.

No processo de verificação da uniformidade de conteúdo durante a fabricação do lote, são coletadas amostras de comprimidos do início, meio e final do processo e seus respectivos pesos médios são registrados. Utilizou-se esses dados para calcular o desvio padrão da variabilidade do peso dos comprimidos. O desvio padrão

foi dividido pela raiz quadrada do tamanho amostral (número de comprimidos cuja massa foi verificada) e o resultado foi considerado como a incerteza oriunda da homogeneidade da amostra.

#### 5.3.1.5 Influência da Variação da Temperatura Ambiente no volume das vidrarias

O efeito da variabilidade da temperatura registrada na sala de análise do laboratório de controle de qualidade ao longo de doze meses sobre o volume das vidrarias utilizadas e sua relação com o coeficiente de expansão volumétrica dos solventes utilizados foi calculado utilizando-se a equação 11. O resultado obtido foi então dividido pela raiz quadrada de 3, pois assumiu-se como premissa que a variação de temperatura apresenta um comportamento que é melhor representado por uma distribuição retangular.

$$u_{t(V)} = \delta_T \cdot \beta_{H_2O} \cdot V \quad (11)$$

onde:

$u_{t(V)}$  = Incerteza da temperatura relacionada ao volume da vidraria

$\delta_T$  = Diferença entre a maior temperatura e a menor temperatura registrada ao longo de uma série histórica

$\beta_{H_2O}$  = Coeficiente de expansão volumétrica da água

$V$  = Volume da vidraria

Para simplificar o cálculo consideramos apenas o coeficiente de expansão volumétrica da água, em função da mesma entrar em proporção considerável na preparação das soluções diluentes e da fase móvel utilizadas na metodologia de quantificação, deste coeficiente apresentar-se na ordem de  $10^{-4}$  e dos demais solventes apresentarem coeficiente de expansão volumétrica nesta mesma ordem.

Com o objetivo de avaliar a variabilidade da temperatura registrada na sala de análise do laboratório de controle de qualidade ao longo de doze meses construiu-se um histograma a partir da série histórica de registros arquivados.

#### *5.3.1.6 Contribuição do Operador para a Precisão da Metodologia*

Considerando que precisão é um termo geral utilizado para avaliação da variabilidade dos resultados analíticos entre ensaios independentes segundo procedimento padrão de validação de metodologias analíticas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007), a contribuição do analista para a incerteza de medição na realização do procedimento durante a execução do ensaio foi determinada por meio do cálculo da precisão intermediária para o método, a qual foi denominada precisão de operação. Este estudo foi realizado com um único analista e um único equipamento e avaliou-se a variabilidade dos resultados obtidos da execução da análise em dias diferentes.

Dessa forma um mesmo analista realizou três análises do mesmo pool de amostra a cada dia, no mesmo laboratório, e em cinco dias diferentes. Para cada solução amostra preparada e para cada solução padrão eram programadas 10 injeções pelo injetor do CLAE. A incerteza oriunda do analista foi então determinada por meio do cálculo do desvio padrão dos resultados do teor obtidos das análises realizadas no mesmo equipamento de CLAE, pelo mesmo analista em dias diferentes. O desvio padrão foi dividido pela raiz quadrada do tamanho amostral, representado pelo número de análises realizadas e o resultado foi considerado como a incerteza oriunda do analista para a precisão do ensaio.

### 5.3.2. Determinação das Incertezas tipo B

#### 5.3.2.1 Vidrarias volumétricas

As incertezas do tipo B foram determinadas para as vidrarias volumétricas por análise de dados registrados nos certificados de calibração. Para cálculo da incerteza combinada, aplicou-se a equação 10, utilizando-se os valores da incerteza expandida e do fator de abrangência apresentados. Adotamos como procedimento a escolha da maior incerteza dentre o mesmo grupo de vidrarias selecionadas para uso, respectivamente para balões volumétricos de 10 mL e 100 mL e pipetas volumétricas de 2 mL.

#### 5.3.2.2 Conjunto de Peso Padrão e Balança Analítica

As incertezas do tipo B foram determinadas para o conjunto de pesos padrão e para a balança analítica por análise de dados registrados nos respectivos certificados de calibração. Para cálculo da incerteza combinada aplicou-se a equação 10, utilizando-se os valores da incerteza expandida e do fator de abrangência apresentados para a massa de 0,01000g.

#### 5.3.2.3 Termohigrômetro

A incerteza do tipo B oriunda do termohigrômetro foi determinada por análise dos dados registrados nos certificados de calibração. Para cálculo da incerteza combinada, aplicou-se a equação 10, utilizando-se o valor da incerteza expandida e do fator de abrangência apresentados para a temperatura de 25°C, tendo em vista que a análise da série histórica dos registros de temperatura ao longo de doze meses apresentou esse valor como o registro de temperatura de maior frequência.



#### 5.3.2.4 Padrão de Referência

A incerteza do tipo B foi determinada para o padrão de referência por verificação de dados obtidos do laudo analítico fornecido pelo fabricante. Para efeito de cálculo da incerteza, adotamos como critério a escolha da distribuição uniforme e utilizou-se a equação 1 para cálculo da incerteza tipo B.

### 5.4. CÁLCULOS E DETERMINAÇÕES

Para todos os cálculos executados foram elaboradas planilhas utilizando como ferramenta o Microsoft Excel® versão 2003.

#### 5.4.1 Cálculo da Incerteza Combinada

De acordo com o diagrama de causa e efeito construído, foi elaborada uma planilha para determinar de forma quantitativa ou estimada, a contribuição de cada uma das fontes de incerteza relacionadas à medição. Foram relacionadas por meio de expressões matemáticas, as variáveis que interferem direta ou indiretamente no valor da incerteza de medição do resultado analítico da metodologia de quantificação do teor de ofloxacino em comprimidos de Ofloxacino 400 mg. Dessa forma calculou-se a incerteza padrão para cada fonte de incerteza e em seguida foi determinada a incerteza padrão combinada para o resultado analítico.

#### 5.4.2 Cálculo do Número de Graus de Liberdade Efetivo, do Fator de Abrangência e da Incerteza Expandida

Foi elaborada uma planilha de forma a proceder à propagação das fontes de incerteza do tipo A de acordo com o número de graus de liberdade de cada fonte. A

planilha foi estruturada possibilitando a determinação do número de graus de liberdade para o resultado analítico.

Após calcular o número de graus de liberdade para o resultado analítico e utilizando como ferramenta adicional a Distribuição de Student, disponível no anexo A, foi determinado o fator de abrangência, segundo um grau de confiança estabelecido para o ensaio analítico de 95%. Procedeu-se então à determinação da incerteza expandida, através da aplicação da equação nº 10, onde multiplicou-se o fator de abrangência calculado pela incerteza padrão combinada determinada.

#### 5.4.3 Análise de Sensibilidade

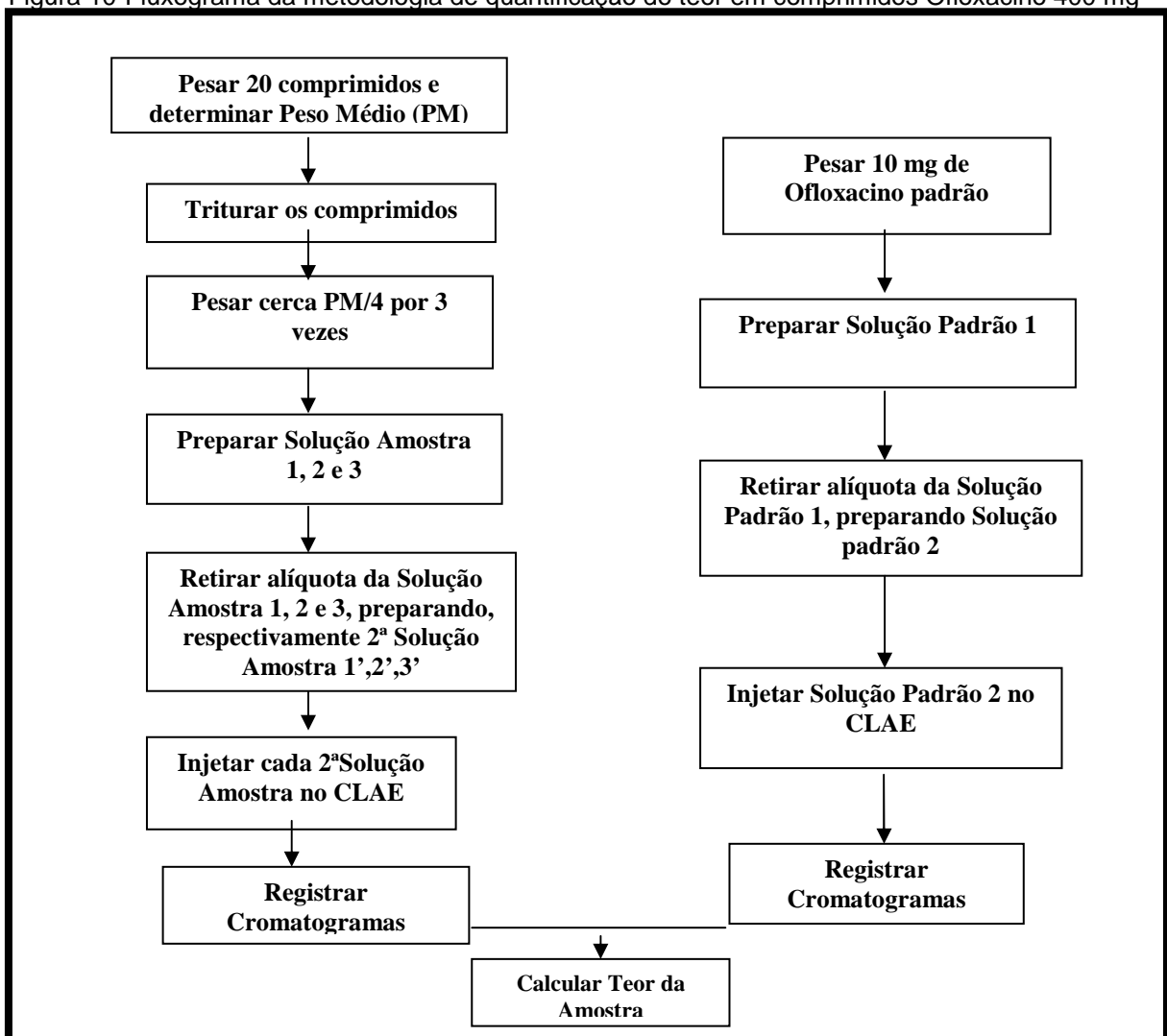
Utilizando ainda como ferramenta o Microsoft Excel® versão 2003, foi construído um gráfico de colunas com base nos resultados obtidos para incerteza padrão de cada fonte principal de incerteza. De acordo com o gráfico obtido foi realizada a análise de sensibilidade das grandezas de entrada envolvidas no cálculo de incerteza padrão combinada do resultado analítico.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 RESULTADOS DA ESPECIFICAÇÃO DO MENSURANDO

Após identificadas as etapas do ensaio analítico de quantificação do teor de ofloxacino nos comprimidos revestidos de LFM - Ofloxacino 400 mg por meio da análise da metodologia farmacopeica utilizada e da ficha técnica de análise nº PT050/04 do LFM (Brasil, 2010; LFM, 2010), o fluxograma, apresentado na figura 10, foi elaborado, tornando possível visualizar de maneira mais clara cada passo envolvido na obtenção do mensurando.

Figura 10-Fluxograma da metodologia de quantificação do teor em comprimidos Ofloxacino 400 mg



Fonte: Do autor, 2013.

De acordo com a fórmula de cálculo de teor obtida da metodologia farmacopeica de quantificação do teor de Ofloxacino em comprimidos de Ofloxacino-LFM 400 mg, conforme figura 11 foi possível visualizar a relação matemática entre o mensurando, que é o teor de ofloxacino e os parâmetros aos quais ele está relacionado.

Figura 11 - Fórmula para cálculo da metodologia de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg

**Teor em mg/comprimido =  $\frac{RA \times pp \times PM \times FD \times TP}{RP \times pa \times 10}$**

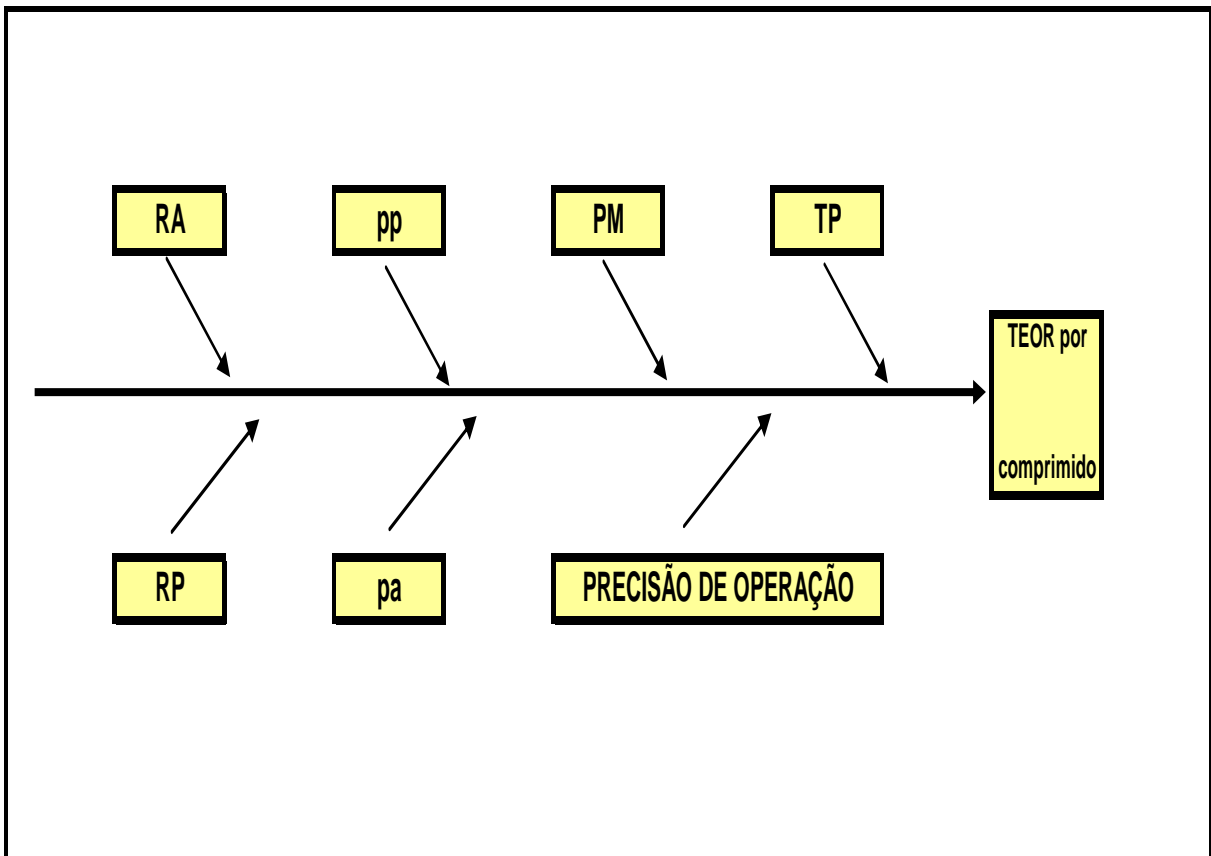
**Onde:**  
**RA = Média das áreas da Solução Amostra**  
**pp = peso do padrão em mg**  
**PM = peso médio, em mg**  
**FD = fator de diluição**  
**TP = teor % do padrão**  
**RP = Média das áreas da Solução Padrão**  
**pa = peso da amostra, em mg**

Fonte: Do autor, 2013.

## 6.2. CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE CAUSA E EFEITO

Após analisar a metodologia analítica de quantificação de teor em comprimidos de ofloxacino com base no fluxograma montado, figura 10, e em cada componente da fórmula de cálculo do teor, figura 11, as fontes de incerteza identificadas como principais foram descritas abaixo e indicadas em um diagrama de causa e efeito denominado principal, conforme figura 12.

Figura 12 - Diagrama de Causa e Efeito Principal: identificação das principais fontes de incerteza de medição para a metodologia de quantificação do teor em comprimidos de Ofloxacino 400 mg



Fonte: Do autor, 2013.

Onde:

RA = Média das áreas da Solução Amostra

RP = Média das áreas da Solução Padrão

pa = peso da amostra, em mg

TP = teor % do padrão

pp = peso do padrão em mg

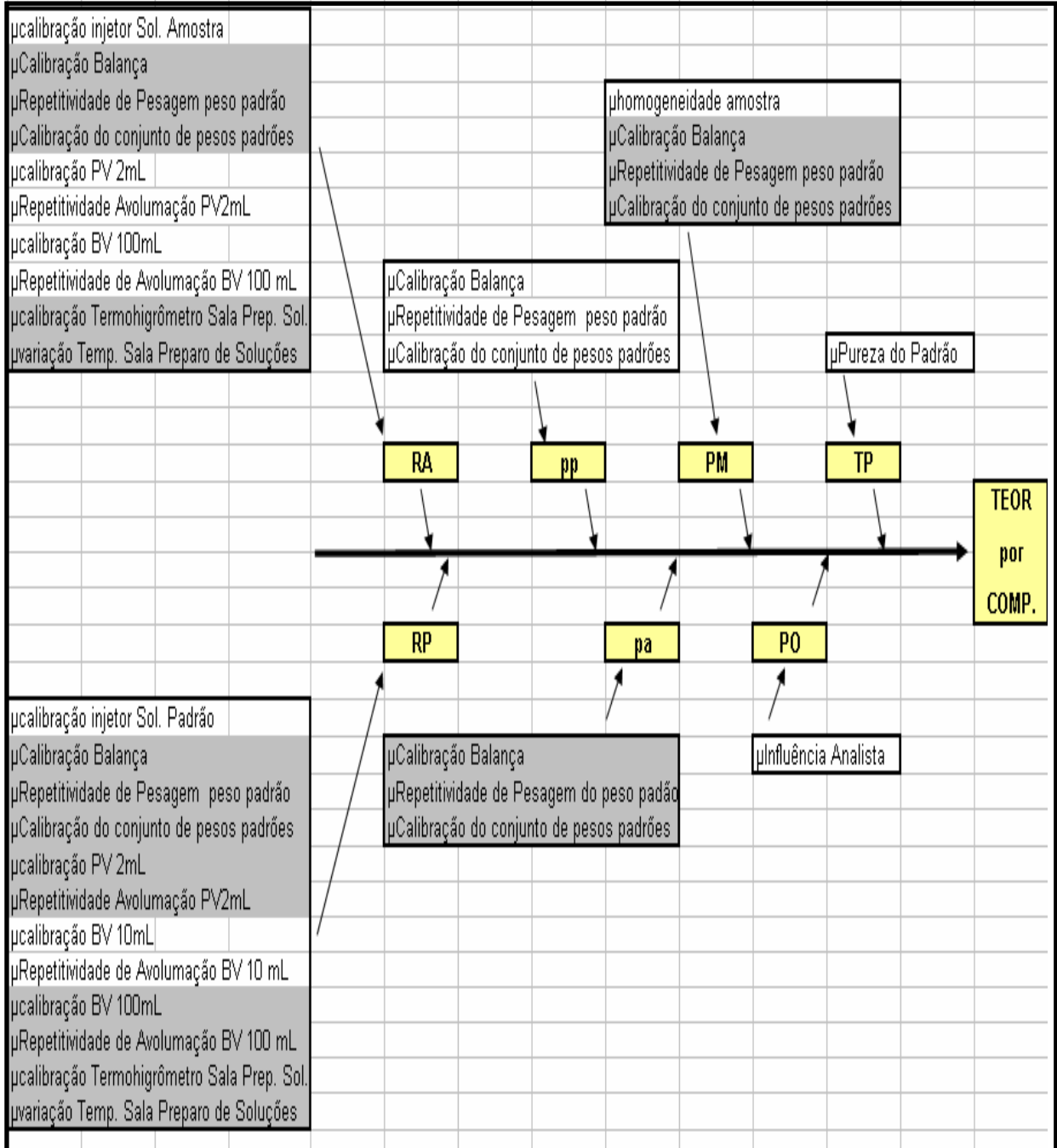
PM = peso médio, em mg

Após ter sido realizada uma análise individual para cada fonte de incerteza principal, foram relacionados, respectivamente, os possíveis fatores que contribuem para a IM de cada uma delas e foi então construído o diagrama de causa e efeito detalhado, conforme figura 13.

O detector não foi apontado como fonte para a incerteza de medição, pois considerou-se a oscilação de sensibilidade proveniente do mesmo como insignificante quando comparada com a oscilação do volume injetado pelo injetor, a qual foi considerada no processo.

A incerteza decorrente da variação de pH em função da calibração do pHmetro também foi descartada, pois considerou-se que tal contribuição caso viesse a ocorrer não teria impacto sobre a precisão do método.

Figura 13 - Diagrama de Causa e Efeito Detalhado: identificação detalhada das fontes de incerteza de medição para a metodologia de quantificação do teor em comprimidos Ofloxacino 400 mg



Fonte: Do autor, 2013.

Onde:

■ - contribuição para incerteza de medição identificada, mas desconsiderada

RA = Média das áreas da Solução Amostra

TP = teor % do padrão

PM = peso médio, em mg

RP = Média das áreas da Solução Padrão

pp = peso do padrão em mg

pa = peso da amostra, em mg

O diagrama de causa e efeito apresentado na figura 13 mostra claramente que as ramificações que indicam as fontes que contribuem para a incerteza principal, incluem tanto os resultados das medições intermediárias como os efeitos ambientais. Assim essas ramificações visam alcançar todos os fatores que possam vir a afetar o resultado, contribuindo para sua incerteza.

### 6.3 RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DA INCERTEZA

Por meio do diagrama de causa e efeito construído, cada fonte de incerteza principal foi analisada e mediante a identificação dos principais fatores de contribuição para cada uma delas respectivamente, foi elaborada a tabela 4. Esta tabela apresenta claramente o tipo de contribuição para cada fonte principal de incerteza de medição e possibilitou a identificação das contribuições que são comuns a mais de uma fonte de incerteza, de forma a considerá-las para efeito de cálculo da incerteza combinada apenas uma vez, evitando contribuições repetidas.

Tabela 4

Descrição dos fatores de incerteza relacionados às fontes de incerteza principais	Fonte de Incerteza Principal						
	RA	pp	PM	TP	RP	pa	PO
Calibração injetor em relação à Solução Amostra	x						
Calibração injetor em relação à Solução Padrão					x		
Calibração Balança		x	x			x	
Repetitividade de Pesagem do peso padrão		x	x			x	
Calibração do conjunto de peso padrão		x	x			x	
Calibração PV 2mL	x				x		
Repetitividade Avolumação PV2mL	x				x		
Calibração BV 10mL					x		
Repetitividade de Avolumação BV 10 mL					x		
Calibração BV 100mL	x				x		
Repetitividade de Avolumação BV 100 mL	x				x		
Calibração Termohigrômetro Sala Análise	x				x		
Variação Temperatura Sala Análise	x				x		
Homogeneidade amostra			x				
Pureza do Padrão				x			
Influência do Analista							x

Fonte: Do autor, 2013.

Onde: x = contribuição para incerteza de medição identificada e considerada

x = contribuição para incerteza de medição identificada, mas desconsiderada (para evitar repetições)

RA = Média das áreas da Solução Amostra

pp = peso do padrão em mg

PM = peso médio, em mg

TP = teor % do padrão, tal e qual

RP = Média das áreas da Solução Padrão

pa = peso da amostra, em mg

PO = Precisão do Operador

Para proceder à determinação das incertezas foi então elaborada a tabela 5, de maneira a identificar o tipo de incerteza, A ou B que deverá ser determinado para cada fator de incerteza previamente identificado.

Tabela 5

Identificação do Tipo de Incerteza

<b>Descrição da fonte de incerteza</b>	<b>Incerteza Relacionada</b>	
	<b>Tipo A</b>	<b>Tipo B</b>
Calibração injetor em relação à Solução Amostra	<b>x</b>	
Calibração injetor em relação à Solução Padrão	<b>x</b>	
Calibração Balança		<b>x</b>
Repetitividade de Pesagem do peso padrão	<b>x</b>	
Calibração do conjunto de peso padrão		<b>x</b>
Calibração PV 2mL		<b>x</b>
Repetitividade Avolumação PV2mL	<b>x</b>	
Calibração BV 10mL		<b>x</b>
Repetitividade de Avolumação BV 10 mL	<b>x</b>	
Calibração BV 100mL		<b>x</b>
Repetitividade de Avolumação BV 100 mL	<b>x</b>	
Calibração Termohigrômetro Sala Análise		<b>x</b>
Variação Temperatura Sala Análise	<b>x</b>	
Homogeneidade amostra	<b>x</b>	
Pureza do Padrão		<b>x</b>
Repetitividade de Operação	<b>x</b>	
Influência do Analista	<b>x</b>	

Fonte: Do autor, 2013.

Após executadas as etapas para determinação das incertezas de medição tipo A e tipo B foram elaboradas as seguintes tabelas de forma a organizar os resultados.



### 6.3.1 Determinação das Incertezas tipo A

#### 6.3.1.1 Vidrarias Volumétricas

Os resultados obtidos da determinação da repetitividade para o balão volumétrico de 10 mL são apresentados a seguir na tabela 6.

Tabela 6

Determinação da Incerteza tipo A do Balão Volumétrico 10 mL		
	REF.602	
	Massa (g)	Volume (mL)
1	10,0536	10,1125
2	9,9844	9,9551
3	9,9660	9,9368
4	9,9898	9,9605
5	10,0323	10,0029
6	10,0316	10,0022
7	9,9473	9,9182
8	9,9766	9,9474
9	9,9779	9,9487
10	10,0146	9,9853
11	9,9910	9,9617
12	9,9521	9,9229
13	9,9644	9,9352
14	9,9883	9,9590
15	9,9539	9,9247
16	9,9463	9,9172
17	9,9634	9,9342
18	9,9715	9,9423
19	10,0124	9,9831
20	9,9799	9,9507
Média	9,9849	9,9600
DP	0,0295	0,0440
DP/ $\sqrt{20}$	0,009317	0,013916
veff	19	19

Fonte: Do autor, 2013.

veff = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

Densidade da água a 25°C = 0,99707(MERCK & CO, 2006)

d = m/v

Os resultados obtidos da determinação da repetitividade para o balão volumétrico de 100 mL são apresentados a seguir na tabela 7.

Tabela 7

Determinação da Incerteza tipo A do Balão Volumétrico 100 mL								
nº	REF. 625		REF. 639		REF. 645		REF. 647	
	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)
1	99,4552	99,7475	99,5574	99,8500	99,4552	99,7475	99,5574	99,8500
2	99,4973	99,7897	99,5508	99,8433	99,4973	99,7897	99,5508	99,8433
3	99,5697	99,8623	99,5460	99,8385	99,5697	99,8623	99,5460	99,8385
4	99,4283	99,7205	99,5383	99,8308	99,4283	99,7205	99,5383	99,8308
5	99,5625	99,8551	99,5015	99,7939	99,5625	99,8551	99,5015	99,7939
6	99,5319	99,8244	99,6311	99,9239	99,5319	99,8244	99,6311	99,9239
7	99,5423	99,8348	99,5849	99,8775	99,5423	99,8348	99,5849	99,8775
8	99,4471	99,7393	99,5904	99,8831	99,4471	99,7393	99,5904	99,8831
9	99,4255	99,7177	99,5840	99,8766	99,4255	99,7177	99,5840	99,8766
10	99,4555	99,7478	99,5294	99,8219	99,4555	99,7478	99,5294	99,8219
11	99,5387	99,8312	99,6461	99,9389	99,5387	99,8312	99,6461	99,9389
12	99,5784	99,8710	99,5862	99,8788	99,5784	99,8710	99,5862	99,8788
13	99,5100	99,8024	99,5660	99,8586	99,5100	99,8024	99,5660	99,8586
14	99,4491	99,7413	99,5395	99,8320	99,4491	99,7413	99,5395	99,8320
15	99,5377	99,8302	99,5457	99,8382	99,5377	99,8302	99,5457	99,8382
16	99,4914	99,7838	99,5551	99,8477	99,4914	99,7838	99,5551	99,8477
17	99,5619	99,8545	99,5584	99,8510	99,5619	99,8545	99,5584	99,8510
18	99,5017	99,7941	99,6624	99,9553	99,5017	99,7941	99,6624	99,9553
19	99,5366	99,8291	99,6001	99,8928	99,5366	99,8291	99,6001	99,8928
20	99,5669	99,8595	99,5373	99,8298	99,5669	99,8595	99,5373	99,8298
Média	99,5094	99,8018	99,5705	99,8631	99,5094	99,8018	99,5705	99,8631
DP	0,0507	<b>0,0508</b>	0,0407	0,0408	0,0507	0,0508	0,0407	0,0408
DP/√20		<b>0,011362</b>		0,009127		0,011362		0,009127
V <sub>eff</sub>		19		19		19		19

Fonte: Do autor, 2013.

v<sub>eff</sub> = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

Densidade da água a 25°C = 0,99707(MERCK & CO, 2006)

d = m/v

Os resultados obtidos da determinação da repetitividade para pipeta volumétrica de 2 mL são apresentados a seguir na tabela 8.

Tabela 8

Determinação da Incerteza tipo A da Pipeta Volumétrica 2 mL								
	REF. P98		REF. P96		REF. 51868		REF. 51878	
nº	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)	Massa (g)	Volume (mL)
1	1,9896	1,9954	1,9816	1,9874	1,9950	2,0009	2,0012	2,0071
2	1,9868	1,9926	1,9835	1,9893	1,9961	2,0020	1,9940	1,9999
3	1,9914	1,9973	1,9867	1,9925	1,9925	1,9984	1,9963	2,0022
4	1,9934	1,9993	1,9818	1,9876	1,9834	1,9892	1,9943	2,0002
5	1,9875	1,9933	1,9884	1,9942	1,9939	1,9998	1,9918	1,9977
6	1,9835	1,9893	1,9922	1,9981	1,9921	1,9980	1,9963	2,0022
7	1,9844	1,9902	1,9789	1,9847	1,9944	2,0003	1,9979	2,0038
8	2,0068	2,0127	1,9796	1,9854	1,9910	1,9969	1,9941	2,0000
9	2,0057	2,0116	1,9688	1,9746	1,9919	1,9978	1,9899	1,9957
10	1,9959	2,0018	1,9788	1,9846	1,9875	1,9933	1,9998	2,0057
11	1,9887	1,9945	2,0050	2,0109	1,9959	2,0018	1,9983	2,0042
12	1,9901	1,9959	1,9712	1,9770	1,9916	1,9975	1,9975	2,0034
13	1,9912	1,9971	1,9822	1,9880	1,9922	1,9981	1,9989	2,0048
14	1,9843	1,9901	1,9822	1,9880	1,9875	1,9933	1,9923	1,9982
15	1,9828	1,9886	1,9812	1,9870	1,9843	1,9901	2,0002	2,0061
16	1,9833	1,9891	1,9459	1,9516	1,9909	1,9968	1,9915	1,9974
17	1,9916	1,9975	1,9945	2,0004	1,9953	2,0012	1,9971	2,0030
18	1,9815	1,9873	1,9851	1,9909	1,9959	2,0018	1,9922	1,9981
19	1,9853	1,9911	1,9955	2,0014	1,9918	1,9977	1,9961	2,0020
20	1,9908	1,9967	1,9923	1,9982	1,9869	1,9927	1,9928	1,9987
Média	1,9897	1,9956	1,9828	1,9886	1,9915	1,9974	1,9956	2,0015
D P	0,0069	0,0069	0,0121	0,0121	0,0038	0,0038	0,0033	0,0033
<b>DP/√20</b>		0,001540		<b>0,002704</b>		0,000852		0,000730
veff		19		19		19		19

Fonte: Do autor, 2013.

veff = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

Densidade da água a 25°C = 0,99707(MERCK & CO, 2006)

d = m/v

### 6.3.1.2 Balança Analítica

O valor de massa para determinação da incerteza de medição da balança analítica foi escolhido em função do menor valor de massa correspondente utilizado durante a execução da metodologia analítica de quantificação em comprimidos de ofloxacino 400 mg, pois ao escolher a menor massa aumentou-se a variabilidade relativa.

Os resultados obtidos da determinação da repetitividade para a balança analítica são apresentados a seguir na tabela 9.

Tabela 9

Determinação da Incerteza tipo A oriunda da Balança Analítica							
	10 mg	20 mg	100 mg	2 g	10 g	20 g	50 g
1	10,0	20,0	100,0	1,9999	10,0001	20,0000	49,9998
2	10,0	20,0	100,1	2,0000	10,0002	20,0000	49,9999
3	10,0	20,0	100,0	2,0001	10,0002	20,0001	49,9998
4	10,0	20,0	100,0	2,0001	9,9999	20,0002	50,0000
5	10,0	20,0	99,9	2,0000	10,0001	20,0002	50,0000
6	10,0	20,0	100,1	2,0000	10,0000	20,0001	50,0000
7	10,1	20,0	100,0	1,9999	10,0001	20,0002	49,9999
8	10,0	20,0	100,2	1,9999	10,0000	20,0000	49,9999
9	10,0	20,1	100,0	2,0000	9,9999	20,0000	49,9999
10	10,0	20,0	100,0	2,0000	10,0000	20,0001	49,9980
11	10,0	20,1	100,1	2,0000	10,0000	20,0002	49,9998
12	10,0	20,0	100,1	1,9990	10,0000	20,0000	49,9999
13	10,1	20,0	100,0	1,9990	10,0000	20,0000	50,0000
14	10,0	20,0	99,9	1,9999	10,0000	20,0001	50,0000
15	10,0	20,0	100,0	2,0000	10,0000	20,0002	50,0000
16	10,0	20,0	100,0	2,0000	9,9999	20,0000	49,9999
17	10,0	20,0	100,0	2,0000	10,0000	20,0000	49,9990
18	10,0	20,0	99,9	1,9990	10,0000	20,0001	49,9998
19	10,0	20,0	100,0	1,9990	9,9999	20,0002	50,0000
20	10,0	20,0	100,0	2,0000	10,0001	20,0001	50,0000
Média	10,0	20,0	100,0	1,9998	10,0000	20,0001	49,9998
<b>DP</b>	<b>0,030800</b>	0,0308	0,0745	0,0004	0,0001	0,0001	0,0005
<b>DP/<math>\sqrt{20}</math></b>	<b>0,009733</b>						
veff	19						

Fonte: Do autor, 2013.

veff = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

### 6.3.1.3 Injetor do CLAE

Os resultados obtidos da determinação da repetitividade para o injetor do CLAE são apresentados a seguir na tabela 10. Essa tabela apresenta os resultados obtidos da injeção da solução padrão e das soluções amostrais 1,2,3.

Tabela 10

Determinação da Incerteza tipo A do Injetor do CLAE				
	Área do Cromatograma			
	PADRÃO	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1	1413,855	1458,532	1615,544	1324,910
2	1411,752	1451,275	1608,016	1317,918
3	1410,104	1457,828	1618,346	1323,042
4	1416,696	1466,180	1620,288	1332,407
5	1407,217	1469,999	1625,971	1335,212
6	1409,202	1468,895	1616,823	1335,174
7	1400,541	1489,346	1616,465	1329,744
8	1405,031	1471,671	1625,904	1337,598
9	1400,708	1474,187	1618,832	1332,617
10	1400,229	1479,901	1618,694	1355,632
Média	1407,534	1468,781	1618,488	1332,425
Média Áreas				1473,232
DP	5,834	11,175	5,160	10,235
DPR	0,414	0,760	0,319	0,768
Teor	99,9	101,739	101,481	100,099
Teor Médio				101,106
DP/ $\sqrt{10}$	1,844815	3,533778	1,631659	3,2366702
Média DP/ $\sqrt{10}$	-----			2,800702193
veff	9			29

Fonte: Do autor, 2013.

pp = 10,1 g

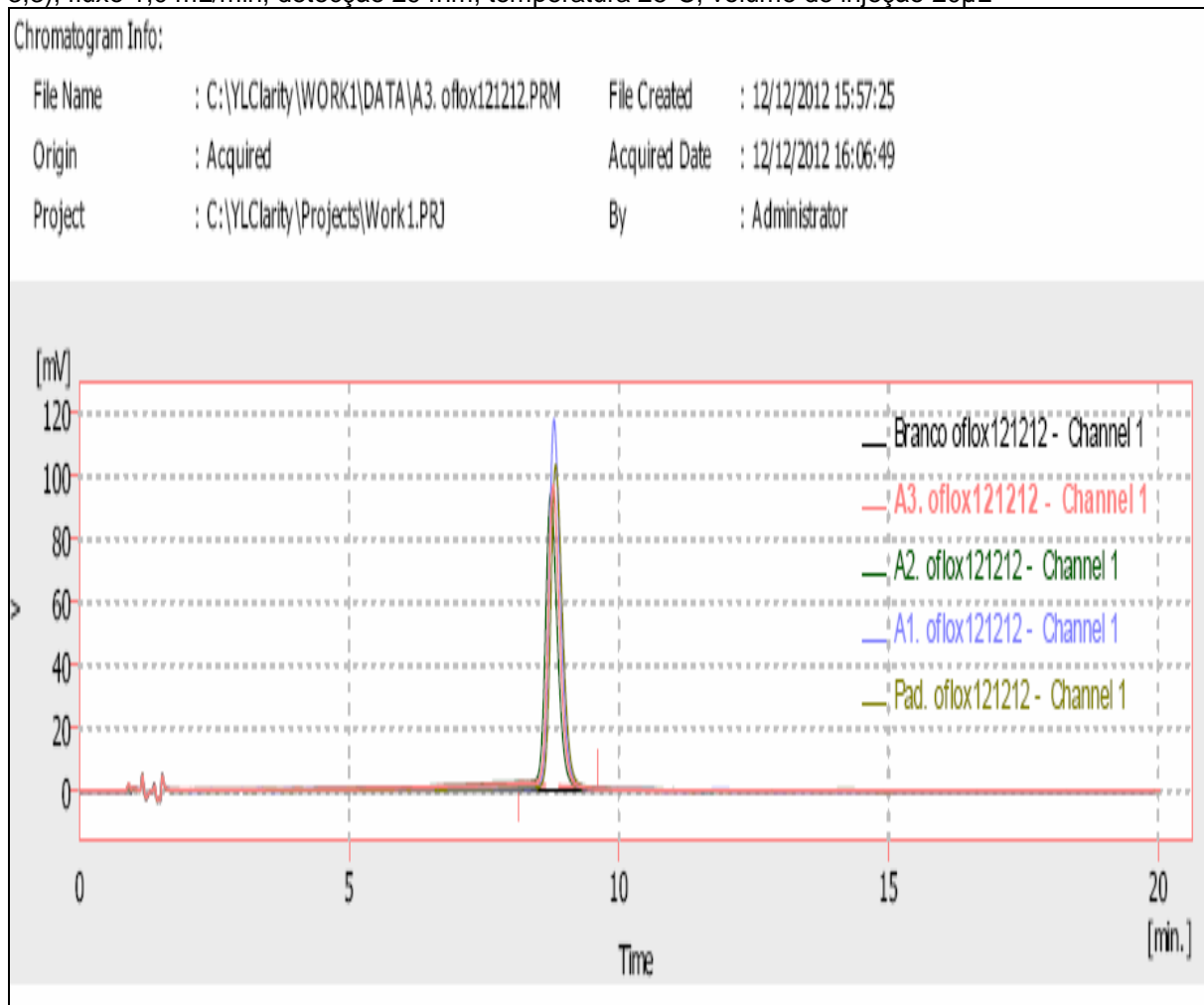
veff = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

DPR= Desvio Padrão Relativo = (DP/Média) x 100

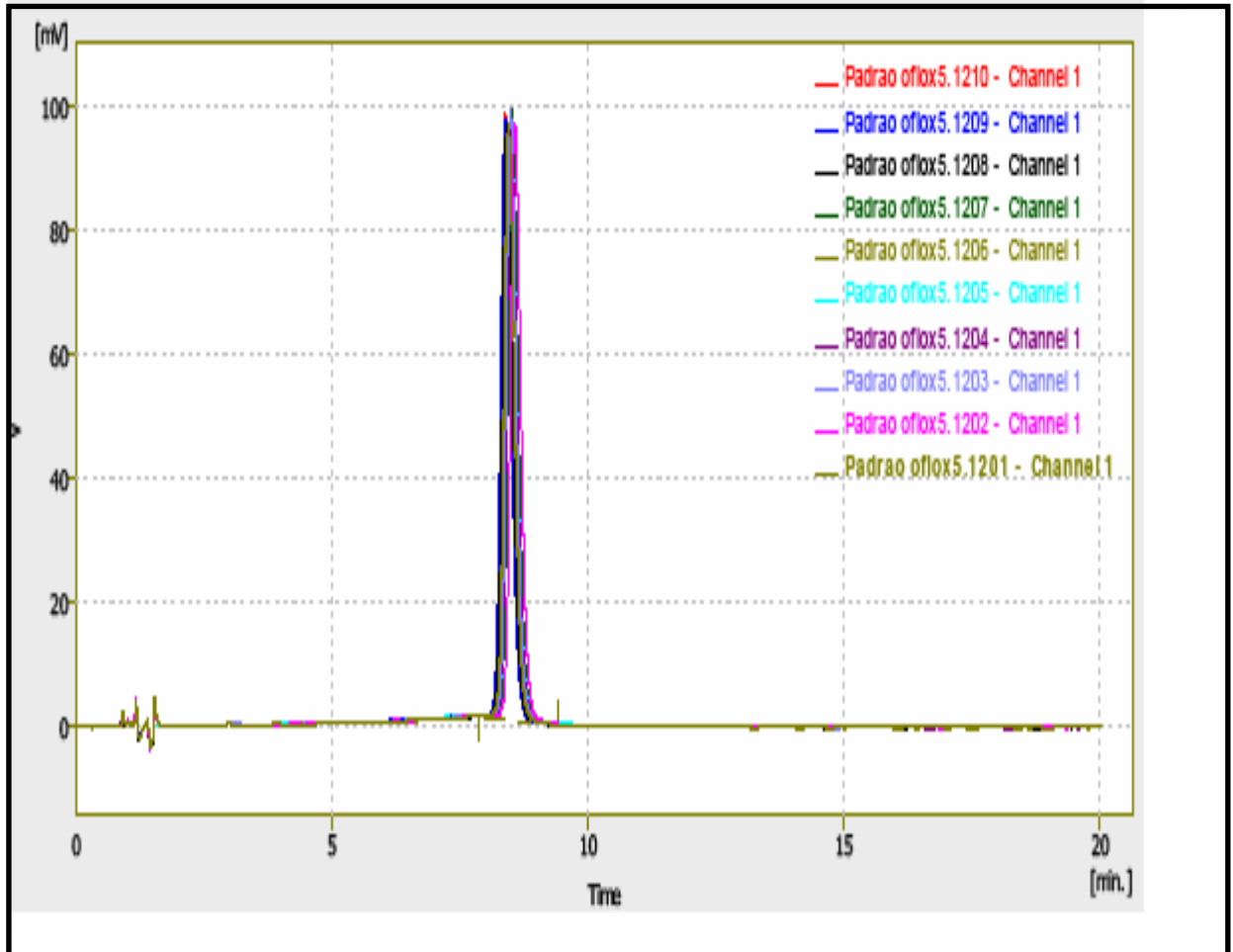
A figura 14 mostra os sinais analíticos sobrepostos obtidos a partir da análise por CLAE de três soluções amostrais de um mesmo lote de comprimidos de Ofloxacino 400 mg e de solução de Ofloxacino padrão na determinação da incerteza tipo A do injetor do cromatógrafo Young Lin. Observam-se sinais analíticos bem definidos com tempo de retenção de aproximadamente 8,5 minutos.

Figura 14 - Sinais Analíticos do Ofloxacino (padrão) e do LFM-Ofloxacino 400mg (amostra) obtidos com sistema cromatográfico CLAE, (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5µm, 180 x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20µL



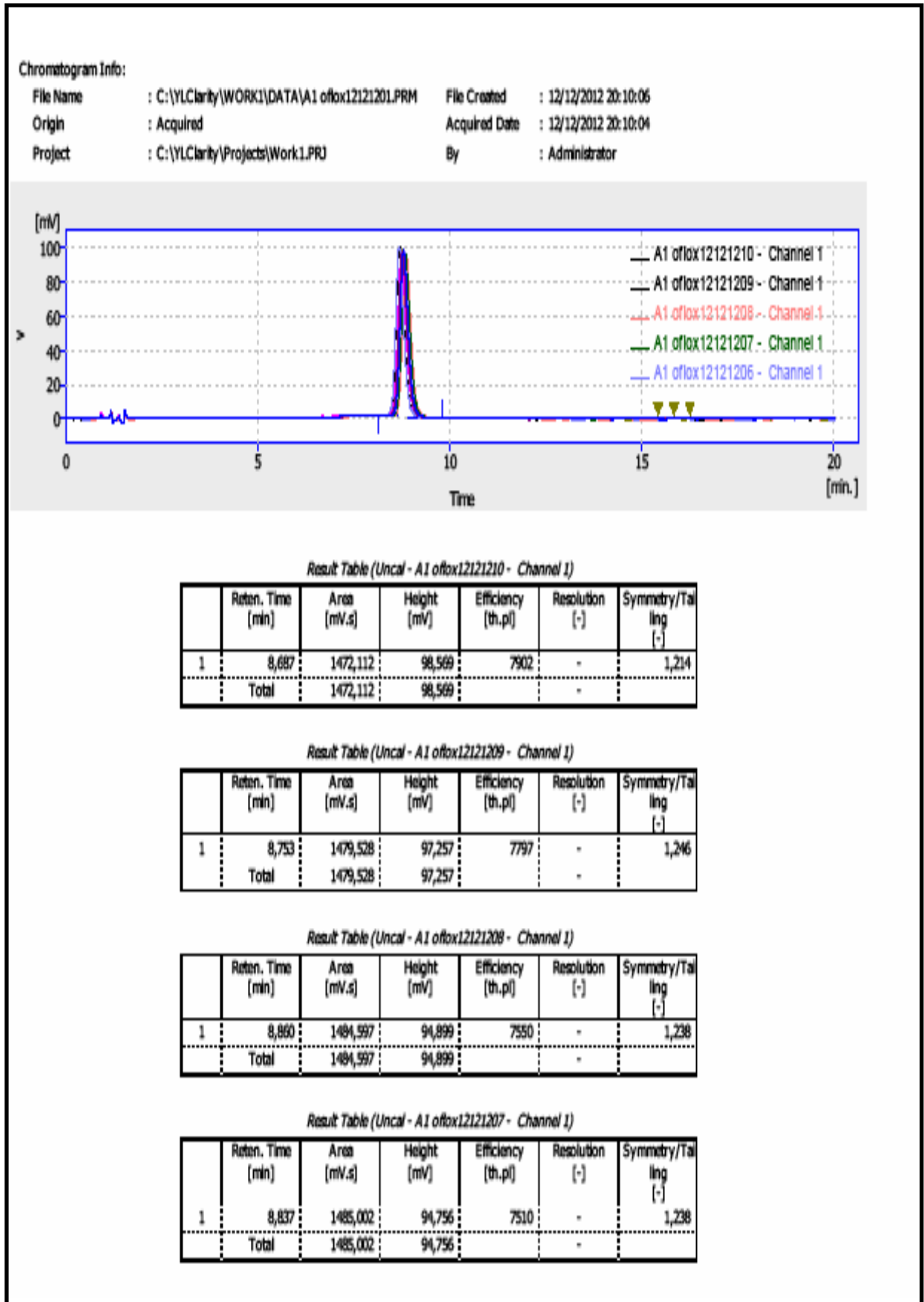
A figura 15 mostra os sinais analíticos sobrepostos a partir da programação da análise de 10 injeções de solução de Ofloxacino padrão no CLAE.

Figura 15 - Sinais Analíticos do Ofloxacino (padrão) obtidos com sistema cromatográfico CLAE, (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5 $\mu$ m, 180 x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20 $\mu$ L



A figura 16 mostra os sinais analíticos sobrepostos a partir da programação da análise de 10 injeções de uma mesma solução amostra. Em ambas observam-se os sinais analíticos bem definidos e a pequena variabilidade nas áreas dos cromatogramas sobrepostos.

Figura 16 - Sinais Analíticos obtidos de 10 injeções de LFM-Ofloxacino 400mg (amostra) obtidos com sistema cromatográfico CLAE, (8,5 min, 0,02mg/mL). Condições de análise: coluna Restek C18 (5µm, 180 x 4,0 mm d.i.) fase móvel mistura de 88% solução tampão de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 12% ACN (pH 3,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 294nm, temperatura 25°C, volume de injeção 20µL





### 6.3.1.4 Homogeneidade da Amostra

A tabela 11 apresenta os valores de peso médio registrados no dossiê de fabricação do lote 1111024 de LFM-Ofloxacino 400 mg.

Tabela 11

Determinação da Incerteza Tipo A da Homogeneidade da Amostra

Etapa do Processo	Massa(g)				
Início	672,1	680,9	673,8	671,6	636,4
	651,9	684,8	657,4	668,5	652,7
	625,2	680,6	655,8	646,7	649,5
	633,9	652,5	620,1	659,2	653,8
Meio	649,1	636,1	641,2	652,8	661,0
	651,4	650,0	669,1	639,9	639,9
	672,1	665,1	665,4	672,1	647,2
	636,7	663,4	631,5	635,4	634,3
Fim	644,6	644,4	653,4	656,8	649,8
	664,2	670,5	654,6	661,7	660,4
	665,8	661,3	665,9	666,3	660,2
	728,8	659,0	662,1	639,2	638,9
Média	655,82				
DP	17,16				
DP/ $\sqrt{60}$	2,214943				
veff	59				

Fonte: Do autor, 2013.

veff = grau de liberdade efetivo

DP= Desvio Padrão

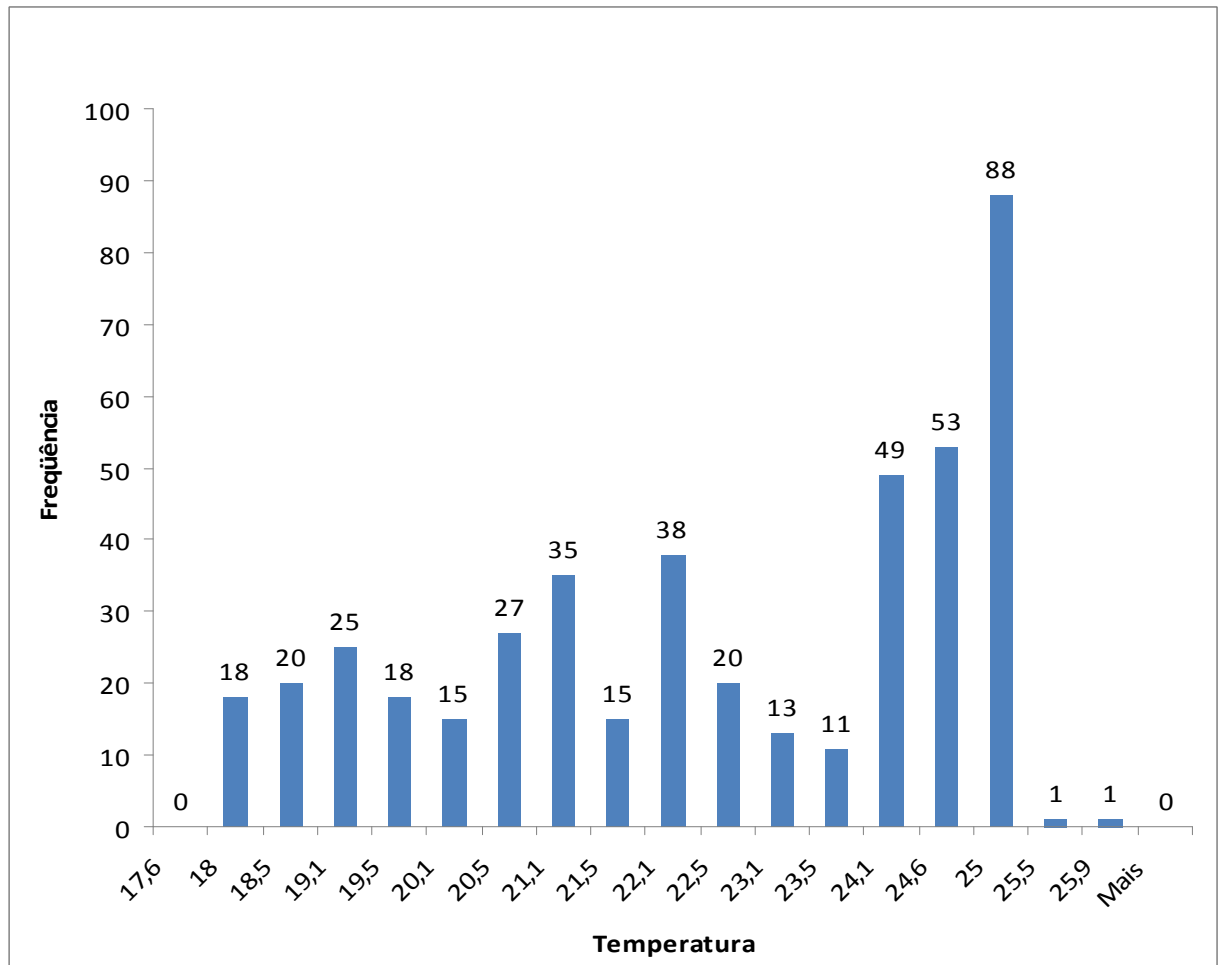
### 6.3.1.5 Vidrarias Volumétricas em função da Variação da Temperatura Ambiente

As vidrarias volumétricas utilizadas foram calibradas a uma temperatura de 20°C conforme indicado nos respectivos certificados de calibração, porém a temperatura da sala de análise varia de acordo com as características do ambiente, a qual foi registrada na série histórica dos registros de temperatura ao longo de doze meses, demonstrada através do histograma apresentado na figura 17.

O histograma é um tipo de gráfico utilizado como recurso para permitir a visualização da forma de distribuição da variável que está sendo analisada. O comportamento de uma variável visualizado através de um histograma é tão importante quanto medidas de tendência central e medidas de dispersão ((BUSSAB; MORETTIN, 2005).

A incerteza decorrente do efeito da variação de temperatura na sala de análise foi então determinada considerando a influência da variação de temperatura sobre a expansão volumétrica do líquido utilizado como solvente e sobre o volume da vidraria. Em função da expansão de volume do líquido ser consideravelmente maior que a dilatação da vidraria, considerou-se apenas a primeira para efeito de cálculo. (EURACHEM, 2012).

Figura 17 – Histograma da frequência da variação de temperatura ambiente na sala de análise no período de Julho/2011 a Junho/2012



Fonte: Do autor, 2013.

Assim o efeito da variabilidade da temperatura da série histórica registrada na sala de análise do laboratório de controle de qualidade ao longo de doze meses e sua relação com o coeficiente de expansão volumétrica dos solventes utilizados e o volume das vidrarias utilizadas foi calculado utilizando-se a equação 11. A tabela 12

apresenta os valores calculados para a Incerteza tipo A das Vidrarias Volumétricas em função da Variação da Temperatura Ambiente.

Tabela 12

Determinação da Incerteza tipo A das Vidrarias Volumétricas em função da Variação da Temperatura Ambiente			
	BV 10mL	BV 100mL	PV 2mL
$\delta_T$ (°C)	7,8	7,8	7,8
$\beta_{H_2O}$ (°C <sup>-1</sup> )	0,00021	0,00021	0,00021
Volume (mL)	10	100	2
$u_{t(V)}$ (mL)	0,016380	0,163800	0,003276
$u_{t(V)} / \sqrt{3}$ (mL)	0,009456997	0,094569974	0,001891399

Fonte: Do autor, 2013.

Onde:  $u_{t(V)} = \delta_T \cdot \beta_{H_2O} \cdot V$

$\beta_{H_2O}$  = Coeficiente de expansão volumétrica da água =  $2,1 \times 10^{-4}$  (EURACHEM, 2002)

n = 448 (obtido da série histórica de registros de temperatura)

$\nu_{eff}$  = grau de liberdade efetivo = 447

Para simplificar o cálculo foi considerado apenas o coeficiente de expansão volumétrica da água, tendo em vista que a água:

- é o solvente utilizado em maior quantidade na preparação da solução diluente mais usada e da fase móvel da metodologia de quantificação;
- apresenta coeficiente de expansão volumétrica na ordem de  $10^{-4}$ , mesma ordem de grandeza dos demais solventes utilizados.

### 6.3.1.6 Contribuição do Operador

A contribuição do operador foi avaliada como precisão intermediária por meio da análise da mesma amostra no mesmo equipamento por cinco dias diferentes, utilizando-se um único analista. Os resultados encontrados são apresentados na tabela 13. Embora tenha sido calculada essa contribuição para a incerteza combinada, considerou-se que o operador tenha conhecimento, habilidade e atitudes para a condução do procedimento de análise.

Tabela 13

Determinação da Incerteza tipo A da Contribuição do Operador para a para a Precisão da Metodologia					
EQUIPAMENTO	YOUNG LIN	YOUNG LIN	YOUNG LIN	YOUNG LIN	YOUNG LIN
DATA	28/11/2012	4/12/2012	5/12/2012	6/12/2012	18/12/2012
Nº ANALISE					
1	101,358	101,719	101,450	101,739	100,570
2	100,093	101,209	100,935	99,482	99,497
3	101,730	100,335	99,918	100,099	101,368
MÉDIA TEOR	101,060	100,088	100,768	100,440	100,478
DP TEOR	0,9	0,7	0,8	1,2	0,9
DPR	0,8	0,7	0,8	1,2	0,9
MÉDIA	100,567 %				
DP	0,4 %				
DP/√15	0,1 %				
$u_{\text{Precisão Operador}}$	$= 0,1/100,567 = 0,000994$				

Fonte: Do autor, 2013.

DP= Desvio Padrão

DPR= Desvio Padrão Relativo = (DP/Média) . 100

### 6.3.2 Determinação das Incertezas tipo B

#### 6.3.2.1 Vidrarias Volumétricas

As tabelas 14, 15 e 16 apresentam respectivamente o cálculo da incerteza tipo B para os balões volumétricos de 10 e 100 mL e para a pipeta volumétrica de 2 mL.

Tabela 14

Determinação da Incerteza tipo B do Balão Volumétrico 10 mL	
Nº de Referência	BV-49
Volume de diluição nominal (mL)	10
Nº do Certificado de Calibração	HXL-VID-01201/01
Fabricante	Amitel
Incerteza Expandida (mL)	0,002
K	2,008
<b>Incerteza Padrão Combinada (mL)</b>	<b>0,000996</b>
veff	infinito

Fonte: Certificado de calibração do Balão Volumétrico de 10 mL emitido pela Hexolab – Laboratório Avançado de Metrologia Ltda (rastreadabilidade RBC).

Tabela15

Determinação da Incerteza tipo B do Balão Volumétrico 100 mL							
Referência	D-625	D-639	D-645	D-647	D-514	D-515	D-525
Volume nominal (mL)	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Certificado	R06105	R06116	R06121	R06116	R06075	R06076	R06082
Fabricante	Vidroq	Vidroq	Vidroq	Vidroq	Vidroq	Vidroq	Vidroq
U (mL)	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013
K	2,012	2,012	2,012	2,012	2,012	2,012	2,012
<b><math>\mu_c</math> (mL)</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>	<b>0,00646</b>
$v_{eff}$	infinito	infinito	infinito	infinito	infinito	infinito	infinito

Fonte: Certificado de calibração do Balão Volumétrico de 100 mL Vidroquímica emitido pela Hexolab – Laboratório Avançado de Metrologia Ltda (rastreadabilidade RBC).

Tabela16

Determinação da Incerteza tipo B da Pipeta Volumétrica 2 mL				
Nº de Referência	31007	31017	31027	31037
Volume de diluição nominal (mL)	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
Nº do Certificado de Calibração	310007	310107	310207	310307
Fabricante	Amitel	Amitel	Amitel	Amitel
Incerteza Expandida (mL)	0,0011	0,0009	0,0008	0,0008
K	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
<b>Incerteza Padrão Combinada(mL)</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0004</b>
$v_{eff}$	infinito	infinito	infinito	infinito

Fonte: Certificado de calibração da Pipeta Volumétrica de 2 mL Amitel Ltda (rastreadabilidade RBC).

### 6.3.2.2 Conjunto de Pesos Padrão e Balança Analítica

As tabelas 17 e 18 apresentam respectivamente o cálculo da incerteza tipo B para o conjunto de peso padrão, especificamente para a massa aplicada de 0,01g e para a balança analítica utilizada na metodologia.

Tabela 17

Determinação da Incerteza tipo B do Conjunto de Peso Padrão	
Nº de Referência	FQ-PE-02
Nº do Certificado de Calibração	1408/11
Fabricante	Knwaagen
Massa Aplicada (g)	0,01
Incerteza Expandida (mg)	0,063
K	2
<b>Incerteza Padrão Combinada (mg)</b>	<b>0,0315</b>
$v_{eff}$	infinito

Fonte: Certificado de calibração do Conjunto de Peso Padrão emitido pela CTS (rastreadabilidade RBC).

Tabela 18

Determinação da Incerteza tipo B da Balança Analítica	
Nº de Referência	FQ-BL-06
Nº do Certificado de Calibração	533657
Fabricante	Marte
Massa Aplicada (g)	0,01
Incerteza Expandida (g)	0,0001
K	2
<b>Incerteza Padrão Combinada (g)</b>	<b>0,00005</b>
$v_{eff}$	infinito

Fonte: Certificado de calibração da Balança Analítica emitido pela Gero Ltda (rastreadabilidade RBC).

### 6.3.2.3 Termohigrômetro

A tabela 19 apresenta o cálculo da incerteza tipo B para o termohigrômetro da sala de preparo de soluções.

Tabela 19

Determinação da Incerteza tipo B do Termohigrômetro	
Nº de Referência	FQ-THI-26
Modelo	HT-200
Nº do Certificado de Calibração	569793
Fabricante	Instrutherm
Localização	Sala Análise
Erro	-0,36
Valor Convencional	25,06
Indicação do Instrumento (°C)	24,70
Incerteza Expandida (°C)	0,61
K	2
<b>Incerteza Padrão Combinada (°C)</b>	<b>0,305</b>
$v_{eff}$	infinito

Fonte: Certificado de calibração do Termohigrômetro emitido pela Gero Ltda (rastreadabilidade RBC).

### 6.3.2.4 Padrão de Referência

A tabela 20 apresenta o cálculo da incerteza tipo B para o padrão de referência utilizado na metodologia.

Tabela 20

Determinação da Incerteza tipo B do Padrão de Referência de Ofloxacino	
Lote	G11182
Fabricante	USP
Teor (%)	99,9
Desvio Padrão	0,1
<b>Incerteza Padrão (DP/<math>\sqrt{3}</math>)</b>	<b>0,057735</b>

Fonte: Certificado de Análise do Padrão de Ofloxacino USP

## 6.4 RESULTADOS DOS CÁLCULOS E DETERMINAÇÕES

O software Microsoft Excel® 2003 demonstrou ser uma ferramenta de grande utilidade na organização dos dados obtidos, e de fundamental importância na execução de cálculos para determinação da contribuição de cada uma das fontes de incerteza relacionadas à medição.

### 6.4.1 Resultados do Cálculo da Incerteza Combinada

A tabela 21 apresenta a propagação das fontes de incerteza, a determinação das incertezas padronizadas para cada fonte e a determinação da incerteza combinada na quantificação por CLAE do teor de ofloxacino em comprimidos de 400 mg.

No cálculo da incerteza padrão combinada para cada fonte de incerteza principal, o valor das incertezas foram divididos pelo valor da grandeza da respectiva fonte principal quando a unidade de grandeza desta apresentava-se em uma unidade diferente da primeira. Assim cada uma dessas incertezas tornava-se adimensional e a unidade de grandeza da incerteza padrão combinada da fonte principal era dada pela unidade em concordância com a unidade do mensurando. A incerteza tipo B oriunda da calibração da balança analítica foi convertida para a unidade mg, tendo em vista que a unidade peso padrão era essa.

Tabela 21

## Planilha de Cálculo da Incerteza Padrão Combinada

x	RA (mV.s)		pp (mg)		PM (mg)		TP (mg)		RP (mV.s)		Precisão do Operador(%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Descrição	Tipo de Incerteza											
Fl	Descrição Fl											
Calibração injetor em relação à Solução Amostra (mV.s)	2,800702											
Calibração injetor em relação à Solução Padrão (mV.s)									1,844815			
Calibração Balança (mg)				0,050000								
Repetitividade de Pesagem do peso padrão (mg)			0,006882									
Calibração do conjunto de peso padrão (mg)				0,031500								
Calibração PV 2mL (mL)		0,000275										
Repetitividade Avolumação PV2mL (mL)	0,001352											
Calibração BV 10mL (mL)										0,000678		
Repetitividade de Avolumação BV 10 mL (mL)									0,000100			
Calibração BV 100mL (mL)		0,000065										
Repetitividade de Avolumação BV 100 mL (mL)	0,000114											
Calibração Termohigrômetro Sala Análise (°C)		0,012200										
Varição Temperatura Sala Análise/ PV 2 mL (mL)	0,000946											
Varição Temperatura Sala Análise/ BV 100 mL (mL)	0,000946											
Varição Temperatura Sala Análise BV 10 mL (mL)									0,000946			
Homogeneidade amostra (mg)					2,214943							
Pureza do Padrão (%)									0,057735			
Influência do Analista (%)												0,103280
$\Sigma (\mu_{xa}^2 + \mu_{xb}^2 + \dots + \mu_n^2)$	7,844085		0,003540		4,905973		xxxx		3,403343		xxxx	
Incerteza padrão ( $\mu_x$ ) $\mu_x = \sqrt{\Sigma (\mu_{xa}^2 + \mu_{xb}^2 + \dots + \mu_n^2)}$	2,800729		0,059495		2,214943		xxxx		1,844815		xxxx	
Valor x	1473,232000		10,100000		679,100000		0,999000		1407,534000		100,567000	
Incerteza Relativa ( $\mu_x/x$ )	0,001901		0,005891		0,003262		0,057793		0,001311		0,001027	
Potência Quadrática das Incertezas relativas ( $\mu_x/x$ ) <sup>2</sup>	0,000004		0,000035		0,000011		0,003340		0,000002		0,000001	
Soma das Potências Quadráticas das Incertezas relativas $\Sigma (\mu_x/x)^2$	0,003392											
Raiz quadrada da Soma da potência quadrática das Incertezas ( $\mu_x/x$ ) <sup>2</sup>	0,058239											
TEOR (%)	101,076000											
$u_c$ (%)	4,886524											

Fonte: Do autor, 2013

Onde:

$$\text{Incerteza padrão combinada} = \mu_c = (\text{Teor}) \times \sqrt{\left(\frac{u_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_n}{n}\right)^2}$$



### 6.4.2 Resultados do Cálculo do Grau de Liberdade Efetivo, do fator de Abrangência e da Incerteza Expandida

A tabela 22 apresenta a propagação das fontes de incerteza de acordo com o número de graus de liberdade de cada fonte, e em seguida a determinação do grau de liberdade efetivo e o cálculo da incerteza expandida para o teor de ofloxacino em comprimidos de LFM-Ofloxacino 400 mg.

Tabela 22

Planilha de Cálculo do Grau de Liberdade Efetivo, do Fator de Abrangência e da Incerteza Expandida

x	RA	v	pp	v	PM	v	RP	v	Precisão de Operação	v
Tipo de Incerteza	A		A		A		A		A	
Descrição FI										
Calibração injetor em relação à Solução Amostra	2,800702	29								
$(\mu^2 / v)$	2,121630									
Calibração injetor em relação à Solução Padrão							1,844815	9		
$(\mu^2 / v)$							1,286971			
Repetitividade de Pesagem do peso padrão			0,006882	19						
$(\mu^2 / v)$			0,000000							
Repetitividade Avolumação PV2mL	0,001352	19								
$(\mu^2 / v)$	0,000000									
Repetitividade de Avolumação BV 10 mL							0,000100	19		
$(\mu^2 / v)$							0,000000			
Repetitividade de Avolumação BV 100 mL	0,000114	19								
$(\mu^2 / v)$	0,000000									
Varição Temperatura Sala Análise/ PV 2 mL	0,000946	447								
$(\mu^2 / v)$	0,000000									
Varição Temperatura Sala Análise/ BV 100 mL	0,000946	447								
$(\mu^2 / v)$	0,000000									
Varição Temperatura Sala Análise BV 10 mL							0,000946	447		
$(\mu^2 / v)$							0,000000			
Homogeneidade amostra					2,214943	59				
$(\mu^2 / v)$					0,407942					
Influência do Analista									0,103280	14
$(\mu^2 / v)$									0,007377143	
$\Sigma((\mu_{x1})^2/v + (\mu_{x2})^2/v + \dots + (\mu_{xn})^2/v)$					3,919823					
<b>Incerteza padrão combinada</b>					4,886524					
$(\mu_c)^2$					570,164462					
$v_{eff} = (\mu_c)^2 / \Sigma((\mu_{x1})^2/v + (\mu_{x2})^2/v + \dots + (\mu_{xn})^2/v)$					145,456687					
<b>k (95%)</b>					1,960000					
<b>U = <math>\mu_c \times k</math></b>					9,577587					

Fonte: Do autor, 2013

Onde:  $v_{eff}$  = grau de liberdade efetivo

U = Incerteza expandida (%)

Para o cálculo do grau de liberdade efetivo foram consideradas apenas as incertezas do tipo A, tendo em vista que as incertezas do tipo B apresentam grau de liberdade infinito.

A partir da determinação do número de graus de liberdade efetivo, o fator de abrangência K foi determinado consultando a tabela de Distribuição de Student, anexo A, considerando um grau de confiança de 95%.

A faixa de teor estabelecida pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição para o teor de ofloxacino em comprimidos de Ofloxacino 400 mg é de 90 e 110% sem indicação da precisão do mensurando. Os resultados evidenciaram um teor de 101,11% com incerteza expandida de 9,58%, para um grau de liberdade efetivo de 301,95 com um grau de confiança de 95%, aplicando teste bilateral. Isso representa 5% do lote industrial com teor de 91,53% ou 110,69%. É importante ressaltar que 5 % de um lote industrial de comprimidos de LFM Ofloxacino 400 mg representa um quantitativo de 10.000 comprimidos distribuídos aleatoriamente dentro de um lote de 200.000 comprimidos, e que isso poderia ter reflexos negativos na eficácia do medicamento, caso o teor se apresentasse, por exemplo, em torno de 96%.

Considerando a incerteza de medição como a melhor representação da dispersão dos resultados que uma metodologia poderia apresentar, passamos a ter uma real dispersão para todos os resultados possíveis. Desta forma temos um resultado na ordem de  $\pm 9,6\%$  de variabilidade possível. Sob esses resultados e tomando a incerteza combinada como a melhor estimativa do desvio padrão da mensuração, podemos, aplicando a equação da distribuição normal reduzida, calcular a probabilidade de obtenção de resultados não conformes em função do teor da amostra. Desta forma teremos: teor  $\pm$  incerteza combinada. Abaixo podemos observar a tabela 23 com os resultados obtidos para valores possíveis de teor considerando os critérios de 90 a 110% como intervalo de aprovação especificado pela FB. Como podemos observar temos uma probabilidade de 0,5 de obter um resultado não conforme caso o teor do produto final venha a ser 90%. Com um lote com o teor de 96%, por exemplo, temos uma probabilidade de 0,11 de obtermos um item não conforme.

Segundo Ellison e Williams (2007), a solução para o uso da informação de incerteza na avaliação de conformidades é o conceito de regras de decisão. Essas regras formam um protocolo para aceitar ou rejeitar um determinado produto com base no resultado do mensurando, sua incerteza e os limites de especificação. Assim podem ser determinadas as zonas de rejeição e aceitação para um produto.

De acordo com os resultados obtidos para o produto avaliado, seria necessário trabalhar dentro da faixa de 98 a 102% para que viéssemos a ter uma probabilidade menor ou igual a 0,05 de itens fora da especificação mínima necessária para aprovação do lote. Este tipo de abordagem é de grande utilidade quando se deseja parâmetros de otimização de controle da qualidade.

Tabela 23

Probabilidade de Resultados Não Conformes obtidos para valores de teor considerando como critério de aprovação a faixa de 90 a 110%

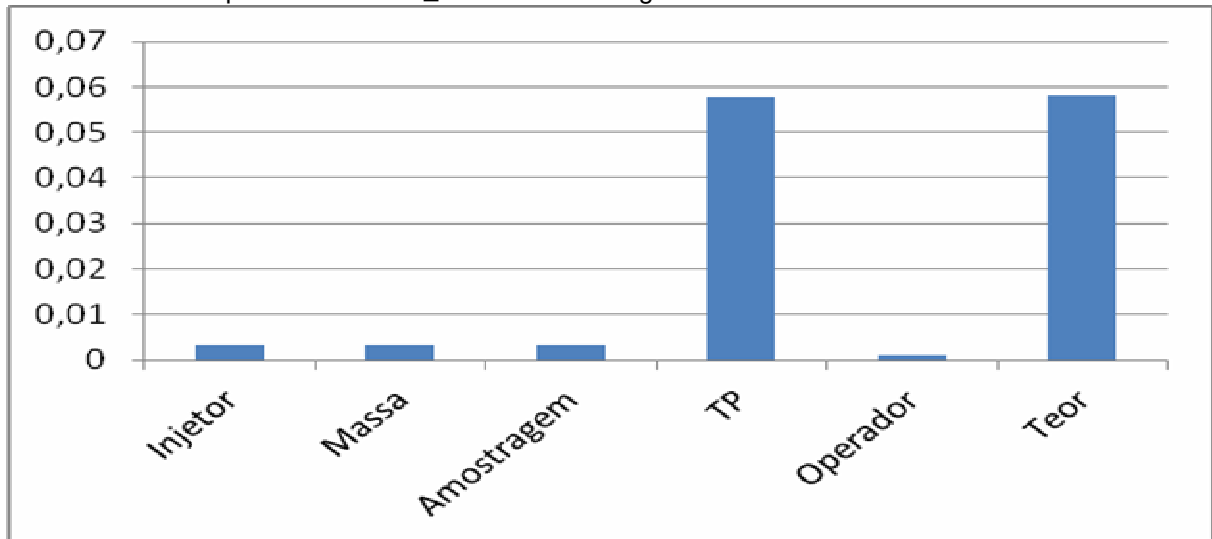
Teor da amostra (%)	Probabilidade de resultados não conforme
90	0,50
91	0,42
92	0,34
93	0,27
94	0,20
95	0,15
96	0,11
97	0,08
98	0,05
99	0,04
100	0,04
101	0,04
102	0,05
103	0,08
104	0,11
105	0,15
106	0,20
107	0,27
108	0,34
109	0,42
110	0,50

Fonte: Do autor, 2013

### 6.4.3 Resultados da Análise de Sensibilidade

A figura 18 apresenta os resultados obtidos para análise de sensibilidade das grandezas de entrada envolvidas no cálculo de incerteza padrão combinada do resultado final.

Figura 18 - Gráfico Comparativo das principais contribuições de incerteza no resultado do teor de ofloxacino em comprimidos de LFM\_Ofloxacino 400mg



Fonte: Do autor, 2013

Onde: TP – Teor do Padrão Analítico

Observa-se que a qualidade do padrão de referência utilizado tem grande contribuição para a incerteza padrão combinada do resultado do teor de ofloxacino em comprimidos de LFM\_Ofloxacino 400mg.

## 7 CONCLUSÃO

A metodologia proposta para cálculo da incerteza padrão combinada, da incerteza expandida e do grau de liberdade efetivo no ensaio analítico para quantificação de teor em comprimidos de LFM – Ofloxacino 400 mg, por meio da elaboração de planilhas no microsoft excel® foi estruturada com base na 3ª edição do Guia Determinando a Incerteza de Medição da Eurachem/ Citac, 2012 e poderá ser aplicada como um instrumento metodológico para outros ensaios analíticos que utilizem a CLAE tomando-se o devido cuidado de analisar as fontes de incerteza no processo analítico e caso seja necessário deverão ser providenciadas as devidas adaptações.

A identificação das fontes de incerteza e seus componentes por meio da elaboração de fluxograma esquematizando as etapas da metodologia analítica por CLAE para verificação de teor em comprimidos revestidos de Ofloxacino 400mg juntamente com a fórmula matemática para cálculo do teor no referido ensaio permitiram a formação de uma estrutura básica para a elaboração do diagrama de causa e efeito, que demonstrou ser uma ferramenta essencial no delineamento das fontes que influenciam a incerteza que acompanha o resultado de um ensaio analítico. Por outro lado a elaboração de planilhas, identificando os tipos de incerteza oriundas de cada fonte, é passo fundamental para permitir a construção das planilhas para cálculo da incerteza padronizada e do grau de liberdade efetivo associados ao resultado do ensaio, bem como da respectiva incerteza expandida. Demonstrar passo a passo e de forma organizada a execução do cálculo é essencial para que este último possa ser compreendido.

A análise da amostra do lote de LFM-Ofloxacino 400 mg nº 1111024 mostrou-se satisfatória em relação ao teor do fármaco, de acordo com o especificado. Os resultados evidenciaram um teor de 101,11% com incerteza expandida de 9,58%, e um grau de liberdade efetivo de 301,95 para um grau de confiança de 95%.

As principais contribuições para a incerteza padrão combinada do resultado analítico do teor de Ofloxacino foram: a incerteza do padrão analítico, a incerteza oriunda da amostragem do lote e as incertezas de massa.

O processo de determinação da incerteza de medição exige um exame minucioso do ensaio analítico, analisando todas as fontes de incerteza possíveis. É importante que o percentual de contribuição de cada fonte identificada para a

incerteza expandida do resultado final seja calculado de maneira a possibilitar a identificação das fontes de incerteza mais relevantes. A incerteza de medição, além de atribuir qualidade ao resultado analítico, acrescentando precisão ao mesmo, permite também um conhecimento mais profundo do ensaio analítico, tornando possível identificar os parâmetros que mais contribuem no resultado final do mensurando e conseqüentemente propicia um maior controle do processo analítico.

Quando a incerteza de medição que acompanha o resultado analítico não é conhecida, é consenso avaliar a conformidade do resultado obtido em relação à sua exatidão à luz da especificação normatizada nos compêndios oficiais vigentes, desconsiderando a precisão que acompanha este resultado. Ainda que seja estabelecido um intervalo de confiança para o resultado em função de um grau de confiança de 95%, esse intervalo é calculado em função do desvio padrão e da média dos resultados obtidos e portanto representa um corte transversal do que aconteceu em determinado ensaio analítico. Este estudo permitiu concluir que o cálculo da incerteza expandida proporciona o conhecimento da precisão do resultado analítico, ou seja, do intervalo em torno do resultado que abrange uma extensa fração de distribuição de probabilidade, caracterizada por aquele resultado e sua incerteza padrão combinada, tornando o resultado mais completo e permitindo tomadas de decisão mais asseguradas quanto à avaliação de sua conformidade.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.A.S.; PIRES, A.C. Acreditação: vantagens e dificuldades da implementação de um sistema da qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração. **Revista Química**, Portugal, abr/jun, p. 34-39, 2006.

ALVES, N.P.; MORAES, D.N. Metrologia química e utilização de materiais de referência em medições químicas. **Revista Analytica**. n.3, Fev, 2003. p. 54-64.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.

\_\_\_\_\_. **NBR ISO/IEC 9001**. Sistemas de gestão da qualidade – Requisitos. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de jun. de 2003, Seção 1.

\_\_\_\_\_. RDC nº 210 de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das BPF, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de ago. de 2003a.

\_\_\_\_\_. RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Poder Executivo, 16 de abril de 2010, Seção1.

\_\_\_\_\_. RDC nº 12, de 16 de Fevereiro de 2012. Dispõe sobre a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Poder Executivo, 22 de Fevereiro de 2012, Seção1.

Brasil. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado; 1988.

\_\_\_\_\_. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, seção 1, 20 de set. de 1990.

BORGES, R.M.H. Comparação Interlaboratorial: Instrumento para a garantia de qualidade em laboratórios químicos. In: **Seminário do Programa Nacional de Acreditação de Laboratórios em Análise da Qualidade da Água**, Curitiba: Agência Nacional de Águas, 2006.

BRANDÃO, S.M.C. **Avaliação da confiabilidade dos resultados gerados a partir das verificações físicas e químicas do ensaio de dissolução de medicamentos de 1983 a 2008**. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. São Paulo: Editora Saraiva, 5ª ed., 2005

CARDOSO, S.H.; ASSIS, J.V.; ALMEIDA, M.V., LOURENÇO, M.C.S.; VICENTE, F.R.C.; SOUZA, M.V.N. Synthesis and antitubercular activity of isoniazid condensed with carbohydrate derivatives. **Química Nova**. v.32, n.6, p. 1557-60, 2009.

CASTANHEIRA, L.G.; MELLO, D.R.; OLIVEIRA, G.G. A regulação de medicamentos: evolução e principais avanços. In: BUSS, P.M.; CARVALHEIRO,



J.R.; CASAS, C.P.R., (Org). **Medicamentos no Brasil: inovação e acesso**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 79-102.

CASTRO, I.O. **Tuberculose Multirresistente**: Análise de casos em moradores do Recife, região metropolitana e municípios do interior do estado de Pernambuco. Recife, 2010. 77 p. II. Dissertação de Mestrado Profissional em Saúde Pública- Centro de Pesquisas Ageu Magalhães. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

COSTA, E.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rosenfeld, S.(org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.15-39, 2000.

COSTA,E.A. **Vigilância Sanitária**: Proteção e Defesa da saúde. São Paulo : Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos, 2004.

CRUZ, M.H.C.; RODRIGUES, J.M.; COUTO, P.R.G.; CUNHA, V.S. Estimativa da Incerteza de Medição em Análise Cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1578-1584, 2010.

DALCOLMO; M.P; ANDRADE, M.K.N.; PICON; P.D. Tuberculose Multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.41, n. 1, p. 34-42, 2007.

DEMPSEY, C.H.; PETTY, J.D. **Laboratory Accreditation and data certification: a system for success**. Michigan: Lewis, 1991, p. 14-20.

DIAS, M.G.; CAMÕES, M.F.G.F.C.; OLIVEIRA, L.Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. **Food Chemistry**. v.109, p.815-824. 2008

ELLISON, S.L.R.; WILLIAMS, A. Eurachem/Citac guide: **Use of uncertainty information in compliance assessment**, 1ed, 2007. Disponível em [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)

\_\_\_\_\_.Eurachem/Citac guide: **Quantifying Uncertainty in Analytical**

**Measurement**, 3ed, 2012. Disponível em [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010. v.2. p. 1176-1178.

FILHO, O.B. Implantação de Sistemas de Qualidade em Laboratórios de Ensaios. **Revista Analytica**. São Paulo, n.3, 2003. p. 24-28.

GONÇALVES JR , A.A. Metrologia Parte I, **LABMETRO**. Florianópolis, 2004.  
Disponível em: <<http://www.demec.ufmg.br-ema092-documentos.pdf>> Acesso em: 2 de julho de 2012.

GONÇALVES, E.B. ; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C; BIZZO, H.R.; GERMANI, R. Busca de estimativas de incerteza em medições analíticas em laboratórios de alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**. v.9, n.4, p.237-247, 2006.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 7ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2007.

\_\_\_\_\_. DOQ-CGCRE-001.Rev. 04. **Orientação para acreditação de laboratórios de calibração e de ensaio** Rio de Janeiro, 2010.

\_\_\_\_\_. **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição – GUM 2008**. Rio de Janeiro, 2012.

\_\_\_\_\_. **Vocabulário Internacional de Metrologia – VIM 2012**. Rio de Janeiro, 2012a.

JUNIOR, W.A.P. **Quimioterapia da tuberculose, complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase**. In: Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Tradução Brunton, L.L. *et al.* 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007, p. 1083-1102.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos, **Revista Brasileira de Farmácia**. v.88, n.4, p.177-180. 2007.

LEITO,S.; MÖLDER, K.; KÜNNAPAS,A.; HERODES, K.; LEITO,I. Uncertainty in liquid chromatographic analysis of pharmaceutical product: Influence of various uncertainty sources. **Journal of Chromatography A**. v. 1121, p. 55-63. 2006.

LUCCHESI, G. **Globalização e regulação sanitária; os rumos da vigilância sanitária no Brasil**. 2001. 329 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

MARINHO, B.L.; NETO, J.A. A necessidade de gerenciamento da qualidade de fornecedores no ambiente globalizado. In: **XII Encontro Nacional de Engenharia de Produção**. Gramado, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), 2010. Portal da Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Disponível em: <[http://w.w.w\\_saude\\_gov\\_br\\_principal.mht](http://w.w.w_saude_gov_br_principal.mht)> Acesso em: 2 de julho de 2011.

MOURA, L.G.M.; ROLEMBERG, M.P.; RAMOS, A.C.S.; SANTOS, M.F.P. ;ZILIO, E.L. Avaliação das incertezas associadas à determinação do parâmetro de solubilidade de Hildebrand de petróleos. **Química Nova**. v.34, n.2, p.226-331. 2011.

NOVASKI, O.: FRANCO, S.M. Qualidade aplicada em laboratório de metrologia: incerteza de medição em blocos padrão. In: **XVIII Congresso de Metrologia UNICAMP**, 2000.

NUNES, P. **Conceito de Análise de sensibilidade**. 2009. Disponível em: <[http://www.knoow.net/ciencecomenpr/gestao/analise\\_de\\_sensibilidade.htm](http://www.knoow.net/ciencecomenpr/gestao/analise_de_sensibilidade.htm)> Acesso em: 2 de novembro de 2011.

OIANO-NETO, J.; et al. Avaliação da incerteza de medição associada à análise de carotenóides por cromatografia líquida de alta eficiência. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ**. Águas de Lindóia, 2008.

PALLASTRELLI, M.B.; FUNCK, J.A.B.; MILÃO, D. Implantação da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 em laboratórios de controle de qualidade de insumos farmacêuticos. In: **X Salão de Iniciação Científica PUCRS**. Porto Alegre, 2009.

PAIVA, S.P. **Análise da Confiabilidade Metrológica na determinação de clorofila A em amostras de águas marinhas por espectrofotometria**. Dissertação Mestrado, PUCRJ. Rio de Janeiro, 2001.

PONÇANO, V.M.L.; CARVALHO, T.E.M. Metrologia em química: a nova fronteira. **Metrologia & Instrumentação**. São Paulo, fev/mar, 2006.

ROSENBERG, F.J. Mecanismos Legais de Controle de Segurança do Medicamento. **Revista de Direito Sanitário**, v.2, n.1, p. 7-10, mar., 2001.

SANTOS, M.F.P. ; OLIVEIRA, E.C.; VAITSMAN, D.S.; FELICIANO, D.S.P.J.; GUIMARÃES, R.C.L. Estimativa da incerteza de medição da fortificação do material de referência certificado (MRC) – uma estratégia criativa. **Boletim Técnico da Petrobrás**. Rio de Janeiro, v.48, n.1/2, p. 25-36, jan/jun, 2005.

SANTOS, D.Q.; VIEIRA, D.F.. Determinação de coeficiente de expansão térmica do biodiesel e seus impactos no sistema de medição volumétrico. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 35, n. 4, 2010 .

Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702010000400014&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400014&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 19 Fevereiro de 2013.

SARAIVA,C.P. Validação de métodos analíticos e determinação da incerteza de medição: o que há em comum? **Revista Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, p. 48-54, mar-abr., 2009.

SILVA, P.A.L. Estimativa da incerteza de medição: alternativas para o diagrama de Ishikawa e para o gráfico das contribuições individuais. In: **Congresso da Qualidade em Metrologia. ENQUALAB-2008**. São Paulo, 2008.

SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**. v.28, n.4, p.678-682. 2005.

SOUZA, J.A. ; REYNOLDS, A.P.; DELGADO,I.S.; MARQUES, J.C.; TEIXEIRA, L.M.; JESUS, C.G. Estudo comparativo de diferentes métodos na avaliação de incertezas de medição em metrologia química. In: **2ª Conferência Nacional de Metrologia e Inovação. Sociedade Portuguesa de Metrologia**. Funchal, 2007

VOGEL, A. J.; **Análise química quantitativa**. 6ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2002.

XAVIER, M.I.M.; BARRETO, M.L. Tuberculose na cidade de Salvador: tendências das taxas de incidência e de mortalidade no período de 1981 a 2000.**Boletim de Pneumologia Sanitária** 2006, v.14, n.1, p.7-15, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); **Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis**, 4 ed., Genebra: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); **Guidelines for prequalification programme**, Genebra: WHO, 2010.

## ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO DE STUDENT

<b>Distribuição de Student</b>											
<b>g.l.</b>	<b>75%</b>	<b>80%</b>	<b>85%</b>	<b>90%</b>	<b>95%</b>	<b>97.5%</b>	<b>99%</b>	<b>99.5%</b>	<b>99.75%</b>	<b>99.9%</b>	<b>99.95%</b>
<b>1</b>	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
<b>2</b>	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
<b>3</b>	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
<b>4</b>	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
<b>5</b>	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
<b>6</b>	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
<b>7</b>	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
<b>8</b>	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
<b>9</b>	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
<b>10</b>	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
<b>11</b>	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
<b>12</b>	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
<b>13</b>	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
<b>14</b>	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
<b>15</b>	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
<b>16</b>	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
<b>17</b>	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
<b>18</b>	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
<b>19</b>	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
<b>20</b>	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
<b>21</b>	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
<b>22</b>	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
<b>23</b>	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
<b>24</b>	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
<b>25</b>	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
<b>26</b>	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
<b>27</b>	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
<b>28</b>	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
<b>29</b>	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
<b>30</b>	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
<b>40</b>	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
<b>50</b>	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
<b>60</b>	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
<b>80</b>	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
<b>100</b>	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
<b>120</b>	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
<b>Infinito</b>	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291
	<b>25%</b>	<b>20%</b>	<b>15%</b>	<b>10%</b>	<b>5%</b>	<b>2,50%</b>	<b>1%</b>	<b>0,50%</b>	<b>0,24%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,05%</b>

Fonte: VOGEL, 2002.