

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Paula Alves Furtado

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO RESULTADO DO ENSAIO DE
DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE PIRAZINAMIDA 500 mg**

Rio de Janeiro

2010

Ana Paula Alves Furtado

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO RESULTADO DO ENSAIO DE
DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE PIRAZINAMIDA 500 mg**

Trabalho de conclusão de apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientador: Me. Sérgio Alves da Silva
Me. Solange Maria Coutinho Brandão

Rio de Janeiro

2010

Furtado, Ana Paula Alves

Avaliação da Incerteza de Medição do Ensaio de Dissolução de Comprimidos de Pirazinamida 500 mg. / Ana Paula Alves Furtado. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

68 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Curso de Especialização em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

Orientadores: Me. Sérgio Alves da Silva e Me. Solange Brandão.

1. Ensaio de dissolução. 2. Avaliação de resultados. 3. Incerteza de medição.

Ana Paula Alves Furtado

**AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO RESULTADO DO ENSAIO
DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDO DE PIRAZINAMIDA 500 mg**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: ____/____/____

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Kátia Christina Leandro

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Me. José Luiz Neves de Aguiar

_____ (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ)

Me. Laís Bastos da Fonseca

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientador Me. Sérgio Alves da Silva

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientador Me. Solange Maria Coutinho Brandão

Rio de Janeiro

2010

“Eu te exaltarei, ó Deus, Rei meu, e bendirei o teu nome pelos séculos dos séculos. Cada dia te bendirei e louvarei o teu nome pelos séculos dos séculos. Grande é o Senhor e muito digno de louvor, e a sua grandeza, inescrutável”.

(Salmos 145 : 1-3)

AGRADECIMENTOS

A DEUS : “Pois será como a árvore plantada junto a ribeiros de águas, a qual dá o seu fruto na estação própria, e cujas folhas não caem, e tudo quanto fizer prosperará” Salmos 1: 1-3.

Aos meus pais Paulo César e Leontina pelo amor, dedicação, compreensão e confiança.

A minha irmã Juliana e ao meu marido Carlos Eduardo pela paciência e apoio.

A direção do Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica pela oportunidade de realização deste curso.

Aos colegas de trabalho da Subdivisão de Controle de Qualidade do LAQFA pela compreensão e apoio durante a realização desta especialização.

A Kátia Christina e a José Luiz (INCQS/FIOCRUZ) pela orientação inicial deste trabalho.

A Solange e Sérgio (INCSQ/FIOCRUZ) pela orientação e amizade.

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

A todos os colegas da Especialização pelo companheirismo e amizade.

Aos funcionários da biblioteca e da secretaria do INCQS pela atenção.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O ensaio de dissolução permite avaliar, em laboratório, a performance de um produto, quanto à velocidade de liberação do fármaco em uma forma farmacêutica sólida, de forma a garantir a observância do efeito terapêutico (eficácia). O ensaio de dissolução é um dos testes mais importantes na tomada de decisão de aprovação de um lote ou nova formulação na indústria farmacêutica. Como todo ensaio analítico, o teste de dissolução deve gerar resultados confiáveis (precisos e exatos), que possibilitem uma tomada de decisão com grau de confiança adequado. Este estudo propôs avaliar a incerteza de medição do resultado do ensaio de dissolução de comprimidos de pirazinamida 500 mg, medicamento de importância estratégica para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Através de uma descrição detalhada e da construção de um Diagrama de Causa e Efeito, foi possível identificar as principais fontes de incerteza no resultado do ensaio de dissolução de pirazinamida 500 mg. As principais contribuições de cada fonte na incerteza total do resultado final também foram determinadas. A realização deste trabalho permitiu concluir que as principais contribuições para a incerteza do percentual da substância ativa pirazinamida liberada de sua matriz, no meio de dissolução foram: a incerteza relativa da absorvância da amostra (60,6%), incerteza relativa da concentração do padrão (25,3%) e a incerteza relativa das diluições da amostra (12,4%).

Palavras-chaves: ensaio de dissolução, avaliação de resultados, incerteza de medição.

ABSTRACT

The dissolution test allows an *in vitro* evaluation of drug releasing in a solid dosage form, in order to evaluate its compliance with the therapeutic effect (efficacy). The dissolution test is one of the most important quality control test which is used to approve medicine batches or new formulation development in the pharmaceutical industry. As all analytical test, the dissolution test should generate reliable results (precise and accurate). That is important to take a decision with adequate confidence. The aim of this study was evaluate the measurement uncertainty of the dissolution results of pyrazinamide 500 mg tablets, which is an important strategic drug for the National Program of Tuberculosis Control. Among a detailed description of the measuring and the construction of a Cause and Effect diagram, it was possible to identify the main sources of uncertainty in the dissolution results of pyrazinamide 500 mg. The main contributions of each source in the overall uncertainty of the final results were also determined. This study led to the conclusion that the main contributions to the uncertainty of the percentage active substance, pyrazinamide, released from its matrix, in the dissolution medium, were: the relative uncertainty of the sample absorbance (60.6 %), the relative uncertainty of the standard concentration (25.3 %), and the relative uncertainty of the sample dilutions (12.4 %).

Key-words: dissolution test, evaluation of results, measurement uncertainty.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fármacos comumente utilizados no tratamento da tuberculose.....	15
Figura 2 - Representação esquemática do modelo de difusão em camada.....	18
Figura 3 - Processos que ocorrem após a administração oral de formas farmacêuticas sólidas não revestidas.....	23
Figura 4 - Sistema de gestão no laboratório.....	31
Figura 5 - Distribuição retangular.	34
Figura 6 - Distribuição triangular.....	35
Figura 7 – Sistemática adotada para a avaliação da incerteza da medição.....	45
Figura 8 - Representação esquemática do ensaio de dissolução de pirazinamida, segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição	48
Figura 9 - Diagrama de causa e efeito das fontes de incerteza no ensaio de dissolução de pirazinamida.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza da % de dissolução57
- .
- Gráfico 2** - Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na leitura de absorvância da amostra.....58
- Gráfico 3** - Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na concentração teórica da amostra.....59
- Gráfico 4** - Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na concentração da solução padrão de trabalho.....59
- Gráfico 5**- Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza na porcentagem de dissolução, desconsiderando a influência da incerteza da pureza do padrão.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de monografias na Farmacopéia Americana (USP) e no Formulário Nacional (NF) com especificação para o teste de dissolução ou teste de liberação.....	21
Tabela 2 - Varáveis de um procedimento de dissolução e seus limites recomendados.....	28
Tabela 3 - Equipamentos utilizados na parte experimental do estudo	43
Tabela 4 - Concentração do padrão de trabalho: cálculo das incertezas padrão, combinada e relativa.....	51
Tabela 5 - Repetitividade da balança analítica AG 204 – Mettler Toledo.	52
Tabela 6 - Concentração da solução amostra: cálculo das incertezas padrão, combinada e relativa.....	53
Tabela 7 - Absorvância da solução padrão de trabalho em 268 nm: cálculo da incerteza padrão.....	53
Tabela 8 - Absorvância da solução amostra em 268 nm.	54
Tabela 9 - Cálculo das incertezas da leitura de absorvância da solução amostra.....	54
Tabela 10 - Resultado do teste de uniformidade.....	55
Tabela 11 - Graus de liberdade individual das fontes de incerteza tipo A.....	55
Tabela 12 - Resultado do ensaio de dissolução de Pirazinamida 500 mg (lote 001).....	56

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aam - absorvância da amostra
Apd - absorvância do padrão ou substância química de referência
BPL- Boas Práticas de Laboratório
DRP - Desvio Padrão Relativo
DICLA - Divisão de Credenciamento de Laboratórios
DOU – Diário Oficial da União
F.B. - Farmacopéia Brasileira
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INCQS - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
ISO - International Standardization Organization
LAQFA - Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica
NBR - Norma Brasileira Registrada
NIT - Norma Técnica Interna
OMS - Organização Mundial de Saúde
PNCT - Programa Nacional de Controle da Tuberculose
POP - Procedimento Operacional Padrão
rpm - rotações por minuto
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
s - desvio padrão
SQR- Substância Química de Referência
USP - Farmacopéia Americana
VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	A tuberculose como problema de saúde pública	13
1.2	O ensaio de dissolução.....	15
1.2.1	O Estabelecimento das bases físico-químicas da dissolução (1897 a 1960)	16
1.2.2	Biodisponibilidade e dissolução de medicamentos (1950 a 1990)	19
1.2.3	A dissolução como ferramenta de prognóstico da absorção de sólidos orais.....	21
1.2.4	O ensaio de dissolução na Indústria Farmacêutica	23
1.2.5	Fatores que influenciam o ensaio de dissolução	24
1.3	Incerteza de medição de ensaios	29
1.3.1	Especificação do mensurando	32
1.3.2	Identificação das fontes de incerteza padronizadas	32
1.3.3	Quantificação dos componentes de incerteza	32
1.3.4	Cálculo da incerteza combinada	35
1.3.5	Cálculo do fator de abrangência (k)	36
1.3.6	Cálculo da incerteza expandida	37
2.	JUSTIFICATIVA	38
3.	OBJETIVO	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos	39
4.	METODOLOGIA	40
4.1	Materiais e Métodos.....	40
4.1.1	Método analítico.....	40
4.1.2	Amostras de Pirazinamida 500 mg.....	42
4.1.3	Equipamentos, padrões e reagentes utilizados.....	42
4.1.4	Cálculos	43
4.1.5	Determinação da incerteza de medição do ensaio de dissolução de comprimidos de Pirazinamida 500 mg	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Determinação da incerteza de medição do ensaio de dissolução de comprimidos de Pirazinamida 500 mg.....	47
5.1.1	Especificação do mensurando.....	47

5.1.2	Identificação das fontes de incerteza padronizadas.....	48
5.1.3	Quantificação dos componentes de incerteza e cálculo da incerteza combinada.....	49
5.1.4	Cálculo do fator de abrangência (k)	55
5.1.5	Cálculo da incerteza expandida e resultado do ensaio de dissolução.....	56
5.2	Contribuição individual das fontes de incerteza na incerteza global.....	57
5.3	Cálculo do intervalo de confiança do ensaio de Pirazinamida 500 mg.....	60
6.	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 A TUBERCULOSE COMO PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA

A tuberculose é uma das enfermidades mais antigas no mundo, com relatos que datam à época da Grécia e Roma antigas. No século XIX, foi uma doença comum entre artistas e intelectuais, por estar relacionada a um estilo de vida boêmio (SOUZA e VASCONCELOS, 2005). Apesar disso, a tuberculose ainda é um grave e complexo problema sócio-econômico, que compromete o desenvolvimento humano.

A tuberculose é transmitida pelo ar, sendo o pulmão o principal órgão atingido pela doença. No entanto, o *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria conhecida como bacilo de Koch, em homenagem a Robert Koch, que a isolou em 1882, pode atingir qualquer órgão do corpo. Os sintomas da doença, normalmente, são tosse crônica, febre, suor noturno, dor no tórax, anorexia e falta de disposição. Os exames usados no diagnóstico desta enfermidade não apresentam alta sensibilidade ou são demorados. Os esquemas de tratamento da infecção latente ou da tuberculose-doença são insatisfatórios, por serem prolongados e apresentarem efeitos adversos em diferentes populações, reduzindo a adesão ao medicamento e favorecendo o aparecimento de cepas resistentes de bacilos (SOUZA e VASCONCELOS, 2005; KRITSKI *et al*, 2007).

O empobrecimento, a urbanização, a favelização, a escassez de recursos investidos em programas antituberculose e a pandemia da infecção causada pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) nas grandes metrópoles foram fatores importantes no aumento de casos de tuberculose, até mesmo em países desenvolvidos, nos quais a tuberculose parecia estar sob controle (LIMA *et al*, 1997; KRITSKI *et al*, 2007).

Em 1993, Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose em estado de emergência no mundo.

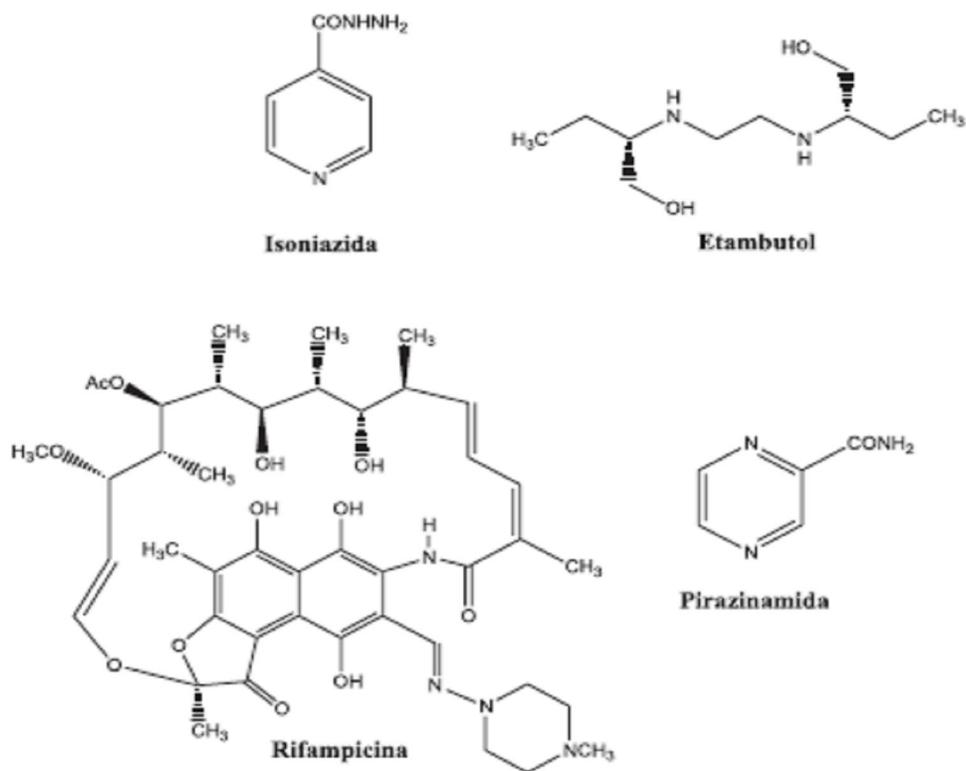
Segundo estimativas da OMS, cerca de um terço da população mundial (dois bilhões de pessoas) está infectado pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Destes, oito milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A tuberculose é um sério problema da saúde pública brasileiro. O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b). Anualmente notifica-se no Brasil cerca de 100 mil casos de tuberculose, dos quais cerca de vinte por cento estão no Estado do Rio de Janeiro. Aproximadamente seis mil pacientes morrem no país. Os principais fatores que contribuem para a manutenção e o agravamento do problema são a persistência da pobreza em nossa sociedade, a ocorrência da Aids nos grandes centros e o aumento da ocorrência de resistência a múltiplas drogas.

O atual plano de ação do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) está fundamentado na descentralização e horizontalização das ações de vigilância, prevenção e controle da tuberculose. O PNCT está integrado ao Sistema Único de Saúde (SUS), com atribuições definidas para as esferas federal, estadual e municipal. Desenvolve as seguintes ações nos componentes estruturais básicos: vigilância epidemiológica; medidas de proteção; integração com a atenção básica; ações integradas de educação em saúde, comunicação e mobilização social; capacitação e treinamento articulados com pólos de educação permanente; sustentação político-social; e avaliação, acompanhamento e monitoramento (SANTOS, 2007).

Inseridos no contexto do PNCT, os principais fármacos tuberculostáticos (figura 1) constam da Portaria nº 978, de 16 de maio de 2008, que dentre outras finalidades, dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde. Os medicamentos que contém isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol apresentam, portanto, importância estratégica no PNCT, que, em seu plano de ação, enfatiza a necessidade de fornecimento de esquemas de tratamento padronizados para todos os casos de tuberculose e a implantação e manutenção do controle de qualidade dos fármacos tuberculostáticos, em relação à equivalência farmacêutica e à farmacovigilância, a fim de garantir o tratamento dos pacientes (SANTOS, 2007).

Figura 1 - Fármacos comumente utilizados no tratamento da tuberculose.



1.2 O ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

As pesquisas envolvendo o conceito de dissolução foram iniciadas no final do século XIX. Nesta época, foram estabelecidos os fundamentos teóricos da dissolução, sem que houvesse qualquer correlação com a dissolução de fármacos. Apenas no século XX, na década de cinquenta, as pesquisas relacionadas à dissolução de fármacos foram iniciadas, uma vez que a dissolução passou a ser considerada um importante fator para a biodisponibilidade dos mesmos. Os estudos de dissolução de medicamentos prosseguiram ao longo do século XX, culminando com a criação do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS) e com o desenvolvimento de técnicas de dissolução *in vitro* para formulações farmacêuticas de liberação controlada (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

O conceito de dissolução está relacionado ao processo em que um fármaco no estado sólido é liberado de sua forma farmacêutica de administração, tornando-

se disponível para ser absorvido pelo organismo. Isso somente é possível se o fármaco, ao ser liberado de sua forma farmacêutica, se solubilizar nos fluidos biológicos do trato gastrointestinal.

Entende-se por taxa de dissolução, a quantidade de um soluto dissolvido em determinada unidade de tempo sob condições padronizadas de temperatura, composição do meio (solvente) e de interface sólido-líquido (HANSON e GRAY, 2004). A taxa de dissolução de um soluto em um solvente é governada por parâmetros físicos como área superficial do soluto, formato de suas partículas e solubilidade no solvente em questão.

Como teste de qualidade de medicamentos, o ensaio de dissolução é um teste físico destrutivo, em que o fármaco passa para a forma solúvel a partir de fragmentos e partículas formados durante o teste, originados da forma farmacêutica intacta, como acontece com os sólidos orais. O objetivo deste teste é mensurar a quantidade de princípio ativo dissolvida sob condições padronizadas de tempo, temperatura, composição e volume do meio de dissolução, sob um mecanismo de agitação específico (HANSON e GRAY, 2004).

1.2.1 O estabelecimento das bases físico-químicas da dissolução (1897 a 1960)

Em 1897, Noyes e Whitney conduziram os primeiros experimentos de dissolução, utilizando como solutos o ácido benzóico e o cloreto de chumbo, ambos compostos fracamente solúveis em água. Os pesquisadores notaram que a taxa de dissolução era proporcional a diferença entre a concentração da substância em um determinado tempo T (C_t) e sua concentração de saturação (C_s) no mesmo solvente (HANSON e GRAY, 2004; MARCOLONGO, 2003; BRANDÃO, 2008).

Matematicamente, a lei de Noyes-Whitney pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\frac{dC}{dt} = k (C_s - C_t) \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$\frac{dC}{dt}$ = taxa de dissolução

k = constante de dissolução

C_s = concentração de saturação

C_t = concentração do soluto no tempo T

$C_s - C_t$ = gradiente de concentração

Em 1900, Brunner e Tolloczko demonstraram que a taxa de dissolução também dependia da área e da estrutura da superfície do soluto, da velocidade de agitação do meio e do aparato utilizado no experimento. O modelo proposto, derivado da lei de Noyes e Whitney, passou, então, a incluir a área superficial do soluto, conforme a equação 2 (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

$$\frac{dC}{dt} = K_1 \cdot S \cdot (C_s - C_t) \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

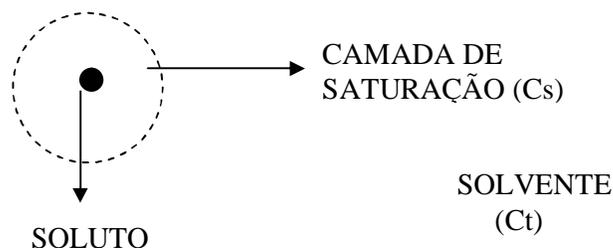
K_1 = constante de dissolução, sem considerar a influência da área superficial do soluto.

S = área superficial do soluto

Em 1904, Brunner e Nernst publicaram um trabalho, propondo o modelo da difusão em camada, para explicar o mecanismo de dissolução.

Uma partícula de um soluto interage inicialmente com o solvente na interface sólido-líquido. A concentração deste soluto nesta região é sua concentração de saturação (C_s), que forma uma fina camada estagnada ou filme (h), ao redor da partícula. O soluto dissolvido ao nível de interface, forma um filme que se difunde para o seio do solvente, sempre da região de maior concentração para a de menor, de acordo com a primeira Lei de Difusão de Fick (figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática do modelo de difusão em camada.



A difusão das moléculas do soluto é considerada um fator limitante, por ser um processo lento. Desta forma, Brunner e Nernst, incluíram o coeficiente de difusão (D), a espessura da camada de difusão (h) e o volume do meio de dissolução (V), como elementos importantes na taxa de dissolução de um soluto, conforme Equação 3 (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006; BRANDÃO, 2008).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{K_2 \cdot D \cdot S}{V \cdot h} (C_s - C_t) \quad \text{Equação 3}$$

Observa-se que a taxa de dissolução (equação 3) é influenciada pelo gradiente de concentração ($C_s - C_t$). Essa situação ocorre apenas em condições não *sink*. Entende-se como condição *sink*, aquela em que o volume do solvente é grande o suficiente, cerca de 5 a 10 vezes o volume necessário para se atingir a concentração de saturação, de modo que o gradiente de concentração ($C_s - C_t$) se reduz a constante C_s .

$$\frac{dC}{dt} = \frac{K_2 \cdot D \cdot S}{V \cdot h} C_s \quad \text{Equação 4}$$

Se a área superficial do soluto e o volume de solvente forem mantidos constantes, tem-se:

$$\frac{dC}{dt} = K \quad \text{Equação 5}$$

A constante K incorpora todas as constantes da equação 4. Desta forma, de acordo com a equação 5, a constante da taxa de dissolução em condições *sink* independe da concentração de soluto no solvente.

Apesar dos avanços da dissolução *in vitro* nas ciências de engenharia química, o conceito de dissolução nas ciências farmacêuticas apenas passou a ser abordado a partir da década de 1950, uma vez que se acreditava que a biodisponibilidade de um fármaco poderia ser determinada exclusivamente pela desintegração de um comprimido (HANSON e GRAY, 2004).

Muitos procedimentos *in vitro* para determinar o tempo de desintegração foram sugeridos. O primeiro compêndio oficial a introduzir o teste de desintegração para comprimidos foi a Farmacopéia Helvética (Suíça), em 1934. Apenas em 1950, o teste de desintegração tornou-se oficial na Farmacopéia Americana (United States Pharmacopoeia – USP XIV), para produtos de liberação imediata (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006). Este teste foi obrigatório para sólidos orais de liberação imediata, por mais de 40 anos (HANSON e GRAY, 2004).

Outros métodos foram desenvolvidos posteriormente com o objetivo de melhor mimetizar o comportamento de um comprimido *in vivo*. O fluido gástrico simulado foi utilizado como meio em testes de desintegração e o método de Filleborn, publicado em 1948, introduziu um estômago artificial simulando condições *in vivo* (pH, peristalse, presença de alimento). Desta forma, tornou-se claro, no início da década de 1950, que o teste de desintegração não era capaz de responder integralmente pela biodisponibilidade dos fármacos (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

1.2.2 Biodisponibilidade e dissolução de medicamentos (1950 a 1990)

Em 1951, Edwards verificou que quando o processo de absorção de um fármaco no trato gastrointestinal era rápido, o surgimento do fármaco no sangue estava diretamente relacionado à taxa de dissolução do fármaco na forma farmacêutica. Em 1957, Nelson foi o primeiro a relacionar explicitamente o nível sanguíneo de sais de teofilina administrados por via oral com sua taxa de dissolução *in vitro* (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

A partir da década de sessenta foi reconhecido o fato de que o teste de desintegração para comprimidos, não apresentava necessariamente uma correlação com a biodisponibilidade do fármaco (HANSON e GRAY, 2004).

O conceito de biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem farmacêutica, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (BRASIL, 1999; BRASIL, 2003).

Entre 1960 e 1970, muitos estudos foram realizados com o objetivo de demonstrar o efeito da dissolução sobre a biodisponibilidade de uma gama de fármacos. Um dos exemplos mais dramáticos de biodisponibilidade foi a fenitoína na Austrália e Nova Zelândia, em 1968. Quando o fabricante deste medicamento substituiu o excipiente sulfato de cálcio por lactose em comprimidos de liberação imediata, foi observado um grande número de pacientes com problemas de toxicidade causados pela fenitoína. O fato de a lactose ser muito mais hidrofílica do que o sulfato de cálcio favoreceu o aumento da taxa de dissolução da fenitoína. Conseqüentemente, os pacientes apresentaram maiores concentrações plasmáticas do fármaco, excedendo a estreita faixa terapêutica de 10 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Deste modo, a falta de padronização da biodisponibilidade dos medicamentos contribuiu para a introdução de especificações de dissolução para comprimidos e cápsulas em suas monografias farmacopéicas (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

Em 1970, a Farmacopéia Americana XVIII oficializou o primeiro teste de dissolução. O método 1, com o aparato cesta rotatória, foi introduzido nesta edição em seis monografias (HANSON e GRAY, 2004).

Em 1975, houve a introdução do método 2, empregando o aparato pás, pela Farmacopéia Americana XIX (HANSON e GRAY, 2004).

A partir de 1980, houve a oficialização do ensaio em diversos países. A Farmacopéia Americana (USP XX) apresentava 60 monografias incluindo o teste de dissolução (tabela 1).

Tabela 1 - Número de monografias na Farmacopéia Americana (USP) e no Formulário Nacional (NF) com especificação para o teste de dissolução ou teste de liberação (Adaptado de DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

EDIÇÃO/ANO	MONOGRAFIAS PARA FORMAS FARMACÊUTICAS DE LIBERAÇÃO	
	Imediata	Modificada
USP 18 – NF 13/1970	6	-
USP 19 – NF 14/1975	12	-
USP 20 – NF 15/1980	60	-
USP 21 – NF 16/1985	400	1
USP 22 – NF 17/1990	462	23
USP 23 – NF 18/1995	501	31
USP 24 – NF 19/2000	552	40
USP 29 – NF 24/2006	619	52

A substituição do teste de desintegração pelo ensaio de dissolução foi encorajado no *Pharmacopeial Forum*, em 1981, provavelmente porque o teste de desintegração apresentava pequena correlação estatística com a biodisponibilidade do medicamento (HANSON e GRAY, 2004). O teste de desintegração foi amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, para verificar a liberação do fármaco da sua forma farmacêutica, por se constituir em um teste de

baixo custo, rápido e de fácil execução. No entanto, observou-se que o teste em questão não era completamente adequado, uma vez que era possível que um comprimido rapidamente fragmentado em partículas menores não liberasse o fármaco totalmente ou na velocidade adequada para estar disponível e exercer seu efeito (MARCOLONGO, 2003).

Em 1988, a Farmacopéia Brasileira 4ª edição, oficializou o teste no Brasil.

1.2.3 A dissolução como ferramenta de prognóstico da absorção de sólidos orais

A absorção de fármacos é um processo complexo que depende de propriedades do fármaco tais como solubilidade e permeabilidade, de fatores da

formulação e de variáveis fisiológicas, tais como diferenças de permeabilidade regionais, pH, enzimas da mucosa e da luz do trato intestinal e motilidade intestinal. Apesar desta complexidade, várias abordagens quantitativa e qualitativa foram propostas para estimar a absorção do fármaco por via oral (DOKOUMETZIDIS e MACHERAS, 2006).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação e posterior dissolução (solubilização) em condições fisiológicas, e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrintestinal.

O Sistema de Classificação Biofarmacêutico, publicado em 1995 por Amidon e colaboradores (AMIDON et al, 1995), classifica um fármaco com base na sua solubilidade em água e permeabilidade intestinal, em quatro classes: alta solubilidade/alta permeabilidade (classe I), baixa solubilidade/alta permeabilidade (classe II), alta solubilidade/baixa permeabilidade (classe III) e baixa solubilidade/baixa permeabilidade (classe IV) (LINDENBERG, 2004).

A dissolução é o fenômeno em que um fármaco no estado sólido é liberado de sua forma farmacêutica de administração, entra em solução e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. Desta forma, as formas farmacêuticas sólidas e sólidos dispersos/suspensos em líquidos devem passar por um processo de dissolução nos fluidos biológicos, principalmente do trato gastrintestinal, para que o fármaco possa ser absorvido e passe para a circulação sistêmica (MARCOLONGO, 2003).

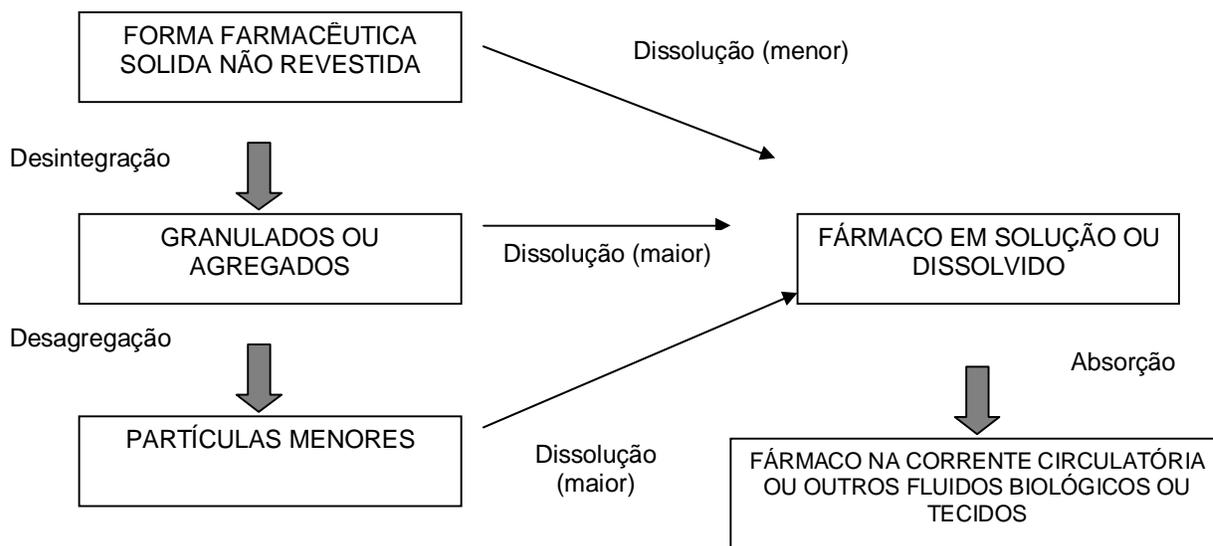
A dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* de formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI), considerando as etapas de liberação do fármaco da formulação e sua dissolução (etapas biofarmacêuticas).

Na figura 3, estão ilustrados os processos de dissolução de fármacos presentes em formas farmacêuticas sólidas não revestidas. Um comprimido após ser deglutido, inicia nos fluidos biológicos o processo de desintegração, em que a forma farmacêutica perde sua forma inicial, liberando granulados ou agregados.

Posteriormente, esses são reduzidos a partículas ainda menores (desagregação). A partir do momento em que as partículas se tornam menores, elas passam a apresentar uma área superficial maior, o que permite uma maior interação

entre as moléculas do fármaco e os fluidos do trato gastrointestinal, aumentando portanto, a solubilização, e conseqüentemente a dissolução do fármaco nesta etapa.

Figura 3 - Processos que ocorrem após a administração oral de formas farmacêuticas sólidas não revestidas.



1.2.4 O ensaio de dissolução na Indústria Farmacêutica

O ensaio de dissolução é um teste oficial preconizado nas farmacopéias para sólidos e semi-sólidos orais. O teste foi inicialmente desenvolvido para determinar a quantidade e a extensão da liberação de fármacos em formulações sólidas de liberação imediata (comprimidos e cápsulas). Recentemente, também tem sido empregado em formas farmacêuticas tais como pós, comprimidos mastigáveis, comprimidos sublinguais, chicletes, cápsulas moles gelatinosas, supositórios, adesivos transdérmicos, aerossóis e semi-sólidos (AZARMI et al, 2007).

O teste de dissolução é uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, com destaque nas áreas de pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade. Constitui-se em um teste crítico na avaliação da qualidade de medicamentos.

No controle de qualidade, o ensaio de dissolução é um dos testes mais importante na decisão de aprovação/reprovação de um medicamento (controle de qualidade do lote).

O ensaio de dissolução também é um indicador *in vitro* importante, monitorando os processos de fabricação após a aprovação do produto e minimizando o risco de falta de bioequivalência entre lotes.

O ensaio de dissolução é empregado na avaliação da qualidade do produto em função do tempo e das condições de armazenamento, ou seja, no estudo de estabilidade (BRASIL, 2005).

Além disso, é uma ferramenta fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novas formulações (desenvolvimento galênico) e otimização de processos (validação de processo). Permite identificar variáveis críticas na produção, escolhendo entre diferentes produtos e otimizando formulações e processos, antes do registro da nova fórmula farmacêutica (QURESHI e SHABNAM, 2001).

Na Garantia da Qualidade, o ensaio de dissolução está relacionado às exigências regulatórias. O teste também é útil para avaliar o impacto que mudanças em equipamentos, processos, locais de fabricação ou insumos podem ter sobre o produto (BRASIL, 2003b).

A comparação dos perfis de dissolução, por exemplo, é fundamental para evitar que todas as dosagens de um mesmo produto sejam submetidas a estudos de bioequivalência. Para o registro de uma concentração menor, deve-se apresentar perfil de dissolução nas condições descritas no Guia de Isenção de Estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2004).

1.2.5 Fatores que influenciam o ensaio de dissolução

Durante a década de 1970, muitas variáveis foram identificadas e estudadas, especialmente aquelas relacionadas ao equipamento e condições ambientais, a fim de assegurar a repetitividade do ensaio de dissolução (HANSON e GRAY, 2004).

O resultado do teste de dissolução pode ser afetado por fatores relacionados:

- a) ao fármaco;
- b) à formulação;
- c) ao equipamento;
- d) ao meio de dissolução;
- e) ao método analítico.

1.2.5.1 Fatores relacionados ao fármaco

A interferência do fármaco em um ensaio de dissolução deve ser avaliada durante a etapa de desenvolvimento galênico do medicamento.

A solubilidade do fármaco é um importante fator a ser estudado, sobretudo diante da possibilidade de existência de polimorfos do ativo com diferentes solubilidades. Além disso, fármacos no estado amorfo, normalmente, são mais solúveis do que os na forma cristalina e as formas anidras são mais solúveis do que as hidratadas.

O tamanho da partícula do fármaco também pode ser decisivo em relação ao ensaio de dissolução, uma vez que quanto menor o tamanho das partículas de um soluto, maior é sua área superficial, e, portanto, maior a taxa de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

1.2.5.2 Fatores relacionados à formulação

A interferência da formulação em um ensaio de dissolução também deve ser avaliada na etapa de desenvolvimento galênico do medicamento.

Praticamente, todos os excipientes envolvidos na formulação exercem influência na dissolução, retardando-a ou aumentando-a. Compostos hidrofóbicos, como os lubrificantes, retardam o processo de dissolução. Por outro lado, os desintegrantes, como o amido, aumentam a velocidade do processo de dissolução.

O processo de fabricação também pode comprometer a dissolução de um medicamento. A granulação por via úmida em relação a por via seca, favorece mais

a dissolução do fármaco por conferir características mais hidrofílicas à formulação. A força de compressão pode atuar retardando a dissolução por aumentar o tempo de desintegração do comprimido. A umidade a que os comprimidos são submetidos, durante a fase de manipulação, embalagem, armazenamento ou transporte pode aumentar a dureza do mesmo e reduzir o processo de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

1.2.5.3 Fatores relacionados ao equipamento

De acordo com Hanson e Gray, a excentricidade, o alinhamento do sistema de agitadores, a vibração, a velocidade de agitação, a temperatura e o posicionamento da haste são fatores importantes relacionados ao dissolutor (HANSON e GRAY, 2004), que devem ser verificados/monitorados tendo em vista uma possível interferência no resultado final do ensaio de dissolução (tabela 2).

A excentricidade está relacionada ao eixo de rotação da haste (cesta ou pá). Este deve coincidir em todos os pontos com o eixo central da cuba, sendo permitido um desvio de ± 2 mm de centralização. As hastes devem girar sem desviar deste eixo, sem excentricidade perceptível ou significativa.

Os desvios superiores ao citado causam um aumento na taxa de dissolução.

O alinhamento do sistema de agitadores deve ser verificado através do desvio medido pela inclinação da haste em relação ao eixo vertical da cuba de dissolução. O sistema de agitadores não deve desviar acima de 0,2 cm em relação ao eixo vertical do recipiente que está dentro da faixa de 2 mm de centralização, correspondendo à cerca de 1,5° de ângulo máximo de inclinação da haste.

A presença de vibração no sistema pode alterar o fluxo laminar e introduzir energia dinâmica indesejável, de forma a causar mudanças na dissolução de alguns produtos. Os equipamentos devem ser posicionados em bancadas niveladas e livres de vibração. Vibração de 0,2 a 0,9 mils, considerada um desvio comum, pode aumentar em até 10% o resultado do teste.

A velocidade de rotação influencia as características da interface (líquido/sólido), entre o meio de dissolução e a forma de dosagem. Variações de velocidade devem ser evitadas durante o teste, pois acelerações periódicas podem

causar turbulência no fluido e levar a resultados não esperados. A velocidade de rotação deve ser mantida dentro de limites de $\pm 4\%$ (tabela 2).

A temperatura afeta diretamente a solubilidade de um soluto. Considerando que a maioria dos processos de solubilização é endotérmico, uma elevação da temperatura do teste, tende a aumentar o resultado do ensaio. A temperatura especificada e adequada é de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

O posicionamento da haste refere-se a distância vertical da cesta ou pá em relação ao fundo do cuba. Esta deve ser igual a $2,5\text{ cm} \pm 0,2\text{ cm}$, ajustada a partir de gabaritos de posição.

1.2.5.4 Fatores relacionados ao meio de dissolução

Fatores relacionados ao meio de dissolução, tais como diferença de pH, presença de gases dissolvidos e volume do meio de dissolução (HANSON e GRAY, 2004), também podem interferir no resultado final do teste de dissolução (tabela 2).

Não deve haver variação de pH entre os meios em cada cuba de dissolução. Uma variação máxima de 0,05 unidade em relação ao especificado na monografia de cada produto é permitida.

A presença de gases no meio de dissolução pode alterar significativamente os resultados de percentual dissolvido da substância ativa. Eles provocam mudanças no movimento das partículas, causam turbulência no meio e diminuem o contato entre o líquido e o sólido formando bolhas na superfície da forma farmacêutica.

O volume do meio de dissolução deve ser mantido constante em cada cuba. A faixa especificada de variação de volume deve ser menor que 1%. Além disso, a cuba de dissolução deve permanecer coberta com a tampa apropriada durante todo o teste, para evitar a evaporação do meio.

Tabela 2 - Varáveis de um procedimento de dissolução e seus limites recomendados (HANSON e GRAY, 2004).

Variável	Desvio Máximo	Desvios comuns	Efeito do excesso	Controle
Excentricidade	± 2 mm (oficial) ± 0,75mm (ideal)	2 – 5 mm	+ 4 – 8%	Centralizar usando guias padrão
Vibração	0,1 mils	0,2 – 0,9 mils	+ 5 – 10%	Eliminar fonte
Alinhamento	1,5° do eixo perpendicular	2° - 7°	+ 2 – 25%	Ajustar o alinhamento
Centralização	± 2 mm	± 2 – 6 mm	± 2 – 13 %	Centralizar individualmente as cubas
Agitação	± 4 % oficial	± 10%	Linear	Fazer verificação
Gás dissolvido	Degaseificado	± 50%	Bolhas	Degaseificar
pH meio	± 0,05 unidades pH	> ± 0,05 unidades	± 10%	Calibrar aparelho
Evaporação	Não	2 – 5%	Linear	Cuba coberta
Temperatura	± 0,5 ± 0,1 (ótimo)	1 – 2 ° C	Linear	Monitorar cada cuba após o equilíbrio
Posição de amostragem	Oficial	± 0,5 cm	pequeno	Cuidado

1.2.5.5 Fatores relacionados ao método analítico

De acordo com Marcolongo, existem ainda fatores relacionados ao método analítico que devem ser observados a fim de evitar a interferência no resultado do teste de dissolução. Primeiramente, o método analítico deve estar validado. O ponto de amostragem deve ser respeitado (tabela 2). A amostra deve ser coletada a uma distância equidistante entre a superfície do meio de dissolução e o topo da cesta ou pá e não menos que 1 cm da parede da cuba. Além disso, os filtros utilizados não devem adsorver o fármaco e liberar partículas de material para a solução (MARCOLONGO, 2003).

1.3 INCERTEZA DE MEDIÇÃO DE ENSAIOS

O termo metrologia é definido no Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia como a ciência da medição, ou seja, a ciência do conjunto de operações que têm por objetivo determinar o valor de uma grandeza. A metrologia abrange todos os aspectos teóricos e práticos relativos às medições, quaisquer que sejam as incertezas, em qualquer campo da ciência ou da tecnologia (INMETRO, 2007).

Entende-se por incerteza de medição, o parâmetro, que associado ao resultado de uma medição, caracteriza a dispersão dos valores, fundamentadamente atribuídos a um mensurando. A incerteza de medição pode ser, por exemplo, um desvio padrão, a metade de um intervalo correspondente a um nível de confiança estabelecido etc (INMETRO, 2007).

A incerteza de medição compreende, em geral, muitos componentes. Estes podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados de séries de medições (desvios padrão experimentais) ou podem ser avaliados por meio de distribuição de probabilidades assumidas, baseadas na experiência ou em outras informações. O resultado da medição é a melhor estimativa do valor do mensurando e todos os componentes da incerteza contribuem para a dispersão (INMETRO, 2007).

A medição em química analítica é uma fase entre muitas operações unitárias envolvidas durante uma análise química. Seu resultado depende, portanto, de como estas operações foram realizadas e da aplicação de conceitos de Boas Práticas de Laboratório (BPL). As BPL evitam operações desnecessárias e reforçam os cuidados durante as etapas críticas (ALVES e MORAES, 2003).

De acordo com Filho, as etapas de um ensaio químico (figura 4) podem ser didaticamente divididas em quatro barreiras, que devem ser controladas (FILHO, 2003).

A primeira barreira “Confiabilidade instrumental” refere-se à qualificação instrumental de todos os instrumentos críticos usados no ensaio. O equipamento é um sistema analítico que contém os instrumentos responsáveis por alguma medição característica; o instrumento é o dispositivo responsável pela medida de alguma variável crítica. O conceito de instrumento crítico é um ponto chave na definição do sistema da qualidade, isto é, não é o instrumento, mas sim, a sua participação no ensaio é que deve ser ponderado.

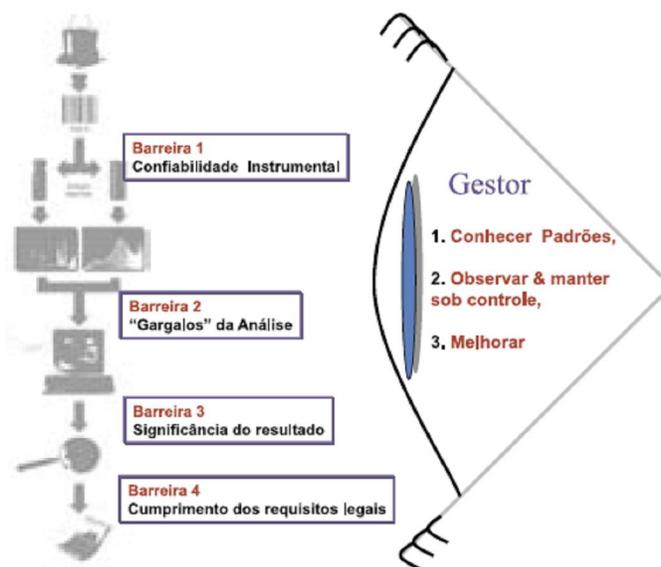
A segunda barreira refere-se aos “Procedimentos críticos na execução da metodologia do ensaio”, ou seja, refere-se ao controle de etapas críticas do ensaio. A medida da percentagem de recuperação da substância em uma amostra testemunha fortificada é, por exemplo, um parâmetro fundamental a ser conhecido e controlado.

A “Significância do resultado”, terceira barreira, refere-se à interpretação dos dados gerados no ensaio, por profissional experiente e conhecedor de todos os passos da análise.

Finalmente, tem-se o “Cumprimento de requisitos legais”, quando os dados gerados no ensaio e contidos no relatório de análise são confrontados contra algum valor máximo ou mínimo exigidos legalmente.

A confiabilidade metrológica requer procedimentos, rotinas e métodos apropriados. Em laboratórios de análises químicas, a confiabilidade metrológica é a garantia da qualidade visando à credibilidade técnica das medidas obtidas (BRANDÃO, 2008).

Figura 4 - Sistema de Gestão no Laboratório (FILHO, 2003).



Com o objetivo de especificar as principais fontes de incertezas e a forma de apresentar os resultados calculados, o INMETRO, baseado na ISO 17025:2001, elaborou a Norma NIT-DICLA-033, que estabelece a "Política para implementação da estimativa de incerteza em laboratórios de ensaio".

Na avaliação da incerteza são necessárias a identificação e a quantificação dos efeitos dos parâmetros que influenciam a incerteza global. Para isso é fundamental o conhecimento do procedimento de medição e das incertezas associadas a cada um dos fatores que influenciam o resultado (INMETRO, 2007).

O processo de determinação da incerteza da medição deve contemplar:

- Especificação do mensurando
- Identificação das fontes de incertezas padronizadas
- Quantificação dos componentes de incerteza
- Cálculo da incerteza combinada
- Cálculo do fator de abrangência (k)
- Cálculo da incerteza expandida

1.3.1 Especificação do mensurando

De acordo com o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, mensurando é o objeto da medição, a grandeza específica submetida à medição (INMETRO, 2007).

Nesta etapa, devem ser definidos todos os passos envolvidos na medição para se obter o valor do mensurando. A função modelo f representa o procedimento de medição. É a expressão matemática que define o mensurando (grandeza de saída Y) em função das grandezas de entrada (X_i) relacionadas.

$$Y = f(X_i)$$

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n).$$

Onde:

Y é a grandeza de saída;

f é a função de transferência (modelo matemático do experimento);

X_i , $i = 1, \dots, n$ são grandezas de entrada.

1.3.2 Identificação das fontes de incerteza padronizadas

O objetivo desta etapa é enumerar as fontes de incerteza para cada um dos parâmetros que afetam o valor do mensurando. Esta etapa pode ser simplificada com a utilização do diagrama de causa e efeito, ferramenta gráfica para identificar, organizar e apresentar de modo estruturado as causas e problemas em processos.

1.3.3 Quantificação dos componentes de incerteza

Segundo o INMETRO (2003b), a incerteza padronizada $u(y)$, associada aos valores de entrada, deve ser estimada a partir do conhecimento das grandezas de entrada.

As grandezas de entrada X_i podem ser divididas em duas categorias de acordo com a maneira pela qual o valor da grandeza e sua incerteza associada tenham sido determinados (métodos de avaliação do Tipo A ou do Tipo B).

A incerteza padrão do tipo A é avaliada através de métodos estatísticos. Para a determinação deste tipo de incerteza deve-se executar uma série de repetições sob as mesmas condições.

A incerteza do tipo A para uma grandeza de entrada X_i deve ser estimada a partir de n ($n > 1$) observações repetidas independentes $X_{i,n}$. A incerteza padrão $u(x_i)$ de sua estimativa é $u(x_i) = s(x_i)$, em que $s^2(x_i)$ deve ser calculado conforme equação 6.

$$s^2\left(\bar{x}_i\right) = \frac{s^2\left(x_i\right)}{n} \quad \text{Equação 6}$$

A incerteza padrão do tipo B é avaliada por outro método que não o estatístico. Neste caso, a incerteza padrão $u(x_i)$ é avaliada por julgamento científico, baseando-se em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade de X_i , tais como especificações do fabricante, dados provenientes de calibração, manuais ou publicações.

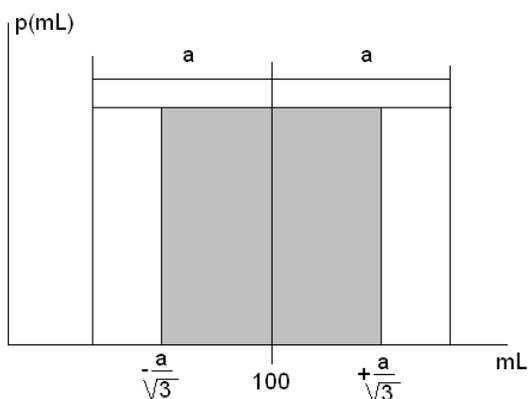
É importante destacar os seguintes casos:

- Quando apenas um único valor é conhecido para a grandeza X_i , por exemplo uma única medida, um valor resultante de uma medição anterior, um valor de referência da literatura, ou um valor de correção, este valor será utilizado no lugar de x_i . A incerteza padrão $u(x_i)$ associada a x_i , deve ser adotada quando fornecida. Caso contrário, ela deve ser calculada a partir de dados de incertezas que não sejam contestados. Se dados dessa natureza não estão disponíveis, deve-se avaliar a incerteza com base na experiência.
- Quando se supõe uma distribuição de probabilidade para a grandeza X_i , baseada na teoria ou na experiência, então o valor esperado e a raiz quadrada da variância desta distribuição, devem ser considerados como a estimativa x_i e como a incerteza padrão associada $u(x_i)$ respectivamente.

- Quando somente os limites (superior e inferior), (+a) e (-a), possam ser estimados para o valor da grandeza X_i (por exemplo, uma faixa de temperatura) pode-se supor, apenas, que é igualmente provável que X_i esteja em qualquer lugar dentro deste intervalo, com uma distribuição de probabilidade constante (distribuição de probabilidade retangular). Se a diferença entre os valores limites for denotada por 2a (figura 5), tem-se:

$$u(x_i) = \frac{1}{3} a^2 \quad \text{Equação 7}$$

Figura 5 - Distribuição retangular.

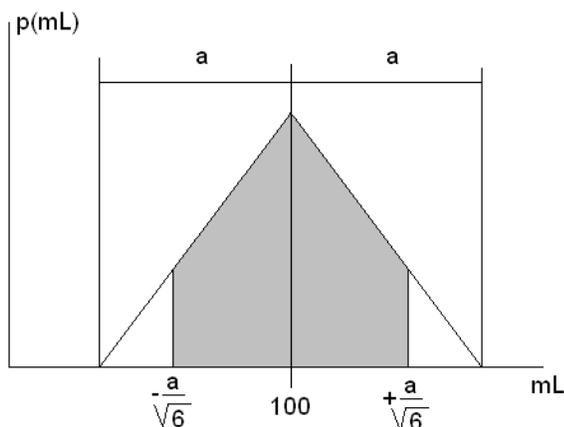


A distribuição retangular é uma descrição razoável, em termos de probabilidade, do conhecimento inadequado sobre a grandeza de entrada X_i na ausência de qualquer outra informação que não os limites de variabilidade.

Em muitos casos, é mais realista esperar que os valores perto dos limites sejam menos prováveis do que os próximos ao ponto médio, sendo, então, razoável supor uma distribuição triangular (figura 6), onde a ocorrência esperada dos valores é no centro do intervalo entre (+a) e (-a). Neste caso, tem-se:

$$u(x_i) = \frac{1}{\sqrt{6}} a \quad \text{Equação 8}$$

Figura 6 - Distribuição triangular.



1.3.4 Cálculo da incerteza combinada

A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada da soma quadrática das incertezas padrão relativo de todos os componentes que contribuem para estimativa da incerteza de medição (método das incertezas relativas), conforme ilustrado na equação 9.

$$\left(\frac{u_c}{C}\right)^2 = \left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2 \quad \text{Equação 9}$$

Esse valor não é adotado como real, pois representa uma probabilidade estatística de aproximadamente 68% de se encontrar o erro de medição, e assim não constitui uma boa aproximação. Para se determinar a incerteza de medição com nível de confiabilidade maior, deve-se calcular a incerteza de medição expandida, cujo valor estará dentro de uma confiabilidade de 95% (INMETRO, 2003b).

1.3.5 Cálculo do fator de abrangência (k)

O fator de abrangência é um parâmetro multiplicador da incerteza padrão combinada $u_c(y)$ para obtenção da incerteza expandida $U(y)$.

O cálculo do fator de abrangência k (tipicamente na faixa de 2 a 3) é obtido da distribuição t-Student, a partir dos graus de liberdade efetivos (V_{eff}) calculados pela fórmula de Welch- Satterthwaite, a partir das incertezas padrão $u(x_i)$, da incerteza combinada $u_c(Y)$, dos grau de liberdade associados a cada uma das estimativas x_i e da probabilidade de abrangência p estipulada (INMETRO, 2003b). É necessário determinar o grau de liberdade para cada grandeza de entrada.

- Para incerteza do tipo A temos: $v_i = n - 1$
- Quando se utiliza regressão linear, temos: $v_i = n - 2$
- Para incertezas do tipo B podemos supor: $v_i \rightarrow \infty$

O número de graus de liberdade efetivo (V_{eff}) é obtido pela fórmula:

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(Y)}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4(Y)}{v_i}} \quad \text{Equação 10}$$

Em que :

u_c = incerteza combinada;

u_i = incertezas individuais;

v_i = graus de liberdade;

V_{eff} = graus de liberdade efetivos.

1.3.6 Cálculo da incerteza expandida

A Incerteza Expandida $U(Y)$ é determinada para fornecer um maior intervalo para o resultado do que um desvio padrão combinado, conseqüentemente, uma maior probabilidade de inclusão do valor do mensurando.

A Incerteza Expandida é o resultado do produto entre a incerteza combinada e o fator de abrangência, conforme equação abaixo (INMETRO, 2003b).

$$U(Y) = K * u_c (Y) \quad \text{Equação 11}$$

O resultado da medição será então representado como a seguir:

$$Y = y \pm U \quad \text{Equação 12}$$

2 JUSTIFICATIVA

A Pirazinamida 500 mg é um medicamento tuberculostático de interesse em saúde pública. Consta na lista da Portaria nº 978, de 16 de maio de 2008, que dentre outras finalidades, dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde.

O Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica (LAQFA) é um Laboratório Oficial, que fabrica e fornece comprimidos de Pirazinamida 500 mg para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) do Ministério da Saúde.

A Pirazinamida 500 mg é, portanto, um medicamento de importância estratégica no PNCT, que em seu plano de ação destaca a necessidade de implantação e manutenção do controle de qualidade dos fármacos antituberculose.

De acordo com a RDC nº. 17/2007 e com a RDC nº. 135/2003, deve-se assegurar que os medicamentos apresentem garantia de segurança, eficácia e qualidade. Neste contexto, o ensaio de dissolução permite avaliar, em laboratório, a performance de um produto, ao demonstrar que fatores tecnológicos e de formulação podem influenciar a liberação do fármaco em uma forma farmacêutica sólida, interferindo na observância do efeito terapêutico (eficácia). A biodisponibilidade do fármaco pode ser, em muitos casos, associada aos resultados das provas de dissolução.

Considerando a necessidade de o ensaio de dissolução apresentar credibilidade técnica nas medidas efetuadas, seja pela extensa gama de fatores que influenciam o teste, seja pela obrigatoriedade do cálculo da determinação da incerteza de medição para ensaios analíticos e calibração de instrumentos no contexto da ISO 17025 (item 5.4.6), ou ainda, pela importância irrefutável do ensaio de dissolução para a vigilância sanitária de produtos, justifica-se este trabalho, que contribuirá para a eficiência e confiabilidade das informações geradas a partir do procedimento de dissolução de Pirazinamida 500 mg, produto de interesse estratégico à Política de Saúde Nacional.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a confiabilidade e a credibilidade técnica dos resultados gerados a partir do ensaio de dissolução de Pirazinamida 500 mg Linha LAQFA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Construir diagramas de causa e efeito, com a finalidade de identificar os fatores que contribuem para a incerteza das medições no ensaio de dissolução de Pirazinamida 500 mg no Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica.

Calcular a incerteza expandida do resultado do percentual de substância ativa, pirazinamida, dissolvida no meio dissolutor.

Determinar os principais fatores que contribuem para a incerteza das medições com a finalidade de assegurar a confiabilidade dos resultados.

4 METODOLOGIA

O estudo da avaliação da incerteza de medição do resultado do ensaio de dissolução de comprimidos de pirazinamida 500 mg foi realizado na Seção de Controle Físico-Químico do Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica (LAQFA) e no Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS). A parte experimental deste trabalho foi conduzida no LAQFA enquanto o levantamento de dados na literatura, a identificação das fontes de incerteza do ensaio de dissolução, a determinação da incerteza expandida e avaliação da contribuição das fontes de incerteza na incerteza global foram realizados no INCQS.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Método analítico

O ensaio de dissolução foi realizado de acordo com o método preconizado na Farmacopéia Brasileira IV edição, 2002, página 207.1.

4.1.1.1 Parâmetros do teste de dissolução

O ensaio de dissolução de comprimidos de pirazinamida 500 mg foi realizado utilizando o aparato número 2 (pá) a 50 rpm.

O meio de dissolução empregado foi 900 mL de água destilada em cada uma das seis cubas de dissolução.

A temperatura do meio foi ajustada para $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

O tempo do ensaio foi de 45 minutos.

4.1.1.2 *Preparo da Solução padrão*

Cerca de 20,0 mg de padrão de referência de pirazinamida foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 50 mL de água destilada ao balão, sendo este posteriormente submetido ao ultrassom por 10 minutos, até a completa dissolução. Completou-se o volume com água destilada, obtendo uma solução padrão estoque de pirazinamida (0,2 mg mL⁻¹).

Em seguida, Foram transferidos 5,0 mL da solução padrão estoque para balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado com água destilada, a fim de obter uma solução padrão trabalho de pirazinamida com aproximadamente 10 µg mL⁻¹ (0,001 % p/v).

A absorvância da solução padrão foi determinada em 268 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm e água destilada para ajuste do zero.

4.1.1.3 *Preparo da Solução Amostra*

Para a realização do ensaio, foram selecionados vinte quatro comprimidos de Pirazinamida 500 mg, amostra necessária para execução do teste em três estágios, no caso de necessidade.

Após o ajuste de todos os parâmetros do teste, conforme item 4.1.1.1., seis comprimidos foram adicionados às respectivas cubas de dissolução e o ensaio iniciado.

Após 45 minutos, foram retiradas e filtradas alíquotas de 15 mL de cada cuba de dissolução. Em seguida, 2,0 mL de cada filtrado foram transferidos para seis balões volumétricos de 100 mL. Foi utilizada água destilada para completar o volume nos balões, a fim de obter as soluções amostra para leitura.

As absorvâncias das soluções amostra foram determinadas em 268 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm e água destilada para ajuste do zero.

4.1.1.4 Critério de Aceitação do Teste

De acordo com o método preconizado na monografia de análise de Pirazinamida Comprimidos da Farmacopéia Brasileira IV edição, para aprovação no estágio E1, cada comprimido não deve dissolver menos do que 80% do valor declarado do fármaco, ou seja, no mínimo 80% de 500 mg de pirazinamida deve ser encontrado.

O teste deve ser conduzido ao estágio E2 caso o limite estabelecido para o estágio E1 não seja alcançado. No estágio E2 a média das doze amostras (seis comprimidos de cada estágio - E1 e E2) não deve ser menor do que 75% e cada comprimido não deve dissolver menos do que 60%.

O teste deve ser repetido com mais doze comprimidos (estágio E3) se os limites estabelecidos para os estágios E1 e E2 não forem alcançados. No estágio E3 a média das vinte e quatro amostras não deve ser menor do que 75%, não mais do que dois comprimidos devem dissolver menos do que 60% e cada comprimido não deve dissolver menos do que 50%

4.1.2 Amostras de pirazinamida 500 mg.

A população estudada constituiu-se de amostra contendo 200 comprimidos de Pirazinamida 500 mg (Lote 001), fabricado no LAQFA em setembro de 2009.

4.1.3 Equipamentos, padrões e reagentes utilizados.

Na realização do ensaio de dissolução foram utilizados os equipamentos, listados na Tabela 3.

Tabela 3 – Equipamentos utilizados na parte experimental do estudo.

Equipamento	Marca	Modelo
Dissolutor	Hanson	SR8-plus
Amostrador automático	Hanson	Autoplus Multifill
Sistema de Purificação de Água	Millipore	Elix 10 UV
Preparador de meio	Hanson	Media Mate
Balança analítica	Mettler Toledo	AG204
Espectrofotômetro UV-VIS	Perkin Elmer	Lambda 25

O meio de dissolução, água destilada, foi obtido a partir do sistema de purificação de água Millipore. O meio de dissolução foi aquecido, desaerado e dispensado nas cubas de dissolução automaticamente pelo preparador de meio de dissolução Hanson (tabela 3).

O padrão primário de Pirazinamida USP (lote H0G198 teor 99,5%) e os comprimidos utilizados nos testes foram pesados em balança analítica Mettler Toledo com precisão de 0,1 mg.

As soluções amostra e padrão foram submetidas à leitura na região do ultravioleta no espectrofotômetro UV-VIS Perkin Elmer.

4.1.4 Cálculos

A partir das leituras de absorvâncias encontradas no ensaio de dissolução, foi calculado o percentual expresso em relação à quantidade declarada de pirazinamida no comprimido. Para facilitar o processamento e os cálculos estatísticos, os resultados foram repassados para planilha eletrônica elaborada no programa Excel®.

4.1.5 Determinação da incerteza de medição do ensaio de dissolução de Comprimidos de Pirazinamida 500 mg

O cálculo da incerteza de medição do resultado do ensaio de dissolução de comprimidos de Pirazinamida 500 mg foi realizado segundo o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (INMETRO, 2003b) e segundo o POP 65.1120.061 (INCQS, 2008).

A metodologia de determinação de incerteza está esquematizada na figura 7 (BUCHMANN e SARKIS, 2002).

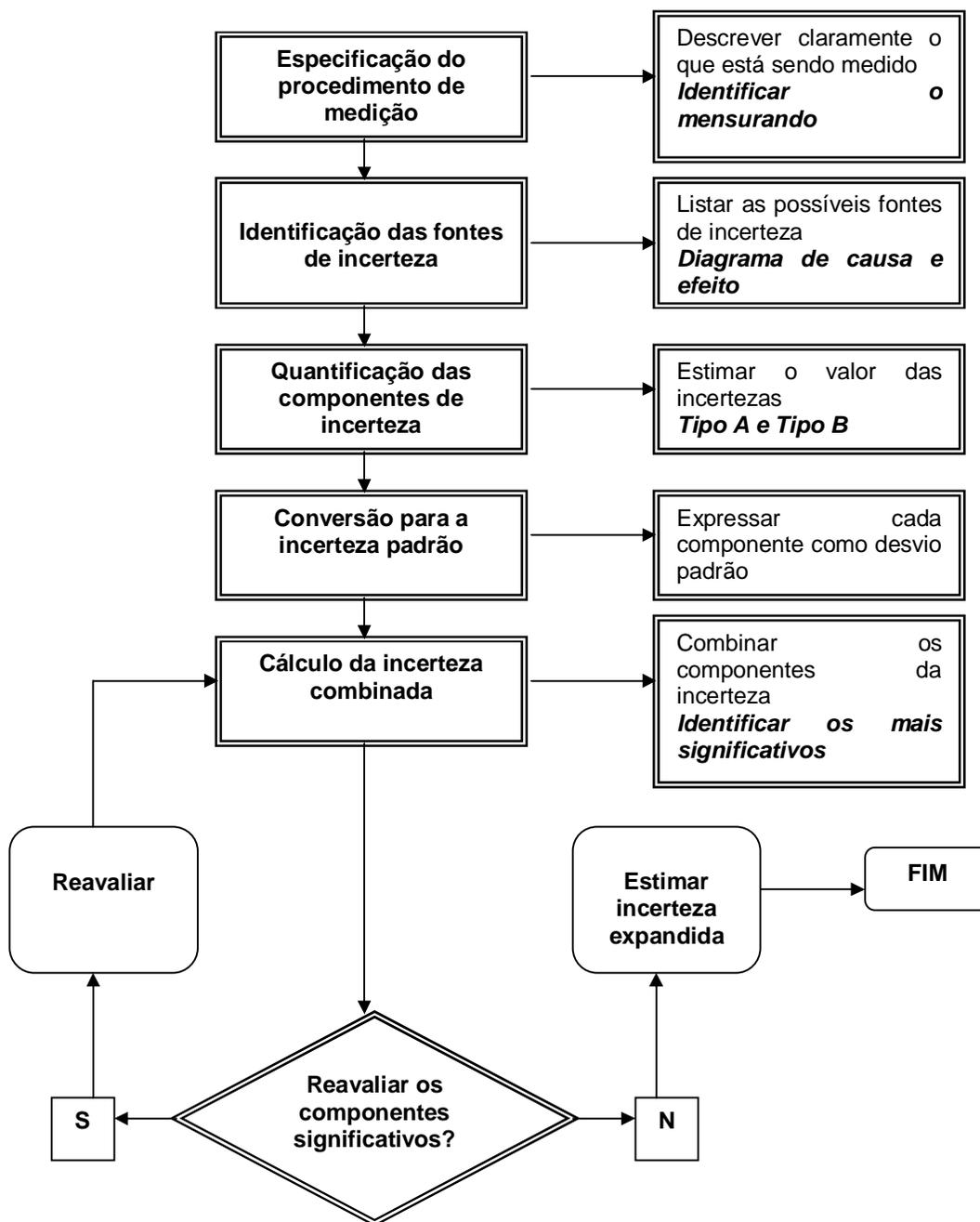
4.1.5.1 Especificação do mensurando

A determinação da incerteza de medição iniciou-se com a especificação do mensurando. Para isso, foi construído um fluxograma do método de análise e estabelecida a expressão matemática de obtenção da grandeza do mensurando a partir das variáveis de entrada.

4.1.5.2 Identificação das fontes de incerteza padronizadas

As fontes de incerteza padronizadas foram identificadas a partir das variáveis de entrada levantadas na etapa anterior e do conhecimento técnico do ensaio de dissolução. As fontes de incerteza foram organizadas em um diagrama de causa e efeito.

Figura 7 - Sistemática adotada para a avaliação da incerteza de medição.



4.1.5.3 - Quantificação dos componentes de incerteza

As fontes de incerteza foram classificadas em Tipo A e Tipo B, antes de proceder a determinação das incertezas padronizadas $u(x_i)$.

4.1.5.4 - Cálculo da incerteza combinada

A incerteza combinada foi obtida utilizando-se o método das incertezas relativas.

4.1.5.5 - Cálculo do fator de abrangência (k)

O fator de abrangência k foi calculado a partir da distribuição t-Student ($\alpha = 0,05$), após o cálculo dos graus de liberdade efetivos (V_{eff}).

4.1.5.6 - Cálculo da incerteza expandida

A Incerteza Expandida $U(Y)$ foi determinada para o ensaio realizado, a partir do produto entre a incerteza combinada e o fator de abrangência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DE COMPRIMIDOS DE PIRAZINAMIDA 500 MG

5.1.1 Especificação do mensurando

O mensurando do ensaio de dissolução (Y) consiste no percentual de pirazinamida dissolvida em relação ao valor declarado no comprimido (500 mg).

A figura 8 apresenta, esquematicamente, as etapas envolvidas no procedimento do ensaio. Observa-se que o objeto da medição (Y) não é obtido diretamente a partir de uma medida, mas por meio de uma expressão matemática, em que as variáveis de entrada (X_i) estão relacionadas aos processos de pesagem, pipetagem e diluição, ao padrão de referência utilizado, às leituras espectrofotométricas no ultravioleta e ao ensaio de dissolução em si.

A expressão matemática que especifica o mensurando deste ensaio está descrita na equação 13.

$$\frac{A_{am} \times C_{pd} \times 100}{A_{pd} \times C_{am}} = Y = \% \text{ da quantidade declarada de pirazinamida dissolvida em 45 minutos.} \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

A_{am} = leitura da absorvância da solução amostra

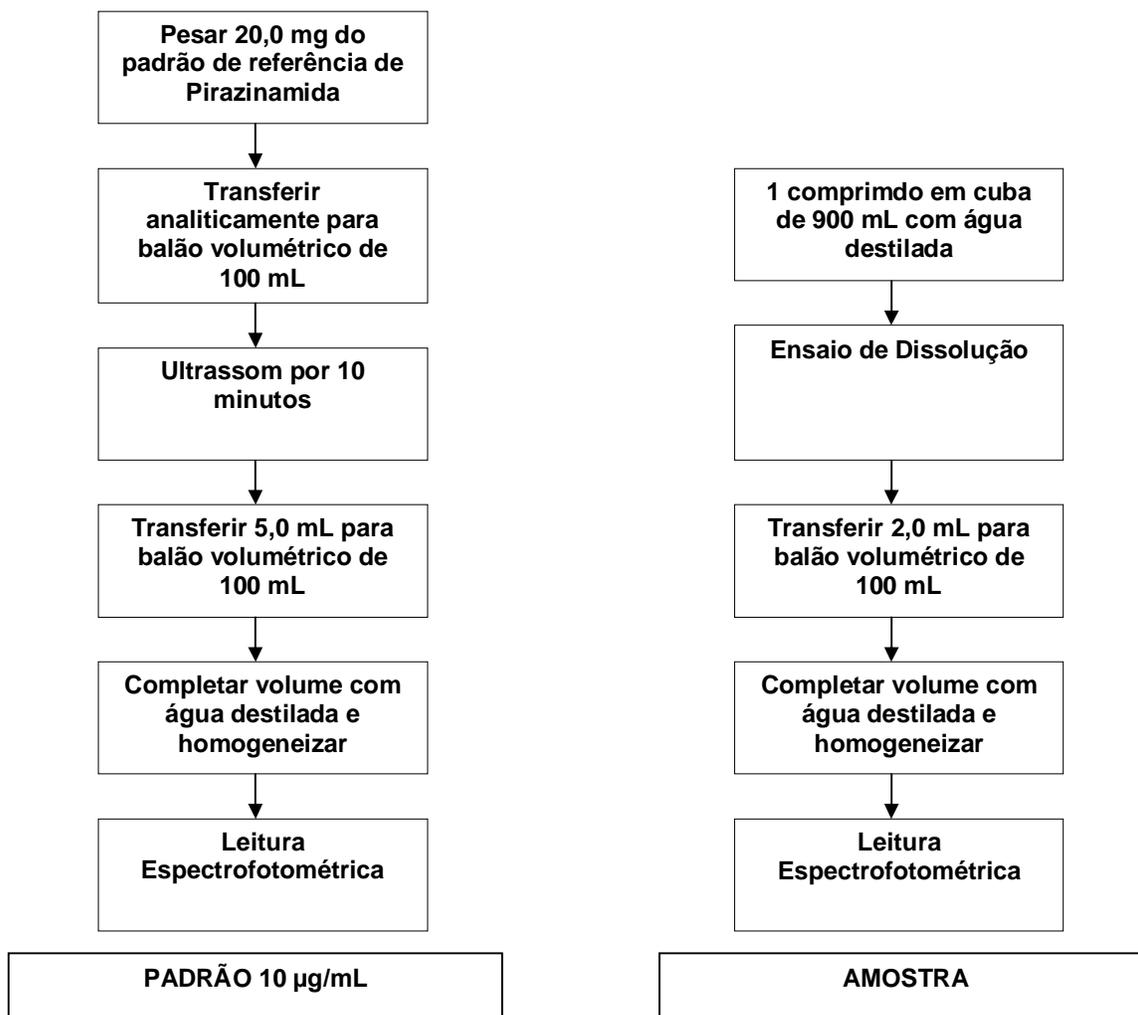
A_{pd} = leitura da absorvância da solução do padrão de trabalho

C_{pd} = concentração da solução padrão de trabalho (mg mL⁻¹)

C_{am} = concentração teórica da amostra, considerando 100% do valor declarado

A massa e a pureza do padrão, as vidrarias volumétricas utilizadas na preparação das soluções padrão e amostra e as leituras espectrofotométricas do padrão e das amostras foram as variáveis de entrada iniciais (X_i), definidas nesta etapa.

Figura 8 - Representação esquemática do ensaio de dissolução de pirazinamida, segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição.



5.1.2- Identificação das fontes de incerteza padronizadas

O valor da concentração do padrão de trabalho depende da massa de padrão de pirazinamida, pesada em balança analítica, e das diluições executadas. Neste estudo, identificou-se que a incerteza relativa à massa do padrão depende da incerteza da pureza do mesmo e da incerteza da temperatura, calibração e repetitividade da balança analítica, na faixa de pesagem de 20 mg. Para as diluições executadas, foram identificadas as incertezas relacionadas à variação de

temperatura durante as atividades de pipetagem e de aferição de volume, à calibração e à repetitividade na aferição de volume das vidrarias volumétricas.

A incerteza relativa da concentração teórica da amostra depende das incertezas relacionadas à variação de temperatura durante as atividades de pipetagem e de aferição de volume, à calibração e à repetitividade na aferição de volume das vidrarias volumétricas.

A incerteza relativa da leitura de absorvância da solução padrão de trabalho e das soluções amostra dependem da incerteza relacionada à repetitividade de leitura de ambas as soluções em 268 nm. À incerteza da leitura de absorvância da solução amostra foi incluída a contribuição da incerteza relativa à homogeneidade do ativo no lote em análise, a partir da estimativa obtida após a realização do ensaio de uniformidade de conteúdo.

O instrumental da dissolução também contribui na incerteza da porcentagem de pirazinamida no ensaio de dissolução

5.1.3 Quantificação dos componentes de incerteza e cálculo da incerteza combinada

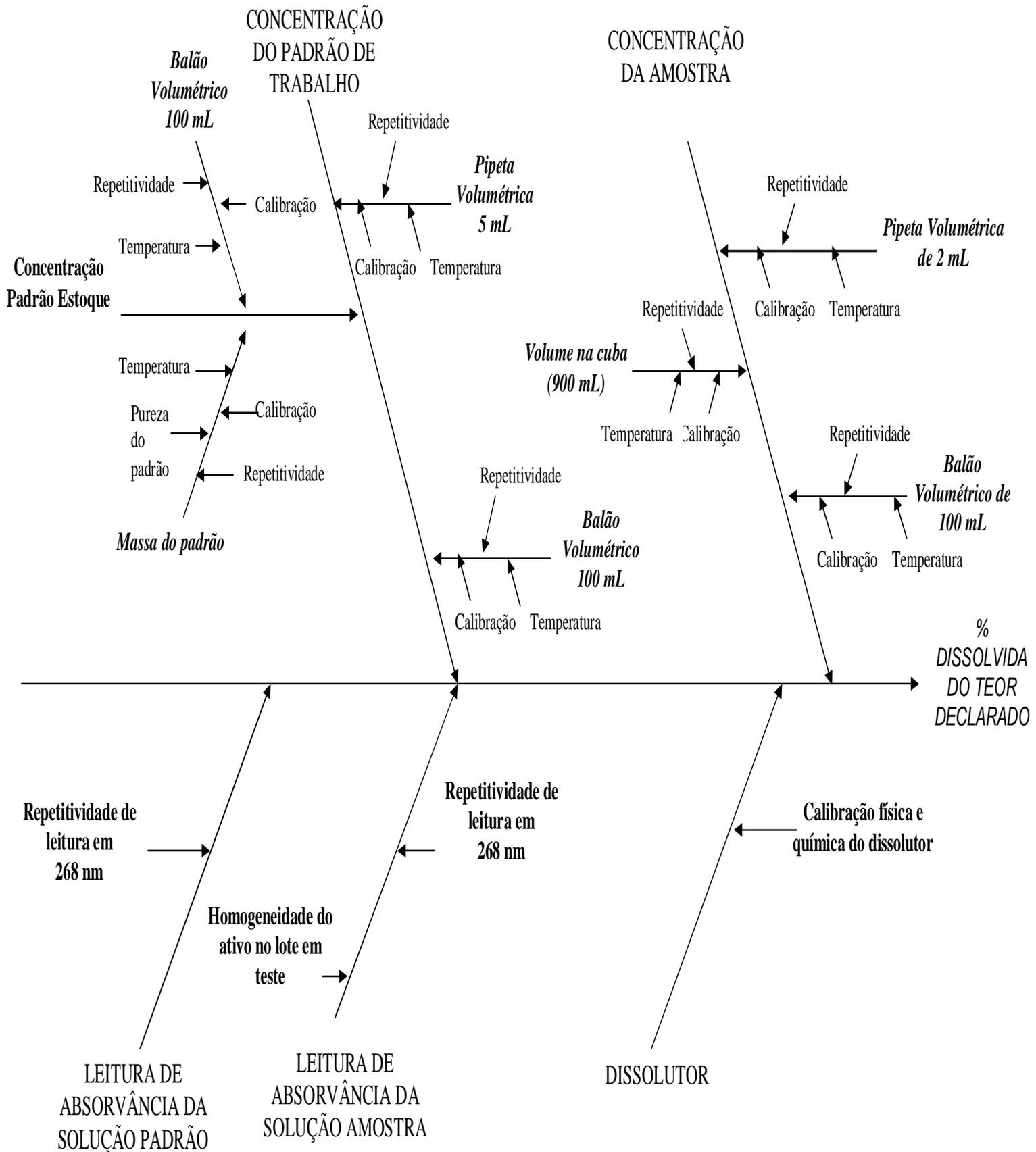
a) Concentração da solução padrão de trabalho

A tabela 4 apresenta as incertezas padrão, combinada e relativa da pureza do padrão, da massa pesada de padrão e dos volumes dos balões e pipetas volumétricos, utilizados na diluição do mesmo (concentração da solução padrão de trabalho).

A incerteza da pureza do padrão foi estimada em 0,005, ou seja, 0,5%, considerando que a substância química de referência utilizada foi o padrão primário de Pirazinamida USP.

As incertezas de calibração da balança, dos balões volumétricos de 100 mL e da pipeta volumétrica de 5 mL foram estimadas a partir de dados consultados nos respectivos certificados de calibração.

Figura 9 – Diagrama de causa e efeito das fontes de incerteza no ensaio de dissolução de pirazinamida.



A repetitividade da balança analítica, na faixa de pesagem de 20 mg, foi determinada a partir de 10 leituras de um peso padrão de 20 mg. Os resultados encontrados estão na tabela 5.

A repetitividade na aferição de volume das vidrarias foi estimada em 0,05 mL para o balão de 100 mL e em 0,0025 mL para a pipeta de 5 mL (BRANDÃO, 2008).

A incerteza da temperatura no volume foi estimada, considerando o volume em questão, 100 mL ou 5 mL, o fator de expansão da água ($0,00013\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}\text{ mL}^{-1}$) e uma variação máxima de 5 °C na temperatura ambiente durante as aferições de volume.

Tabela 4 – Concentração do padrão de trabalho: cálculo das incertezas padrão, combinada e relativa.

	Valor da grandeza	u (incerteza)	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão
PUREZA DO PADRÃO <i>Incerteza relativa</i>	0,995	0,005	Retangular	1,73205	0,00289 0,00290
MASSA DO PADRÃO (mg) Calibração (balança) Repetitividade (balança) Temperatura (ambiente) <i>u_c (massa)</i> <i>Incerteza relativa</i>	20,1	0,00020 0,10750 0,00001	Normal Normal Retangular	2 3,16228 1,73205	0,001 0,03399 0,00001 0,03401 0,00169
BALÃO VOLUMÉTRICO DE 100 mL (Solução Estoque) Calibração Repetitividade de aferição Temperatura <i>u_c (balão 100 mL)</i> <i>Incerteza relativa</i>	100	0,020 0,05 0,065	Normal Retangular Retangular	2 1,73205 1,73205	0,010 0,02887 0,03753 0,04839 0,00048
PIPETA VOLUMÉTRICA 5 mL Calibração Repetitividade de aferição Temperatura <i>u_c (pipeta 5 mL)</i> <i>Incerteza relativa</i>	5	0,010 0,0025 0,00325	Normal Retangular Retangular	2 1,73205 1,73205	0,005 0,00144 0,00188 0,00553 0,00111
BALÃO VOLUMÉTRICO DE 100 mL (Solução de Trabalho) Calibração Repetitividade de aferição Temperatura <i>u_c (balão 100 mL)</i> <i>Incerteza relativa</i>	100	0,020 0,05 0,065	Normal Retangular Retangular	2 1,73205 1,73205	0,010 0,02887 0,03753 0,04839 0,00048
U FINAL COMBINADA INCERTEZA RELATIVA					0,00004 0,00360

Tabela 5 – Repetitividade da balança analítica AG 204 – Mettler Toledo.

Pesadas	Massa (mg)
1	19,9
2	19,9
3	19,8
4	19,7
5	19,8
6	19,7
7	19,7
8	19,7
9	19,6
10	19,6
Média (mg)	19,74
Desvio padrão (mg)	0,10750
Incerteza	0,03399

b) Concentração teórica da amostra

A tabela 6 apresenta as variáveis relacionadas à concentração teórica da amostra e as incertezas padrão, combinada e relativa do volume na cuba de dissolução e da vidraria volumétrica utilizada na diluição da amostra.

As incertezas de calibração do balão volumétrico de 100 mL e da pipeta volumétrica de 2 mL foram estimadas a partir de dados consultados nos respectivos certificados de calibração, como mencionado anteriormente.

A repetitividade de avolumação das vidrarias volumétricas foi estimada em 0,05 mL para balão 100 mL e em 0,0025 mL para pipeta de 2 mL (BRANDÃO, 2008), como mencionado anteriormente. A incerteza do volume do meio de dissolução na cuba (900 mL) foi estimada em 1 mL.

A incerteza da temperatura no volume foi estimada, considerando o volume em questão (900 mL, 100mL ou 5 mL), o fator de expansão da água ($0,00013 \text{ } ^\circ\text{C}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) e uma variação máxima de $5 \text{ } ^\circ\text{C}$ na temperatura ambiente durante as aferições de volume.

Tabela 6 – Concentração da solução amostra: cálculo das incertezas padrão, combinada e relativa.

	Valor da grandeza	u (incerteza)	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão
VOLUME DA CUBA (900 mL)	900				
Calibração		0,5	Retangular	1,73205	0,28868
Repetitividade de aferição		1	Retangular	1,73205	0,57735
Temperatura		0,585	Retangular	1,73205	0,33775
<i>u_c (volume da cuba)</i>					0,72852
<i>Incerteza relativa</i>					0,00081
PIPETA VOLUMÉTRICA 2 mL	2				
Calibração		0,0050	Normal	2	0,0025
Repetitividade de aferição		0,0025	Retangular	1,73205	0,00144
Temperatura		0,0013	Retangular	1,73205	0,00075
<i>u_c (pipeta 2 mL)</i>					0,00298
<i>Incerteza relativa</i>					0,00149
BALÃO VOLUMÉTRICO 100 mL	100				
Calibração		0,020	Normal	2	0,01
Repetitividade de aferição		0,05	Retangular	1,73205	0,02887
Temperatura		0,065	Retangular	1,73205	0,03753
<i>u_c (pipeta 100 mL)</i>					0,04839
<i>Incerteza relativa</i>					0,00048
U FINAL COMBINADA					0,00002
U RELATIVA					0,00176

c) Leitura de absorvância da solução padrão de trabalho em 268 nm.

A tabela 7 apresenta a incerteza padrão da leitura de absorvância da solução padrão, determinada a partir de três leituras de uma solução padrão de trabalho de pirazinamida, em 268 nm.

Tabela 7 – Absorvância da solução padrão de trabalho em 268 nm: cálculo da incerteza padrão.

Leitura I	Leitura II	Leitura III	Média das leituras	Desvio padrão	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão
0,6613	0,6615	0,6610	0,6613	0,00025	Normal	1,73205	0,00014

d) Leitura de absorvância da solução amostra em 268 nm

A tabela 8 apresenta as leituras de absorvância da solução amostra, determinada a partir da leitura em duplicata, em 268 nm, das seis soluções amostras de pirazinamida.

Tabela 8 – Absorvância da solução amostra em 268 nm.

Leituras da amostra a 268 (Absorvância)		
Cuba 1	Leitura 1	0,7328
	Leitura 2	0,7332
Cuba 2	Leitura 1	0,7274
	Leitura 2	0,7274
Cuba 3	Leitura 1	0,7192
	Leitura 2	0,7194
Cuba 4	Leitura 1	0,7282
	Leitura 2	0,7277
Cuba 5	Leitura 1	0,7415
	Leitura 2	0,7405
Cuba 6	Leitura 1	0,7278
	Leitura 2	0,7284
MÉDIA		0,7295
DESVIO PADRÃO		0,00685

A tabela 9 apresenta a incerteza padrão da leitura de absorvância da amostra em 268 nm.

A incerteza relacionada à homogeneidade do ativo no lote em análise foi estimada a partir do resultado do teste uniformidade por variação de peso de comprimidos de Pirazinamida 500 mg LAQFA lote 001 (tabela 10).

Tabela 9 – Cálculo da incertezas da leitura de absorvância da solução amostra.

	Valor da grandeza	u (incerteza)	Distribuição	Divisor	Incerteza padrão
REPETITIVIDADE DE LEITURA DA AMOSTRA	0,7295	0,00685	Normal	3,46410	0,00198
HOMOGENEIDADE DO ATIVO (mg) <i>Incerteza relativa</i>	500	7,261	Retangular	1,73205	4,19223 0,00838
U RELATIVA					0,00861

e) Dissolutor

A incerteza padrão do dissolutor foi estimada em 0,0001 (0,01%), partindo-se do princípio que o equipamento, ao ser aprovado na qualificação química e física, não deve contribuir de forma significativa na incerteza do resultado final.

Tabela 10 – Resultado do teste de uniformidade.

Amostra	Peso unit (g)	Teor Unitário (%)	Pirazinamida mg/ comp
1	0,5797	99,3	496,5
2	0,5803	99,4	497,0
3	0,5865	100,5	502,3
4	0,5899	101,0	505,2
5	0,5797	99,3	496,5
6	0,5956	102,0	510,1
7	0,5797	99,3	496,5
8	0,5845	100,1	500,6
9	0,5889	100,9	504,4
10	0,6057	103,8	518,8
MEDIA		100,6	502,8
DESVIO PADRÃO		1,452	7,261
DPR(%)		1,444	-

A incerteza combinada final do ensaio foi obtida utilizando-se o método das incertezas relativas, conforme equação 9. O valor encontrado da incerteza combinada final em %, unidade de medida do mensurando, foi igual a 0,94%.

5.1.4 Cálculo do fator de abrangência (k)

O número de graus de liberdade efetivo (V_{eff}) foi calculado de acordo com a equação 10, a partir do número dos graus de liberdade individuais de cada fonte de incerteza. A tabela 11 apresenta os graus de liberdade das variáveis tipo A. Para as demais fontes de incerteza avaliadas neste estudo (tipo B), considerou-se $v_i \rightarrow \infty$.

Tabela 11 – Grau de liberdade individual das fontes de incerteza tipo A.

Fontes de Incerteza	Grau de liberdade	$u(x_i)^4/v_i$
Repetitividade de leitura da solução amostra em 268 nm	11	1,38654E-12
Repetitividade de leitura da solução padrão de trabalho em 268 nm	2	2,2284E-16
Repetitividade(balança)	9	1,48368E-07

O número de graus de liberdade efetivo calculado foi $5,34 \times 10^{+06}$ e o fator de abrangência, determinado a partir da distribuição t-Student para $\alpha=0,05\%$, foi de $k = 2,0$.

5.1.5 Cálculo da incerteza expandida e resultado do ensaio de dissolução

A Incerteza Expandida foi calculada a partir resultado do produto entre a incerteza combinada e o fator de abrangência, conforme equação 11. Desta forma, $2 \times 0,94 \% = 1,9\%$.

Tabela 12 – Resultado do ensaio de dissolução de Pirazinamida 500 mg (lote 001).

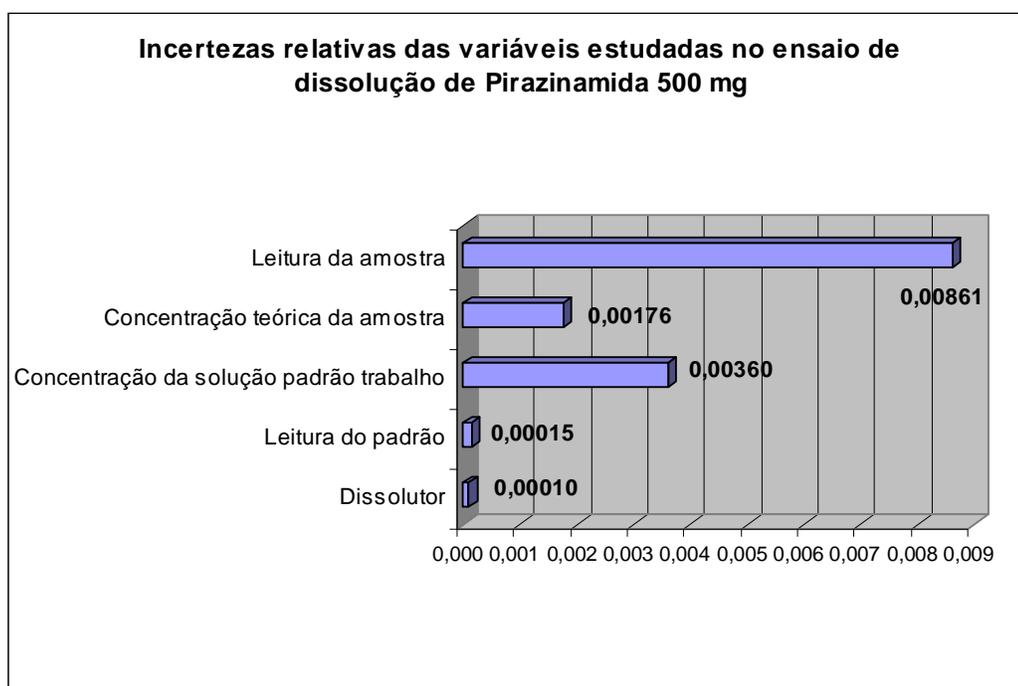
Cuba	Leituras de Absorvância			% valor declarado
	Leitura 1			
1	Leitura 1	0,7328	0,7330	99,76
	Leitura 2	0,7332		
2	Leitura 1	0,7274	0,7274	99,00
	Leitura 2	0,7274		
3	Leitura 1	0,7192	0,7193	97,90
	Leitura 2	0,7194		
4	Leitura 1	0,7282	0,7280	99,07
	Leitura 2	0,7277		
5	Leitura 1	0,7415	0,7410	100,85
	Leitura 2	0,7405		
6	Leitura 1	0,7278	0,7281	99,09
	Leitura 2	0,7284		
MÉDIA				99,3 ± 1,9%

Considerando o critério de aceitação do ensaio (item 4.1.1), o lote encontra-se aprovado no primeiro estágio, tendo em vista que todos os comprimidos apresentam percentual dissolvido igual ou maior que 80% (Q + 5)%.

5.2 CONTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DAS FONTES DE INCERTEZA NA INCERTEZA GLOBAL

A principal contribuição no cálculo da incerteza do percentual de dissolução de comprimidos de Pirazinamida 500 mg é da leitura da absorvância da amostra, como demonstra o gráfico 1.

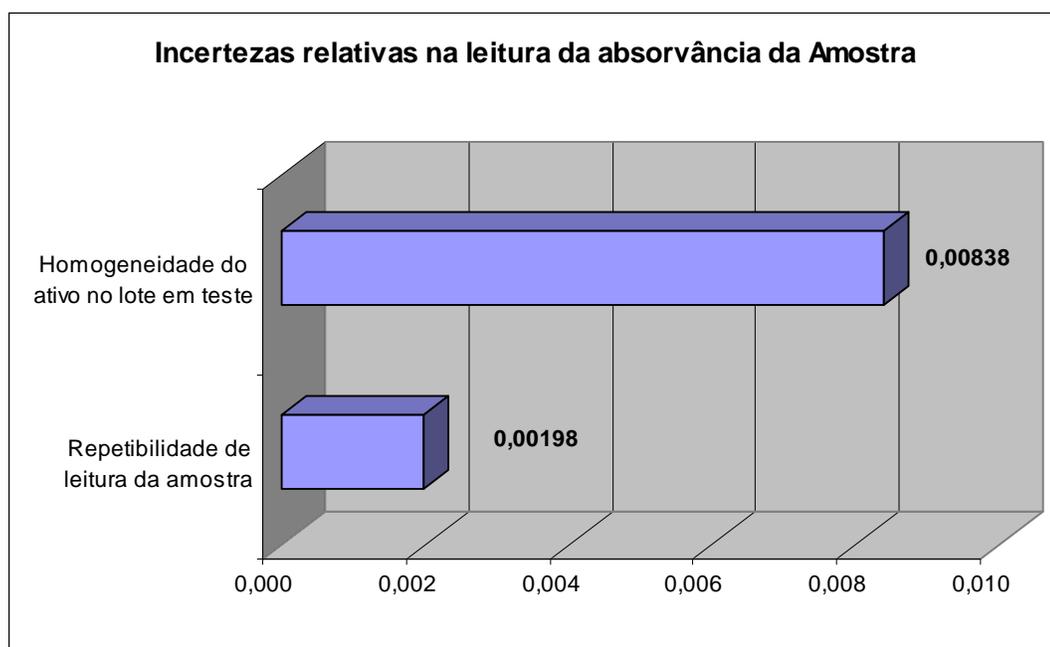
Gráfico 1: Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza na porcentagem de dissolução.



A incerteza relacionada à leitura da amostra representa cerca de 60,6% da incerteza relativa final. Essa grande contribuição se deve, sobretudo à influência da uniformidade de dose unitária do ativo nos comprimidos (gráfico 2). De acordo com a Farmacopéia Brasileira, dez unidades de comprimido devem apresentar teor individual entre 85,0% e 115,0% do valor declarado, e o desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 6,0% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1996). Os comprimidos podem apresentar, portanto, uma variabilidade na massa de ativo por unidade produzida, estipulada em farmacopéia, devido à variabilidade inerente ao processo de fabricação. Observa-se que o desvio padrão relativo encontrado no teste de

uniformidade de doses unitárias (tabela 10) foi igual a 1,4%, e portanto, muito abaixo do limite farmacopeico de 6,0%. Desta forma, em qualquer ensaio de dissolução de comprimidos, a leitura de absorvância da amostra deve ser o fator preponderante na contribuição da incerteza final do ensaio.

Gráfico 2: Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na leitura de absorvância da amostra.



A contribuição da concentração teórica da solução amostra reflete a contribuição das incertezas das diluições realizadas (volume na cuba, pipeta volumétrica de 2 mL e balão volumétrico de 100 mL), uma vez que o valor declarado de ativo no comprimido é o teórico. Representa cerca de 12,4% da incerteza relativa final. De acordo com o gráfico 3, observa-se que a etapa mais crítica é a operação de pipetagem, tendo em vista o volume reduzido da alíquota utilizada na diluição.

A incerteza relacionada à concentração da solução padrão de trabalho representa cerca de 25,3% da incerteza relativa final, sendo a incerteza relativa da pureza do padrão (gráfico 4), a responsável pelos resultados encontrados.

Gráfico 3: Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na concentração teórica da amostra.

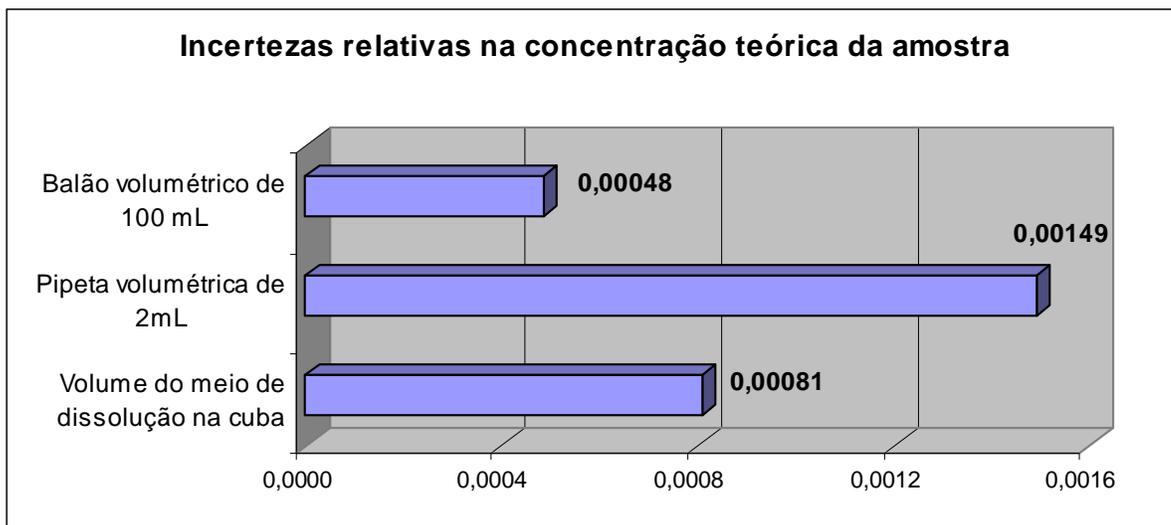
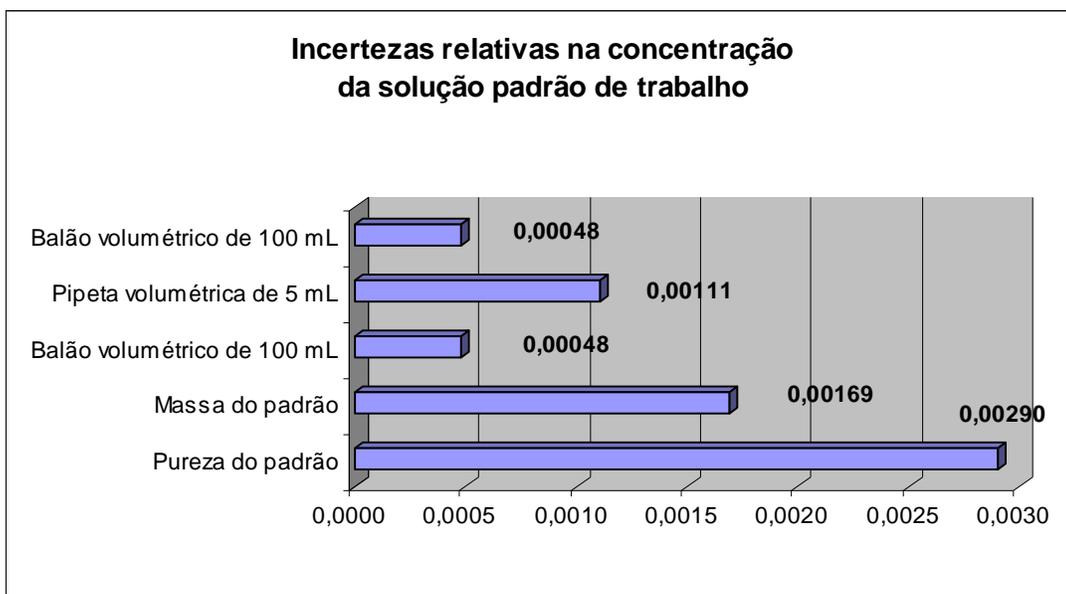
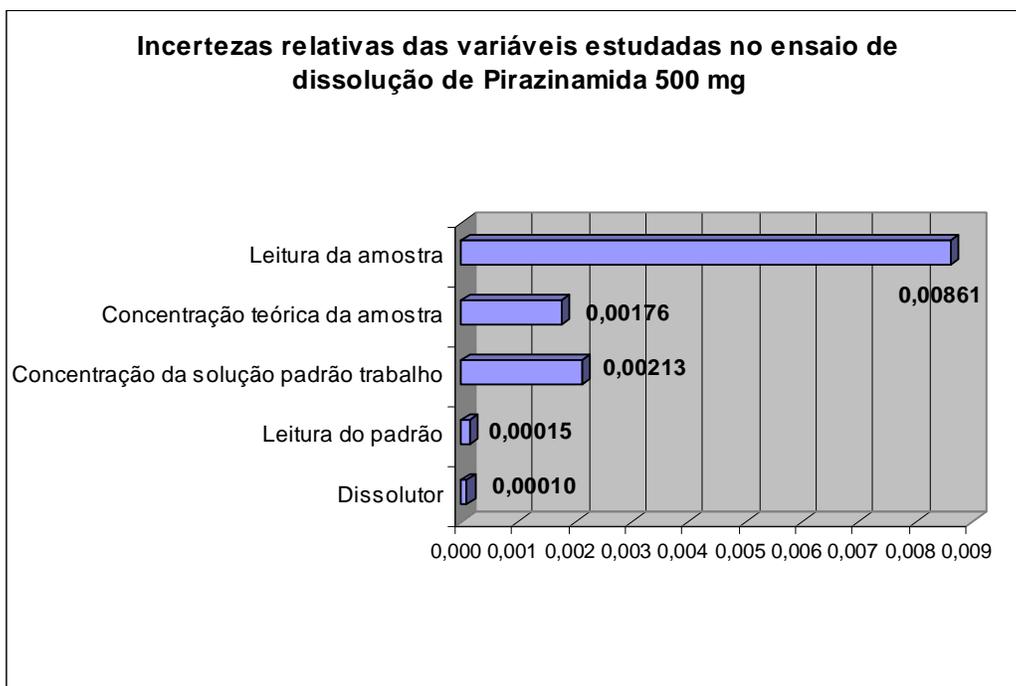


Gráfico 4: Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza relativa na concentração da solução padrão de trabalho.



O gráfico 5 apresenta um comparativo das principais contribuições de incerteza na porcentagem de dissolução considerando a influência da incerteza da pureza do padrão igual a zero. Observa-se que neste caso, as contribuições relativas à concentração teórica da amostra e da concentração do padrão de trabalho são praticamente equivalentes.

Gráfico 5: Gráfico comparativo das principais contribuições de incerteza na porcentagem de dissolução, desconsiderando a influência da incerteza da pureza do padrão.



5.3 CÁLCULO DO INTERVALO DE CONFIANÇA DO ENSAIO DE PIRAZINAMIDA 500 MG

O cálculo do intervalo de confiança é muito empregado nos resultados de análises químicas, a fim de estabelecer a variabilidade dos resultados de um ensaio. No entanto, o cálculo supracitado não considera as fontes de incerteza do ensaio, definidas após avaliação preliminar do método analítico, conforme estabelece o método do cálculo de incerteza de medição.

Os resultados do ensaio de dissolução de comprimidos de Pirazinamida, registrados na tabela 12, foram submetidos ao cálculo do intervalo de confiança, conforme equação abaixo.

$$IC = \pm \frac{t \times s}{\sqrt{n}}$$

Equação 14

Onde:

t = valor de t ($\alpha=0,05\%$; GL=n-1)

s = desvio padrão

\sqrt{n} = raiz quadrada do número de amostras analisadas

Desta forma, o resultado do ensaio expresso com o intervalo de confiança é $99,3 \pm 1,0\%$, enquanto que o obtido pelo cálculo da incerteza é $99,3 \pm 1,9\%$, ou seja, a variabilidade calculada pelo método da Incerteza de Medição é cerca de 50% maior do que aquela calculada pelo Intervalo de Confiança.

6 CONCLUSÃO

Os laboratórios analíticos, sobretudo aqueles que analisam produtos vinculados à Vigilância Sanitária, devem garantir a confiabilidade metrológica dos resultados emitidos, de modo que tomadas de decisão de aprovação/reprovação possam ser realizadas, com embasamento técnico adequado.

A Garantia da Qualidade de uma indústria farmacêutica deve estabelecer procedimentos, rotinas e métodos apropriados, inseridos no contexto de Boas Práticas de Fabricação e Controle, a fim de que seu medicamento apresente garantia de segurança, eficácia e qualidade.

A determinação e avaliação da incerteza de medição de ensaio de dissolução ainda são incipientes na comunidade acadêmica e na indústria farmacêutica, sendo poucos os trabalhos publicados. Os resultados dos ensaios são acompanhados do desvio padrão relativo ou do intervalo de confiança.

A diferença observada entre o cálculo do intervalo de confiança ($\pm 1,0\%$) e o de incerteza de medição ($\pm 1,9\%$) pode apresentar impacto sanitário relevante, nos casos em que os resultados encontrados estiverem próximos do parâmetro legislativo de aceitação do ensaio. Isso pode acontecer, por exemplo, em comprimidos com problema de formulação ou com estabilidade comprometida.

Neste contexto, a incerteza de medição representa uma ferramenta racional mais efetiva para o cálculo da variabilidade dos resultados, por considerar as principais fontes que influenciam a incerteza associada ao resultado de uma metodologia analítica.

É importante destacar que este estudo não teve como objetivo esgotar as fontes de incerteza que influenciam os resultados obtidos, mas as principais variáveis envolvidas com impacto significativo sobre o resultado final do ensaio de dissolução, exemplificadas na análise de comprimidos de Pirazinamida 500 mg. Desta forma, as principais contribuições para a incerteza da porcentagem da substância ativa liberada no meio de dissolução foram: incerteza relativa da absorvância da amostra (60,6%), incerteza relativa da concentração do padrão (25,3%) e a incerteza relativa das diluições da amostra (12,4%). Uma análise mais completa indica que a incerteza relativa da homogeneidade do ativo no lote em

teste, da pureza do padrão e do volume de alíquotas pequenas são os principais pontos que merecem maior atenção no ensaio de dissolução.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISSO/IEC 17025:2005 - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

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

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p. 413-420, 1995.

AZARMI, S.; ROA, W.; LOBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n.1 , p.12-21, Jan. 2007.

BRANDÃO, S. M. C. **Avaliação dos Resultados das Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Orais no Ensaio de Dissolução**. Rio de Janeiro: Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, INCQS/Fiocruz, 2006. 35p. Monografia de Especialização.

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**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008. 110p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

BRASIL. Lei nº 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11

fev. 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 135, de 29 de maio de 2003. Aprova Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 ago. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

_____. Resolução RE nº 893, de 29 de maio de 2003. Guia para realização de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

_____. Resolução RE nº 310, de 01 de setembro de 2004. Determina a publicação do "Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 set. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

_____. Recomendações para realização de ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI). Brasília, DF. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 jan. 2010.

_____. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

_____. Resolução RDC nº 17, de 02 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 mar. 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 26 out. 2009.

BRASIL. Portaria nº 978, de 16 de maio de 2008. Dispõe sobre a lista de produtos estratégicos, no âmbito do Sistema Único de Saúde, com a finalidade de colaborar com o desenvolvimento do Complexo Industrial da Saúde e institui a Comissão para Revisão e Atualização da referida lista. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 mai. 2008. Seção 1, p.105-106.

BUCHMANN, J.H.; SARKIS, J. E.de S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, v. 25, n.1, p.111-116, Jan. 2002.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, n.1-2, p.1-11, Sep. 2006.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., parte I. São Paulo: Atheneu Ed. Ltda, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., parte II. São Paulo: Atheneu Ed. Ltda, 1996.

FILHO, O. B. Implantação de sistemas de qualidade em laboratórios de ensaios. **Revista Analytica**, n.3, p. 24-28, Fev. 2003.

HANSON, R.; GRAY, V. **Handbook of dissolution testing**. 3 ed. Delaware: Dissolution Technologies, 2004. 199p.

INMETRO NORMA Nº NIT-DICLA-033-00 - Política para implementação da estimativa de incerteza de medição em laboratórios de ensaio. p.01-04. Mar. 2003.

INMETRO NORMA Nº NIT-DICLA-021-02 – Expressão da incerteza de medição. p.01-30. Mai. 2003b.

INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de Metrologia : portaria INMETRO nº 029 de 1995**. 5 ed. Rio de Janeiro, 2007. 72 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). Incerteza em Medições Analíticas. Rio de Janeiro, 2008. POP n. 65.1120.061. Ver. 04.

ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2nd edition, 2005.

KRITSKI, A. L.; VILLA, T. S.; TRAJMAN, A.; SILVA, J. R. L.; MEDRONHO, R. A.; RUFFINO-NETTO, A. Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. **Revista de Saúde Pública**, v.41, supl.1, p.9-14, Set. 2007.

LIMA, M.M. et al. Co-infecção do HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n.3, p.217-220, Jun. 1997.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 265–278, Sep. 2004.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo: USP, 2003. 117p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos, São Paulo.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Disponível em: <http://www.opas.org.br/prevencao/site/UploadArq/ProgramaTB.pdf> Acesso em: 26 out. 2009.

_____. Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Disponível em: <http://www.opas.org.br> Acesso em: 26 out. 2009b.

QURESHI, S. A.; SHABNAM, J. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n., p. 271–276, 2001.

SANTOS, J. Resposta brasileira ao controle da tuberculose. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, supl. 1, p.89-94, Set. 2007.

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