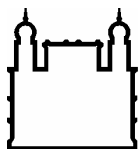


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**ELABORAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA *IN HOUSE* PARA
VACINA CONTRA Hib E PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS. UMA
PROPOSTA PARA NORMALIZAÇÃO DE TESTES FÍSICO-QUÍMICOS
DO CONTROLE DE QUALIDADE**

ELÔ DE OLIVEIRA RODRIGUES

Rio de Janeiro
2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

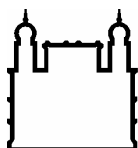
ELÔ DE OLIVEIRA RODRIGUES

Elaboração de material de referência *in house* para vacina contra Hib e produtos intermediários. Uma proposta para normalização de testes físico-químicos do controle de qualidade

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2009

O Trabalho foi realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação da Dr.^a Akie Kawakami Avila e Dr.^a Márcia Arissawa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ELÔ DE OLIVEIRA RODRIGUES

**ELABORAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA *IN HOUSE* PARA
VACINA CONTRA Hib E PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS. UMA
PROPOSTA PARA NORMALIZAÇÃO DE TESTES FÍSICO-QUÍMICOS
DO CONTROLE DE QUALIDADE**

Orientadoras: Dr.^a Akie Kawakami Avila e Dr.^a Márcia Arissawa

Dissertação defendida e aprovada em 24 de junho de 2009

Dra. Iracema Takase
IQ / UFRJ - Presidente

Dr. Antonio Eugênio Almeida
INCQS/Fiocruz

Dr. Roberto Perez Campelo
Biomanguinhos / Fiocruz

Rio de Janeiro
2009

Aos meus pais Regina (in memoriam) e Edson,
pelo ensinamento de vida e respeito ao próximo.

Ao meu marido Cláudio e aos nossos
filhos Felipe e Vinicius, razões da minha existência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que ilumina a minha vida.

A minha grande família por compreender a ausência e também ao apoio fornecido.

As minhas queridas orientadoras Márcia Arissawa e Akie Avila, que aparecem sempre no momento certo e não poderiam ser melhores como amigas e orientadoras do trabalho.

Ao Dr. Akira Homma, pela realização do MPTI.

A Darcy Akemi, Ana Lucia Palmigiani e Izabel Crespo pela permissão e incentivo da realização do curso de mestrado em Biomanguinhos.

Aos grandes amigos do LAFIQ que me apoiaram e deram incentivos para realização deste trabalho.

A amiga Maria Denise Neves por me ajudar nos momentos difíceis e na determinação de incerteza.

A Dra Sheila Farage e Zaíra Antunes pela atuação no mestrado e apoio ao aluno para um melhor desenvolvimento profissional.

A Andrea Ayrosa pelo apoio em vários momentos, principalmente como ouvinte de apresentações de diversos trabalhos realizados durante realização de disciplinas do mestrado.

Aos amigos do MPTI 2007, pela união do grupo e apoio nos momentos críticos.

A Tânia Pinheiro do DEBAC, amiga desde os tempos da UFRJ, pelo incentivo neste projeto e pelas sugestões sobre uso do PRRP.

Aos amigos da Mantecorp pelo apoio e a Ana Cláudia, Andrea Simbarelli entre outros que cederam gentilmente à utilização da balança termogravimétrica para início da realização deste trabalho.

A Érika e outros companheiros de Farmanguinhos que realizaram as análises de RMN, com interesse e apoio.

Aos institutos cubanos CIGB e CIM e aos amigos Alejandro e Maribel entre outros que compartilharam sua experiência na preparação de materiais de referência, servindo como inspiração para este trabalho.

Aos colegas de trabalho da unidade de Biomanguinhos, que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e siglas	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de quadros	xvi
Lista de gráficos	xvi
Lista de figuras	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xix
1. Introdução	1
1.1. A importância da vacina contra Hib para a saúde pública mundial e no Brasil, no combate a doenças causadas pelo <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b.	4
1.2. Implantação da produção da vacina Hib em Biomanguinhos	6
1.3. Material de referência (MR)	6
1.4. Material de referência certificado (MRC)	7
1.5. Material de referência internacional (MRI)	8
1.6. ISO guias	8
1.7. O cenário de materiais de referência no Brasil	9
1.8. Caracterização, estudos de homogeneidade e estabilidade	10
1.8.1. Caracterização	11
1.8.2. Homogeneidade	11
1.8.3. Estabilidade	11
1.9. Estimativa da incerteza de medição associada ao MR	12
2. Material de referência candidato: polirribosil-ribitol fosfato (PRRP)	14
2.1. Características do PRRP	14
2.2. Seleção do PRRP para material de referência	14
3. Requisitos para planejamento de um material de referência	17
3.1. Itens para a elaboração de um material de referência	17
3.1.1. Objetivo de uso do material de referência	17

3.1.2.	Definição de concentração e quantidade	17
3.1.3.	Procedimentos de controle do material de referência	17
3.1.4.	Documentação	18
3.1.5.	Identificação da amostra	18
3.1.6.	Procedimento de preparação e envase	18
3.1.7.	Fator econômico	18
3.1.8.	Avaliação dos resultados	18
3.1.9.	Certificado	18
4.	Planejamento técnico do material de referência PRRP	20
4.1.	Preparo do material candidato a MR	21
4.1.1.	Concentração e quantidade	21
4.1.2.	Envase	21
4.2.	Caracterização do material candidato a MR	21
4.2.1.	Estrutural	21
4.2.2.	Nominal	22
4.3.	Teste de homogeneidade	22
4.3.1.	Procedimento para realização do teste de homogeneidade	23
4.4.	Estudo de estabilidade	23
4.4.1.	Planejamento para estudo de estabilidade a longo prazo	23
4.4.2.	Estudo de estabilidade acelerado	24
5.	Ferramentas estatísticas para realização de um material de referência	25
5.1.	Avaliação estatística dos resultados de homogeneidade	25
5.2.	Avaliação estatística dos resultados de estabilidade	25
5.2.1.	Reprodutibilidade interna	25
5.2.2.	Análise de tendência por modelo empírico de regressão linear	26
5.2.3.	Análise de resíduos	27
5.3.	Estimativa da incerteza de medição	28
5.3.1.	Fontes de incerteza	29
5.3.2.	Componentes de incerteza	29
5.3.2.1.	Componente do tipo A	29
5.3.2.2.	Componente do tipo B	29
5.3.3.	Graus de liberdade efetivos (v_{eff})	31
5.4.	Procedimento para determinação da incerteza do MRC	32

5.4.1.	Cálculo do componente de incerteza da caracterização	33
5.4.2.	Cálculo do componente de incerteza de homogeneidade	34
5.4.3.	Componente de incerteza da estabilidade	34
6.	Rastreabilidade e confiabilidade	35
6.1.	Validação de métodos	36
6.1.1.	Revalidação do método de determinação do conteúdo de fósforo	36
6.1.2.	Precisão	36
6.1.2.1.	Precisão intermediária	36
6.1.2.2.	Repetitividade	36
6.1.2.3.	Resultados de precisão	37
6.1.2.4.	Avaliação final de precisão	38
6.1.3.	Especificidade	38
6.1.3.1.	Resultados de Especificidade	38
6.1.4.	Linearidade e Faixa	39
6.1.4.1.	Resultados de Linearidade e Faixa	39
6.1.4.2.	Teste de Grubbs	41
6.1.4.3.	Verificação de Homocedasticidade	42
6.1.4.4.	Teste de Cochran	42
6.1.4.5.	Regressão linear e coeficientes da reta	43
6.1.4.6.	Análise de resíduos	44
6.1.4.7.	Precisão do instrumento	45
6.1.5.	Incerteza de medição do método de fósforo	46
6.1.6.	Avaliação final da validação de método	48
6.2.	Utilização do padrão internacional	48
6.2.1.	Resultados de D-ribose do padrão internacional NIBSC/WHO	49
6.2.1.1.	Preparação do padrão	49
6.2.1.2.	Formulação da hipótese	50
6.2.1.3.	Índice z-score	50
6.2.1.4.	Avaliação final dos resultados para o teste de D-ribose do padrão internacional NIBSC/WHO	51
6.2.2.	Uso do padrão internacional NIBSC/WHO para o método de fósforo	51
6.2.2.1.	Preparo do padrão para o uso no teste de fósforo	51
6.2.2.2.	Resultados do artigo sobre o primeiro padrão internacional de PRRP	51
6.2.2.3.	Resultados do laboratório Físico-Químico	52
6.2.2.4.	Cálculo do índice z-score para fósforo	52

7.	Resultados do material candidato a MR	54
7.1.	Dados experimentais do preparo do material de referência	54
7.2.	Preparo da solução	56
7.3.	Testes e avaliação do material candidato a MR	56
7.4.	Ressonância magnética nuclear (RMN) – caracterização estrutural	57
7.4.1.	Espectros de ¹ H RMN do padrão internacional NIBSC/WHO e do material candidato. Análise comparativa e atribuições	58
7.5.	Caracterização nominal por D-ribose	61
7.5.1.	Resultados em condições de repetitividade	62
7.6.	Envase do material candidato	62
7.7.	Estudo de homogeneidade para conteúdo de D-ribose	62
7.8.	Estudo de estabilidade para conteúdo de D-ribose	64
7.8.1.	Estudo de estabilidade em tempo real para o conteúdo de D-ribose no MR	64
7.8.2.	Resultados da reprodutibilidade interna nas temperaturas de armazenagem em tempo real para D-ribose	65
7.8.3.	Análise de tendência dos resultados do estudo a 4°C, - 20°C e 70°C	66
7.8.4.	Análise de resíduos dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, para conteúdo de D-ribose, em tempo real	67
7.8.5.	Estudo de estabilidade acelerado para o conteúdo de D-ribose no MR a 25 ⁰ C e 37 ⁰ C	70
7.8.6.	Análise de tendência dos resultados a 25°C e 37 ⁰ C	72
7.8.7.	Análise de resíduo dos resultados de estudo de estabilidade do conteúdo de D-ribose para 25 ⁰ C e 37 ⁰ C	73
7.9.	Caracterização nominal por fósforo	75
7.10.	Teste de homogeneidade para conteúdo de fósforo	76
7.11.	Estudo de estabilidade para conteúdo de fósforo no MR	78
7.11.1.	Estudo de estabilidade para conteúdo de fósforo em tempo real	78
7.11.2.	Resultados de conteúdo de fósforo e reprodutibilidade interna nas diferentes temperaturas de armazenagem, em tempo real	79
7.11.3.	Análise de tendência dos resultados do estudo a 4°C, - 20 ⁰ C e 70 ⁰ C	79
7.11.4.	Análise de resíduos para determinação de fósforo em tempo real a 4°C, - 20°C e -70°C	80
7.11.5.	Estudo de estabilidade acelerado para o conteúdo de fósforo no MR a 25 ⁰ e 37 ⁰ C	83

7.11.6.	Análise de tendência dos resultados a 25°C e 37 ⁰ C	84
7.11.7.	Análise de resíduo dos resultados de estudo de estabilidade do conteúdo de fósforo para 25°C e 37 ⁰ C	85
7.12.	Resultados de incerteza do material de referência de PRRP	89
7.12.1.	Cálculo do componente de incerteza associada a caracterização	89
7.12.2.	Cálculo do componente de incerteza associada à homogeneidade	93
7.12.3.	Componente de incerteza associada a estabilidade	93
7.12.3.1.	Componente da incerteza associada a estabilidade em tempo real (temperatura de armazenagem)	93
7.12.3.2.	Componente da incerteza de estabilidade no estudo acelerado (temperatura de transporte)	94
7.13.	Incerteza combinada expandida	94
7.14.	Certificação do material de referência	96
8.	Conclusão	97
8.1.	Considerações finais	100
9.	Referências bibliográficas	101
10.	Anexos	106
	Anexo 1. Tabela de números aleatórios	107
	Anexo 2. Certificado do padrão internacional NIBSC/WHO	108
	Anexo 3. Certificado do Material de referência PRRP	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA -	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
Biomanguinhos -	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BAM -	Federal Institute for Materials Research and Testing (Bundesanstalt für Materialforschung und Prüfung) –Alemanha
BPL -	Boas Práticas de Laboratório
BPM -	Boas práticas de Manufatura
CANMET -	Materials Technology Laboratory - Canadá
CENAM –	Centro Nacional de Metrologia
CIENTEC –	Fundação de Ciência e Tecnologia
CIGB -	Centro de Ingenieria Genética y Biotecnologia –Cuba
CIM -	Centro de Imunologia Molecular – Cuba
CV -	Coeficiente de Variação
DEQUA -	Departamento de Controle de Qualidade
DEPFI -	Departamento de Processamento Final
DTP -	Difteria, Pertussis e Tétano
GUM -	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement
GSK -	GlaxoSmithKline
HPAEC-PAD -	High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada)
Hib -	<i>Hæmophilus influenzae</i> tipo b
ILAC -	International Laboratory Accreditation Co-Operation
INCQS -	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO -	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
ISO -	International Organization for Standardization
IRMM -	Institute for Reference Materials and Measurements – Europa

IT -	Instrução de trabalho
IUPAC -	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAFIQ -	Laboratório Físico-Químico
MR -	Material de Referência
MRC -	Material de Referência Certificado
NIBSC -	National Institute for Biological Standards and Control - Reino Unido
NMI -	Nederlands Meetinstituut – Holanda
NIST -	National Institute Standard and Technology - Estados Unidos
PAHO -	Pan American Health Organization
POP -	Procedimento Padronizado Padrão
PMT -	Proteína Monomérica Tetânica
PRRP -	Polirribosil-ribitol fosfato
PS -	Polissacarídeo
PSTT -	Conjugado do Polissacarídeo com a Proteína Monomérica Tetânica
s -	Desvio-padrão
SBM -	Sociedade Brasileira de Metrologia
RBC -	Rede Brasileira de Calibração
RMN -	Ressonância Magnética Nuclear
VIM -	Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia
U -	Incerteza expandida
WHO -	World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Concentração de PRRP para os testes de D-ribose e fósforo	21
Tabela 4.2 -	Planejamento para estudo de estabilidade	24
Tabela 4.3 -	Planejamento para estudo de estabilidade acelerado	24
Tabela 5.1 -	Análise de Variância	25
Tabela 6.1 -	Resultados de fósforo em PRRP obtidos por 3 analistas	37
Tabela 6.2 -	Teste ANOVA para precisão intermediária	37
Tabela 6.3 -	Recuperação - Adição de padrão	39
Tabela 6.4 -	Preparo da curva padrão de fósforo	40
Tabela 6.5 -	Avaliação de resultados da curva de calibração	40
Tabela 6.6 -	Resultados do teste de Grubbs	42
Tabela 6.7 -	Dados da equação da regressão linear	43
Tabela 6.8 -	Resultados de Análise de resíduos	44
Tabela 6.9 -	Avaliação da precisão do instrumento	45
Tabela 6.10 -	Cálculo de Estimativa de Incerteza dos Resultados das análises de fósforo (planilha de cálculo)	47
Tabela 6.11 -	Principais fontes de incerteza do método de fósforo	48
Tabela 6.12 -	Resultados de PRRP pelo conteúdo de D-ribose do padrão internacional NIBSC/WHO	49
Tabela 6.13 -	Resultados do estudo colaborativo para elaboração do 1º padrão internacional de PRRP	52
Tabela 6.14 -	Resultados de PRRP do conteúdo de fósforo do padrão internacional NIBSC/WHO	52
Tabela 7.1 -	Condições do método de secagem do PRRP	55
Tabela 7.2 -	Tempo x umidade perdida x massa final do PRRP	55

Tabela 7.3 -	Atribuições para os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio em ppm	60
Tabela 7.4 -	Resultados obtidos na caracterização nominal (conteúdo de D-ribose)	61
Tabela 7.5-	Resultados para a avaliação da repetitividade	62
Tabela 7.6 -	Frascos separados para teste de homogeneidade	63
Tabela 7.7 -	Resultados de estudo de homogeneidade de D- ribose (%)	63
Tabela 7.8 -	Avaliação Estatística dos resultados de homogeneidade de D-ribose usando ANOVA	64
Tabela 7.9 -	Resultados do estudo de estabilidade em diferentes temperaturas de armazenagem	65
Tabela 7.10 -	Resultados de conteúdo de D-ribose no estudo de estabilidade a 4°C, - 20°C e - 70°C	66
Tabela 7.11 -	Valores médios obtidos e resultados de análise de tendência para o teste de D-ribose	67
Tabela 7.12 -	Resultados de resíduos a 4°C	68
Tabela 7.13-	Resultados de resíduos a -20 °C	68
Tabela 7.14 -	Resultados de resíduos a -70°C	71
Tabela 7.15 -	Resultados de D-ribose no estudo de estabilidade acelerado a 25°C	71
Tabela 7.16 -	Resultados de D-ribose no estudo de estabilidade acelerado a 37°C	71
Tabela 7.17 -	Resultado de precisão dos testes realizados com amostras a 25°C e 37°C	72
Tabela 7.18 -	Valores médios de D-ribose e resultados da análise de tendência (25°C e 37°C)	72
Tabela 7.19 -	Resultados de resíduos a 25°C	73
Tabela 7.20 -	Resultados de resíduos a 37°C	73
Tabela 7.21 -	Resultados de caracterização de Fósforo	75
Tabela 7.22 -	Resultados do estudo de homogeneidade de fósforo	77
Tabela 7.23 -	Análise de variância dos resultados do estudo de homogeneidade de Fósforo	77
Tabela 7.24 -	Resultados do estudo de estabilidade para o conteúdo de fósforo em diferentes temperaturas de armazenagem (tempo real)	78
Tabela 7.25 -	Resultados do conteúdo de Fósforo no estudo de estabilidade em diferentes temperaturas	79

Tabela 7.26 -	Resultados médios do conteúdo de fósforo, armazenados a 4°C, em relação ao tempo	80
Tabela 7.27-	Resultados de resíduos à 4°C (Fósforo)	80
Tabela 7.28 -	Resultados de resíduos a -20 °C (Fósforo)	80
Tabela 7.29 -	Resultados de resíduos a -70°C (fósforo)	81
Tabela 7.30 -	Resultados de fósforo no estudo de estabilidade acelerado a 25°C	83
Tabela 7.31 -	Resultados de fósforo no estudo de estabilidade acelerado a 37°C	83
Tabela 7.32 -	Resultados de precisão dos testes realizados com amostras a 25°C e 37°C	84
Tabela 7.33 -	Valores médios do conteúdo de fósforo a 25 °C e 37 ⁰ C	85
Tabela 7.34 -	Resultados de resíduos a 25°C	85
Tabela 7.35 -	Resultados de resíduos a 37°C	86
Tabela 7.36 -	Cálculo de Estimativa de Incerteza dos Resultados de caracterização de D-ribose	90
Tabela 7.37 -	Cálculo de estimativa de incerteza dos resultados de caracterização de fósforo	92
Tabela 7.38 -	Componentes de incerteza da estabilidade tempo real (temperaturas de armazenagem) para D-ribose	93
Tabela 7.39 -	Componentes de incerteza da estabilidade tempo real (temperaturas de armazenagem) para fósforo	94
Tabela 7.40 -	Componentes de incerteza da estabilidade do estudo acelerado para D-ribose (temperaturas de transporte)	94
Tabela 7.41 -	Componentes de incerteza da estabilidade do estudo acelerado para D-ribose (temperaturas de transporte)	94
Tabela 7.42 -	Percentual de contribuição de cada componente na incerteza combinada padrão de D-ribose	95
Tabela 7.43 -	Percentual de contribuição de cada componente na incerteza combinada padrão de fósforo	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 -	Correlação entre ensaios físico-químicos de produtos e intermediários da vacina Hib	15
Quadro 5.1 -	Fatores de abrangência k para diferentes graus de liberdade ν_{eff}	32
Quadro 6.1 -	Principais fontes de incertezas associada à medição do conteúdo de fósforo	46
Quadro 7.1 -	Componentes da incerteza de caracterização de D-ribose	89
Quadro 7.2 -	Componentes para cálculo de incerteza associada à caracterização de fósforo	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 6.1 -	Regressão linear e coeficientes da reta - validação	43
Gráfico 6.2 -	Distribuição de resíduos - validação	44
Gráfico 7.1 -	Umidade perdida x tempo de secagem do PRRP	55
Gráfico 7.2 -	Massa x tempo de secagem do PRRP	55
Gráfico 7.3 -	Carta de controle dos resultados de conteúdo de D-ribose	61
Gráfico 7.4 -	Resultados do estudo de estabilidade em tempo real - Conteúdo de D-ribose (%)	65
Gráfico 7.5 -	Plotagem de resíduos (4°C)	68
Gráfico 7.6 -	Plotagem de resíduos (-20°C)	69
Gráfico 7.7 -	Plotagem de resíduos (-70°C)	69
Gráfico 7.8 -	Plotagem de ajuste da linha (4°C)	69
Gráfico 7.9 -	Plotagem de ajuste da linha (-20°C)	70
Gráfico 7.10 -	Plotagem de ajuste da linha (-70°C)	70
Gráfico 7.11 -	Médias dos resultados de conteúdo de D-ribose versus semana do estudo acelerado a 25°C e 37°C.	71
Gráfico 7.12 -	Plotagem de resíduos a 25°C	73
Gráfico 7.13 -	Plotagem de resíduos a 37°C	74
Gráfico 7.14 -	Plotagem de ajuste da linha (25 °C)	74

Gráfico 7.15 -	Plotagem de ajuste da linha (37 °C)	75
Gráfico 7.16 -	Carta de controle dos resultados de caracterização de fósforo	76
Gráfico 7.17 -	Estudo de estabilidade em tempo real – Conteúdo de Fósforo (%)	81
Gráfico 7.18 -	Plotagem de resíduos - Fósforo (4°C)	81
Gráfico 7.19 -	Plotagem de resíduos (-20°C)	81
Gráfico 7.20 -	Plotagem de resíduos (-70°C)	82
Gráfico 7.21 -	Plotagem de ajuste da linha (4°C)	82
Gráfico 7.22-	Plotagem de ajuste da linha (-20°C)	82
Gráfico 7.23 -	Plotagem de ajuste da linha (-70°C)	83
Gráfico 7.24 -	Médias dos resultados de fósforo versus semana do estudo acelerado a 25°C e 37°C	84
Gráfico 7.25 -	Plotagem de resíduos a 25°C	86
Gráfico 7.26 -	Plotagem de resíduos a 37°C	87
Gráfico 7.27-	Plotagem de ajuste da linha (25 °C).	87
Gráfico 7.28 -	Plotagem de ajuste da linha (37 °C)	88
Gráfico 7.29 -	Contribuição dos componentes de incerteza para o resultado de D-ribose	95
Gráfico 7.30 -	Contribuição dos componentes de incerteza para o resultado de fósforo	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Fluxograma simplificado da produção da vacina contra Hib	2
Figura 1.2:	Incidência por grupo etário x cobertura vacinal -Meningite por <i>Haemophilus influenzae</i> no Brasil no período de 1998-2002	5
Figura 1.3:	Diagrama de causa-efeito	12
Figura 2.1:	Estrutura química do PRRP	14
Figura 4.1:	Esquema experimental do preparo do material de referência	20
Figura 5.1:	Fluxograma do processo de determinação da incerteza	33
Figura 6.1:	Principais tópicos para confiabilidade/ rastreabilidade de uma medição analítica	35
Figura 7.1:	Identificação dos H presentes no PRRP	58
Figura 7.2:	Espectro de ¹ H (próton) do PRRP utilizado para o preparo do MR	59
Figura 7.3:	Espectro de ¹ H do PRRP NIBSC	59

RESUMO

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Biomanguinhos, é uma unidade da FIOCRUZ produtora de vacinas, biofármacos e reativos. O Departamento de Controle de Qualidade, pertencente a unidade de Biomanguinhos, é responsável pelos diversos ensaios físico-químicos, microbiológicos e biológicos para liberação dos produtos finais, produtos intermediários e matérias-primas.

Devido à necessidade de normalizar seus ensaios referentes a produtos finais e intermediários, várias medidas têm sido tomadas como: calibração e qualificação de equipamentos, validação de métodos analíticos, aquisição de padrões, entre outras atividades de melhoria. Uma das dificuldades encontradas pelos laboratórios de controle de qualidade é a aquisição de padrões que tenham características semelhantes aos produtos produzidos em Biomanguinhos. A disponibilidade de materiais de referência/padrões que atendam às necessidades do laboratório e a dificuldade em obtê-los, além dos custos elevados, os tornam impeditivos para uso nos ensaios rotineiros.

Esta dissertação tem como objetivo estabelecer a prática da produção de material de referência *in house* para os métodos que são utilizados para o controle de qualidade de produtos obtidos em Biomanguinhos. O planejamento e elaboração do material de referência de trabalho serão realizados considerando-se todas as condições necessárias para que a substância candidata atenda às normas vigentes relacionadas à normalização de métodos de controle de qualidade. A implantação da metodologia e dos requisitos necessários para obtenção do material serão descritos neste trabalho.

O material “candidato” a material de referência é o polirribosil-ribitol fosfato, o PRRP, que após conjugação com a proteína monomérica tetânica, torna-se o princípio ativo da vacina contra *Haemophilus influenzae*, a vacina Hib.

A avaliação do material de referência candidato é baseada nos estudos de caracterização, homogeneidade e estabilidade, utilizando-se ferramentas estatísticas adequadas, visando à atribuição do seu valor com uma incerteza de medição associada, atendendo aos propósitos desejados e agregando maior confiabilidade aos produtos analisados pelo laboratório. Além do uso interno, há a intenção de produzir este material de referência emitindo certificado de acordo com as normas vigentes, e assim fornecê-lo também para o INCQS, órgão da FIOCRUZ responsável pelo controle de qualidade nacional de vacinas e medicamentos.

ABSTRACT

The Institute of Technology in Immunobiologicals, Biomanguinhos, is a vaccine, biopharmaceuticals, and diagnostic kits production unit that belongs to Fiocruz. The Quality Control Department is responsible for the many physical-chemical, microbiological, and biological assays performed to release the final and intermediate products and the raw materials.

Due to the need of standardization of the assays, some measures have been being taken, such as equipments' calibration and qualification, validation of analytical methods, and standards purchase. One of the challenges faced by the quality control laboratories is the acquisition of standards that have the same characteristics as the Biomanguinhos products. The low availability of standards and reference materials that attend the laboratories' needs and the difficulties in obtaining these products, besides the high costs, make their use in the laboratories routine almost impossible.

This thesis intends to establish the production practice for the in-house reference materials used in Biomanguinhos' quality control assays. The planning and elaboration of the reference materials will be made according to the current legislation that concerns the standardization of quality control methods. The deployment of the methodology and of the requirements for the material obtainment will be discussed in this work.

The 'candidate' to be a reference material is the polyribosil ribitol phosphate (PRRP) that, after conjugation with the tetanical monomeric protein, becomes the active substance of the *Haemophilus influenzae* vaccine (Hib).

The evaluation of the candidate material is based in characterization, homogeneity and stability studies, using suitable statistical tools, in order to assign its value with an associated measurement uncertainty. It aggregates reliability to the products analyzed in the laboratories. Besides the internal use, the purpose of this work is to certify the reference material in accordance with the current regulations, so that it can be more trustable and therefore be used by INCQS, Fiocruz unit responsible for the national quality control of vaccines and other pharmaceutical products.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o Sistema de Qualidade vem se tornando um elemento essencial para o sucesso das empresas e instituições. Este sistema é uma estrutura organizacional que envolve os procedimentos, responsabilidades, processos e recursos necessários para implementação da Gestão de Qualidade (ISO 8402). De acordo com norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, no requisito do Sistema da Qualidade, o laboratório deve estabelecer, implementar e manter um sistema da qualidade apropriado ao escopo das suas atividades.

Setores regulamentados legalmente devem atender às “Boas Práticas de Laboratório” (BPL) e “Boas Práticas de Fabricação” (BPF). As Boas Práticas de Laboratório referem-se ao Sistema da Qualidade que diz respeito à organização e às condições sob as quais estudos em laboratório e campo são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados. As Boas Práticas de Fabricação, voltadas para a produção de medicamentos, assegura que os produtos sejam fabricados em conformidade e controlados em relação aos padrões de qualidade solicitados pelo registro sanitário do produto. As BPF de medicamentos estão relacionadas com os procedimentos de fabricação e controle de qualidade (PIC/S,2004).

Garantir a qualidade dos resultados dos métodos analíticos utilizados na rotina de controle de produtos finais e produtos intermediários, é um grande desafio para qualquer laboratório que tem como objetivo o controle de qualidade.

A confiabilidade dos resultados é determinada através de diversos meios, tais como: a validação de métodos, rastreabilidade através de padrões certificados, analistas qualificados e treinados, equipamentos calibrados, entre outros. Entretanto, devido à alta especificidade dos produtos produzidos por Biomanguinhos, os materiais de referência certificados e/ou padrões certificados, que contenham as mesmas características, são difíceis de serem encontrados ou estão indisponíveis em sua maioria. Quando possíveis são muito caros, inviabilizando financeiramente o seu uso em testes de rotina.

Este projeto tem como proposta a elaboração de um material de referência *in house*. Com o objetivo de atender a demanda da própria unidade, avaliou-se a viabilidade de se utilizar um dos intermediários da vacina Hib para realização deste estudo, o polirribosil-ribitol fosfato (PRRP). Este produto intermediário é um polissacarídeo obtido através do processo de fermentação e purificação do polissacarídeo capsular do *Haemophilus influenzae* tipo b.

Abaixo temos fluxograma simplificado, com as etapas de produção, seus respectivos produtos e a importância da realização dos ensaios nas principais etapas de produção da vacina Hib em Biomanguinhos.

FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DA VACINA CONTRA Hib

Propagação de células em meios de cultivo sólido e líquido



Produção da cápsula polissacarídica em biorreator



Purificação do polissacarídeo (PRRP)



Ativação do polissacarídeo



PRRP - Primeiro produto intermediário do processo produtivo. As análises do conteúdo de fósforo e conteúdo de D-ribose realizadas são indicativas do seu grau de homogeneidade (pureza).

Conjugação do PS com a PMT para a obtenção do PSTT



Formulação



Envase e liofilização



PSTT - Segundo produto intermediário do processo produtivo. A análise do conteúdo de D-ribose é utilizada para calcular a eficiência da conjugação e para estimar o conteúdo de polissacarídeo, com base no qual se realiza a etapa de formulação.

Rotulagem e embalagem (Produto final)

Vacina conjugada contra Hib – Produto final.
A análise do conteúdo de D-ribose é realizada para estimar o conteúdo de polissacarídeo por dose da vacina, valor este que, associado ao percentual de PS livre e a Distribuição de PM, garantem a eficácia da vacina.

Figura 1.1 – fluxograma simplificado da produção da vacina contra Hib.

A Vacina Hib e seus intermediários são produzidos e controlados através de procedimentos provenientes do processo de transferência de tecnologia com a GlaxoSmithkline (GSK) – Bélgica. Os métodos de controle físico-químicos relacionados aos produtos intermediários da vacina Hib, já se encontram estabelecidos e as metodologias validadas.

Desta forma, faz-se necessário estabelecer um material de referência que será utilizado como material controle para os ensaios rotineiros. Sua elaboração baseia-se em ISO Guias da série 30-35, dedicadas aos materiais de referência.

Atualmente para vacina Hib, o material de referência internacional disponível no cenário mundial fornecido pelo World Health Organization (WHO), é o PRRP liofilizado sob o código 02/208, elaborado pelo National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Sua utilização para rotina, entretanto é inviável mediante a quantidade necessária para as análises de controle de qualidade. Este material, entretanto, é utilizado para dar rastreabilidade ao material de referência proposto.

Em Biomanguinhos, encontra-se em andamento o projeto de transferência de tecnologia com os Institutos Cubanos (Centro de Ingenieria Genética y Biotecnologia (CIGB) e Centro de Imunologia Molecular (CIM)), envolvendo a produção de Biofármacos. Estes Institutos produzem e utilizam mais de 50 materiais de referência em seus procedimentos de controle. Considerando-se as necessidades de Biomanguinhos em relação a materiais de referência, esta proposta de trabalho é uma iniciativa no sentido de ganhar experiência para a produção de novos materiais de referência, que visam atender às necessidades do Departamento de Controle de Qualidade e órgãos reguladores.

Em função da crescente demanda do mercado e o controle exigido em cada processo, a utilização destes materiais em ensaios analíticos torna-se essencial para garantir a rastreabilidade e confiabilidade metrológica das medições, aliada às ferramentas estatísticas como as cartas de controle (EURACHEM/ CITAC -2003).

É possível acompanhar a resposta do método, sua tendência e os possíveis erros aleatórios e/ou sistemáticos. Desta forma, o desenvolvimento de materiais de referência viabilizaria a diminuição de custos do departamento, possibilitaria a produção de materiais com características similares aos produtos em análise, agregando uma maior confiabilidade aos produtos de Biomanguinhos.

1.1. A importância da vacina contra Hib para a saúde pública mundial e no Brasil, no combate a doenças causadas pelo *Haemophilus influenzae* tipo b.

O *Haemophilus influenzae* é uma bactéria gram-negativa que de acordo com a estrutura química da camada externa polissacarídica, pode ser capsulada ou não encapsulada. Dos seis tipos capsulados de *H. influenzae* (a, b, c, d, e, f), o tipo b (Hib) é o principal causador de doença invasiva na infância, especialmente em regiões não industrializadas, incluindo meningites, epiglotes, septicemias, osteomielites, artrites e de doenças não invasivas, como pneumonias e otites (WHO, 2002).

No mundo todo o *Haemophilus influenzae* tipo b causa mais de três milhões de casos de diversas doenças anualmente. Aproximadamente 400.000 crianças morrem por pneumonia e meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b. Várias seqüelas neurológicas ocorrem em 15 a 30% dos casos, cujas crianças sobrevivem à meningite (Holliday, 2008).

O uso da vacina iniciou em 1985 quando as primeiras vacinas de polissacarídeo polirribosil-ribitol fosfato foram licenciadas. Estas vacinas foram efetivas em adultos e crianças acima de 2 anos de idade, mas não proviam proteção adequada a crianças menores, devido à baixa resposta imunológica para antígenos independentes de células T como os polissacarídeos (Morris, 2008).

Por esta razão, uma nova geração de vacinas foi desenvolvida a partir da conjugação de uma proteína carreadora com polissacarídeos. Esta conjugação não somente induziu a circulação de anticorpos e a memória imunológica em crianças, como também resultou na diminuição da colonização nasofaríngea de Hib no organismo (WHO core, 2002).

As vacinas licenciadas para uso contra o *Haemophilus influenzae* tipo b são baseadas na conjugação com o toxóide diftérico, o toxóide tetânico ou com uma proteína externa de membrana meningocócica. Deste modo, as vacinas conjugadas contra Hib apresentam variações quanto ao tipo de proteína carreadora, ao método de conjugação utilizado e ao tamanho da cadeia do polissacarídeo, fornecendo diferentes propriedades imunológicas (WHO, 2002).

Em 1997, a Organização de Saúde Pan Americana (PAHO) recomendou a implantação da vacinação contra Hib na rotina da América Latina, tendo como precursores do processo o Uruguai e Chile (Kmetzsch, 2003).

Dados mais abrangentes em relação ao período anterior à vacinação são apresentados no artigo “Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on HIB meningitis in Brazil” (Miranzi, 2007). No período de 1983 a 2002, 379.352 casos de meningite foram notificados no Brasil, incluindo 24.710 (6,51%) casos de meningite por Hib com incidência de 81,6% em crianças com menos de 5 anos.

Em setembro de 1999, em todo o Brasil, a vacina Hib conjugada foi implementada para crianças de até 2 anos, de acordo com o Programa Nacional de Imunizações (Kmetzsch, 2003). Observou-se que, com a implantação da vacina Hib na rotina, e com aumento gradativo da cobertura vacinal, houve uma resposta imediata em relação à incidência da meningite causada por *Haemophilus influenzae* tipo b (Figura 1.2).

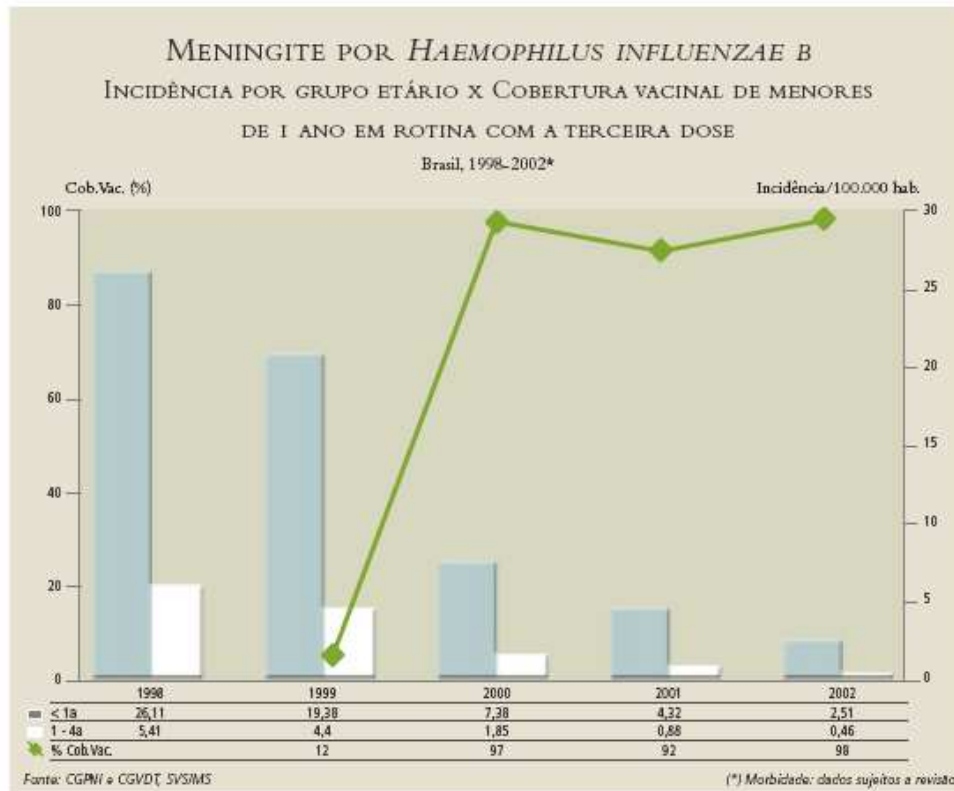


Figura 1.2 – Incidência por grupo etário X cobertura vacinal - Meningite por *Haemophilus influenzae B* no Brasil no período de 1998-2002 (MS, 2003).

É inquestionável a importância mundial da vacina Hib na prevenção de doenças invasivas como meningite. Há, entretanto um déficit mundial, pois apesar da recomendação da PAHO na sua utilização, em 2006, apenas 26% das crianças no mundo receberam a vacina Hib (Morris, 2008). Isto demonstra o potencial que Biomanguinhos como produtor de vacinas tem atualmente em relação ao mercado interno e futuramente ao mercado externo, no combate ao *Haemophilus influenzae* tipo b.

Atualmente no Brasil, a vacina Hib conjugada tem sido administrada ao mesmo tempo com a vacina DTP (Ribeiro, 2007) sendo esta fornecida por Biomanguinhos e distribuída pelo Ministério da Saúde. Recomendado pelo calendário de imunização, crianças abaixo de 12 meses de idade recebem três doses, sendo administradas no segundo, quarto e sexto meses de idade (Ribeiro, 2007).

1.2. Implantação da produção da vacina Hib em Biomanguinhos

Em 1999, por contrato de transferência de tecnologia com a Glaxosmithkline, Biomanguinhos/Fiocruz iniciou o fornecimento da vacina conjugada contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) ao Programa Nacional de Imunizações (MS, 2003).

O processo de transferência de tecnologia foi realizado com treinamento de todos os funcionários envolvidos com as etapas de produção, engenharia, controle e garantia da qualidade. A transferência de produção foi gradativa até ser finalizada em maio de 2005, onde foram produzidos os três primeiros lotes nacionais de consistência para estudos clínicos que foram realizados em 2006, com a participação voluntária e o acompanhamento de mil crianças em cinco centros municipais de saúde da cidade do Rio de Janeiro. Em setembro, foi finalizado o trabalho de campo, iniciando-se a tabulação e a análise dos resultados. A conclusão obtida neste estudo demonstrou que não há diferença na eficácia da vacina produzida em Biomanguinhos quando comparado com a vacina produzida com concentrado de Hib importado (Biomanguinhos, 2007).

Biomanguinhos é atualmente um dos maiores fornecedores de vacinas para o Ministério da Saúde, tendo 47% de participação no mercado público nacional. Considerando apenas os produtores nacionais, responde hoje por 56% da demanda do governo. Em relação à Hib, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos atenderá à totalidade da demanda do Programa Nacional de Imunizações (PNI), cujo montante está avaliado em torno de 12 milhões de doses por ano da vacina tetravalente (Biomanguinhos, 2007).

1.3. Material de referência (MR)

Segundo o ISO GUIA 30:2000, e o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM:2005), **material de referência** é um material ou substância que possui um ou mais valores de propriedade que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para serem usados na calibração de um equipamento, na avaliação de um método de medição ou atribuição de valores a materiais.

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) destaca que os materiais de referência são importantes ferramentas na determinação de muitos aspectos da qualidade de medição e são utilizados para fins de validação de método, calibração, estimativa da incerteza de medição, treinamento e para fins de Controle de Qualidade Interno (CQ) e Garantia de Qualidade Externa (GQ).

Materiais de referência “*in-house*”, frequentemente referenciados como material referência de trabalho, material de verificação, padrão de controle de qualidade ou padrão de trabalho secundário, são produzidos no próprio laboratório e requeridos para uso no dia a dia

de acordo com o “Guideline for the *in-house* production of reference materials” (LGC/VAM/1998/40).

Portanto, a elaboração e produção de material de referência devem ser realizadas, considerando-se as necessidades dos usuários (dos laboratórios envolvidos) e as limitações existentes quanto à manutenção das características do material de referência para todos os testes envolvidos.

De acordo com o Inmetro, os ISO GUIAS (International Organization for Standardization) reconhecem duas classes de materiais: Material de Referência Certificado e Material de Referência. Para material de referência, basta que seus resultados sejam homogêneos e bem estabelecidos.

1.4. Material de referência certificado (MRC)

No ISO GUIA 30:2000, o MRC é descrito como sendo um material de referência, acompanhado por certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual valores de propriedades são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido.

Um MRC deve ser apropriado para o papel rigoroso que ele desempenha no armazenamento e na transferência de informações de valores de propriedade medidos. Os seguintes critérios técnicos (critérios legais ou comerciais também podem ser relevantes) se aplicam em geral à adequação do uso dos MRC (ISO GUIA 33:2002):

- a) O próprio MRC e os valores de propriedade a ele incorporados devem ser estáveis por um período de tempo aceitável, sob condições realistas de armazenamento, transporte e utilização;
- b) O MRC deve ser suficientemente homogêneo, para que os valores de propriedade medidos em uma porção do lote se apliquem a qualquer outra porção do lote dentro de limites aceitáveis de incerteza. Em casos de não homogeneidade de um lote grande, pode ser necessário certificar cada unidade do lote separadamente;
- c) Os valores de propriedade de um MRC devem ter sido estabelecidos com uma incerteza suficiente para utilização final do MRC.
- d) Deve estar disponível documentação clara relativa ao MRC e seus valores de propriedade estabelecidos. Os valores de propriedade devem ter sido certificados, de modo que a documentação inclua um certificado, elaborado de acordo com o ISO GUIA 31:2000.

Sempre que possível, recomenda-se que a medição de um dado valor de propriedade seja realizada através de um método com as características definidas pela validação ou pelo uso de padrões rastreáveis, com a incerteza desprezível, relativa aos requisitos da utilização final e por meio de instrumentos de medição, que sejam rastreáveis aos padrões nacionais de medição. A utilização subsequente de um MRC, com propriedades rastreáveis, assegura que a rastreabilidade seja propagada até o usuário. Como os padrões nacionais de medição são em sua maioria harmonizados internacionalmente, convém que os padrões de medição em um país sejam compatíveis com padrões similares em outro país. Em muitos casos, os MRC são apropriados para as intercomparações de padrões nacionais de medição (ISO GUIA 33:2002).

1.5. Material de referência internacional (MRI)

É um material de referência obtido após a realização de um estudo colaborativo internacional e se estabelece com a finalidade de unificar em todo o mundo a terminologia e a transmissão de uma unidade de medida (CIM, 2004). O WHO estabeleceu o primeiro padrão internacional de PRRP, elaborado pelo NIBSC, com estudo colaborativo de laboratórios de diversos países (Mawas F, 2007). O certificado deste MRI encontra-se em anexo na parte final da dissertação.

1.6.ISO guias

A produção de material de referência e material de referência certificado são norteados pelos ISO guias da série 30 a 35.

O ISO GUIA 30:2000, trata dos termos e definições relacionados com materiais de referência. Segundo este guia os MR e MRC permitem transferir valores de grandezas medidas ou atribuídas de um lugar para outro. Eles são largamente utilizados para a calibração de instrumentos de medição, para a avaliação de métodos de análise ou de ensaio e para a garantia da qualidade de medições. Este Guia recomenda os termos e os significados que devem ser associados a eles quando relacionados com materiais de referência, com atenção particular aos termos que são usados nos certificados de materiais de referência e nos relatórios de certificação correspondentes.

O ISO GUIA 31:2000 trata do conteúdo de certificados de materiais de referência. Devido a peculiaridades de cada material de referência, a quantidade de informações do certificado de material de referência varia consideravelmente. No entanto, o Guia ressalta que o certificado deve comunicar as informações sobre um MR do produtor ao usuário, isto é, deve declarar os valores de propriedade certificados, seus significados e limites de confiança. Além disso, deve descrever a natureza geral e uso do MR e assegurar a sua integridade ao usuário.

O ISO GUIA 33:2002, ressalta a importância do papel dos materiais de referência certificados na ciência da medição. O uso destes materiais assegura a rastreabilidade das medidas desde que seja empregado com a devida atenção em relação à matriz e aos parâmetros ensaiados.

O ISO GUIA 34:2004, trata dos requisitos gerais para a competência dos produtores de materiais de referência. Este Guia faz referência ao sistema da qualidade que deve estar implantado no laboratório que pretende produzir um MR, a política da qualidade, da documentação e controle de informações, uso de colaboradores e requerimentos técnicos e de produção. Todas as etapas que devem ser cumpridas por um produtor de material de referência estão descritas neste documento.

O ISO GUIDE 35:2003, descreve o tratamento estatístico aplicado na certificação dos materiais de referência. Este documento delinea as etapas para a produção do material de referência, desde o planejamento do projeto, envolvendo as questões relacionadas com a possibilidade de produção do MR, a preparação da amostra, estudo de homogeneidade, estudos de estabilidade que podem ser de longo e curto tempo. Além disso, trata da caracterização do MR e da estimativa do cálculo de incerteza associado ao parâmetro em questão.

1.7. O cenário de materiais de referência no Brasil

Em abril de 2008, ocorreu no INCQS/FIOCRUZ a II Oficina sobre Ensaio de Proficiência e Produção de Materiais de Referência no Brasil. Os organizadores do evento foram, além do INCQS, o Inmetro e a CIENTEC. O alvo deste encontro foi dar continuidade à discussão iniciada na I Oficina, ocorrido em dezembro de 2003, sobre material de referência e ensaios de proficiência entre usuários, produtores e organizadores de ensaios de proficiência e órgãos acreditadores em busca de melhorias e integração. Um dos pontos altos neste encontro foi a discussão sobre a obtenção de padrões ou materiais de referência que atendam a necessidade do usuário. Padrões caros, dificuldades na importação como tempo, garantia de armazenagem adequada durante o transporte, atrasos devido a greves da receita federal, além da falta de dados técnicos como informações sobre determinação da incerteza, foram alguns dos principais problemas levantados por grande parte dos usuários. Outra dificuldade levantada é a não aceitação de organismos internacionais sobre uma nova certificação do material adquirido pelo usuário quando o mesmo atinge a data de validade, apesar da existência de resultados que comprovem a sua estabilidade. A recertificação, em geral, é aceita quando o próprio produtor realiza o processo. O Inmetro tem se sensibilizado com as

dificuldades do usuário e para minimizar estas questões vem se preparando para acreditar, em curto prazo, os produtores de material de referência.

Outro evento de grande importância para o Brasil realizado em junho de 2008 foi o seminário sobre “Acreditação de Provedores de Ensaios de Proficiência e Produtores de Material de Referência” promovido pelo SBM e Inmetro. Palestrantes de órgãos internacionalmente reconhecidos estiveram neste evento e demonstraram sua experiência sobre o tema. Os ISO Guias relacionadas a Material de Referência foram citadas pelo Dr. Adriaan Van der Veen - NMI /Netherlands, presidente do comitê da ISO REMCO. Ele ressaltou que está em fase de desenvolvimento o ISO Guide 80, voltada para material de referência “*in house*”. No momento este guia é um draft na qual não foi possível o acesso. Também está em desenvolvimento, a norma ISO 79 que apresenta uma visão geral sobre os requisitos de material de referência (produção e uso). Estas normas poderão contribuir substancialmente para a implementação da produção de materiais de referência “*in house*”, como neste caso em particular.

Segundo Dr. Thomas Steiger - BAM/Germany, COMAR é um banco de dados de MR que contém mais de 11.000 MR fornecidos por 24 países através de institutos como BAM, CANMET, CENAM, IRRM. Neste banco de dados está disponível, também, os MR biológicos.

As considerações técnicas e econômicas para desenvolvimento do “MRC” foram citadas pelo Dr. Robert Watters, do NIST. Ele ressaltou a importância da rastreabilidade para o desenvolvimento e produção de um MRC, sendo de vital importância o estudo da homogeneidade para a variabilidade do lote.

No Brasil, atualmente, existe um esforço por parte do órgão acreditador, Inmetro, para acreditar instituições produtoras de material de referência para atender as necessidades dos laboratórios.

1.8. Caracterização, estudos de homogeneidade e estabilidade

De acordo com os guias ISO 30-35, os MR são caracterizados com relação à homogeneidade, estabilidade e o(s) valor(es) de propriedade certificado(s). Para o Controle de Qualidade Interno (CQI), entretanto, o último requisito pode ser relevado, porém, a homogeneidade e estabilidade adequadas são consideradas critérios essenciais (Inmetro, 2005).

1.8.1. Caracterização

A caracterização de um material de referência é o processo de determinação de valores de propriedade do MR como parte da certificação do processo. Na certificação do lote produzido, a caracterização refere-se a valores próprios do lote (ISO GUIDE 35:2003).

1.8.2. Homogeneidade

Homogeneidade é a condição de uniformidade de estrutura ou composição com respeito a uma ou mais propriedades especificadas. Um material de referência é dito homogêneo com respeito a uma determinada propriedade, se o valor da propriedade, determinado por ensaios em amostras de tamanho determinado, se encontra dentro dos limites de incerteza especificados. As amostras podem ser tomadas de embalagens diferentes (frascos, pacotes e etc.) ou de uma única embalagem (ISO GUIA 30:2000).

O estudo de homogeneidade de um lote de material de referência é necessário para demonstrar que as unidades de lote são suficientemente homogêneas entre elas. Garantir a qualidade é tão importante quanto determinar a variação existente no lote entre frascos, sendo este um componente de incerteza que pode ser incluído na incerteza estimada como valor próprio da incerteza do material de referência certificado (ISO GUIDE 35:2003).

1.8.3. Estabilidade

Estabilidade é a capacidade do material de referência de manter o valor de uma determinada propriedade dentro dos limites especificados por um período de tempo pré-estabelecido, quando estocado nas condições específicas (ISO GUIA 30: 2000).

O ISO GUIDE 35 que orienta sobre a certificação de material de referência, estabelece dois tipos de estudo de estabilidade a serem considerados na certificação:

- Estabilidade de longa duração em tempo real – O estudo é realizado para verificar o comportamento do material, visando definir o prazo de validade, período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. O acompanhamento em tempo real permite a utilização do material no período de avaliação da sua estabilidade. Para estas situações, a validade fica determinada “em andamento” e a verificação é feita de acordo com o planejamento do projeto para MR;
- Estabilidade acelerada – Estudo projetado para acelerar a degradação do material, avaliando o impacto de curtas exposições a condições fora das estabelecidas para o armazenamento do produto, que eventualmente possam ocorrer durante o transporte ou dano no equipamento de estocagem do material (freezer ou geladeira).

De acordo com a ISO GUIDE 35, há duas formas de realizar o estudo de estabilidade: estudo de estabilidade clássico e o estudo de estabilidade “isochronous”.

No estudo de estabilidade clássico, as amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (preparação do lote) em idênticas condições, entretanto as medições são realizadas em tempos diferentes, prevalecendo condições de reprodutibilidade. Isto acarreta um aumento significativo na incerteza, pois inclui o fator de instabilidade do sistema de medição.

O estudo de estabilidade “isochronous” permite realizar as medições sob condições de repetitividade. Como consequência, a incerteza apresentada por este estudo é menor do que no estudo clássico, entretanto, um conhecimento prévio sobre o tempo de degradação do material em estudo é requerido.

1.9. Estimativa da incerteza de medição associada ao MR

Para certificação do MR, de acordo com o ISO GUIDE 35, a incerteza pode ser expressa, considerando-se os seguintes itens:

- incerteza do valor obtido para o lote produzido (caracterização);
- transferência para os frascos (envase) do material (homogeneidade);
- tempo e temperatura de estoque (estabilidade a longo prazo).
- tempo de entrega ao usuário – simulação de aumento de temperatura quando em transporte (estabilidade a curto prazo);

As fontes de incerteza que influenciam no resultado analítico podem ser representadas no diagrama de causa e efeito, mais conhecido como diagrama de Ishikawa.

No exemplo da figura 2, as principais fontes de incerteza associadas à atribuição de um valor a um material de referência envolvem as incertezas da caracterização nominal (u_{charac}), da homogeneidade (u_{bb}) e da estabilidade (u_{sts}), sendo C_o o mensurando e u_{Comb} a incerteza combinada.

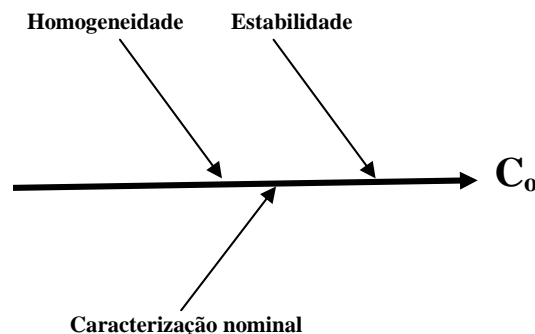


Figura 1.3 - Diagrama de causa-efeito

A incerteza combinada, u_{Comb} , é obtida pela equação 1:

$$u_{Comb} = \sqrt{u_{Charac_o}^2 + u_{bb}^2 + u_{sts}^2} \quad \text{Equação 1}$$

e $U = u_{Comb} \times k$; onde k é o fator de abrangência para um determinado grau de confiança.

2. Material de referência candidato: polirribosil-ribitol fosfato (PRRP)

2.1. Características do PRRP

O polissacarídeo capsular da *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um imunógeno utilizado comercialmente em formulações de vacina Hib. Este polissacarídeo é um polímero linear com unidades de repetição [3β-d- Ribf –(1→1)-d- ribitol-5-P-(O →)_n (PRRP)], figura 2.1.

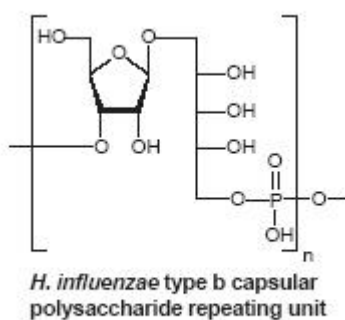


Figura 2.1 - Estrutura Química do PRRP (Verez-Bencomo:2004)

2.2. Seleção do PRRP para material de referência

O PRRP é avaliado por métodos preconizados pela Farmacopéia Européia e recomendações da produção e controle da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b conjugada da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000).

A escolha do PRRP como material de referência se deve aos seguintes fatores:

1. O custo do padrão fornecido pelo NIBSC e a quantidade disponível.
2. A validade do PRRP (cinco anos estabelecida pela GSK);
3. A facilidade do uso do PRRP nas análises em relação à vacina Hib;
4. A abrangência em relação à(s) técnica(s) que podem ser utilizadas para ensaios em comum com a vacina Hib e com o polissacarídeo conjugado à proteína monomérica Tetânica (PSTT), outro produto intermediário.

Os métodos utilizados no controle de qualidade, eleitos neste projeto para utilização do PRRP como material de referência são:

- Método colorimétrico de determinação do conteúdo de D-ribose - método de Bial (Ashwell 1957, Kabat 1961).

Neste método o grau de pureza do polissacarídeo pode ser estimada pela medição da concentração de D-ribose. O conteúdo de D-ribose não pode ser menor que 32% em relação à massa seca do polissacarídeo, que é determinado pela reação de Bial para pentose, usando D-ribose como um padrão (WHO, 2000).

- Método colorimétrico para determinação do conteúdo de fósforo - Método de Chen (Chen, 1956)

Neste método, o fosfato forma com o molibdato de amônio um complexo fosfomolibdico que, quando reduzido, desenvolve uma coloração azul, que é medido espectrofotometricamente. O conteúdo teórico de fósforo de 8,4% e a especificação 6,8 a 9,0% calculado sob massa seca são os valores aceitáveis (WHO, 2000).

Estes métodos foram escolhidos, pois são dois parâmetros que oferecem dados sobre o grau de homogeneidade de alguns deles e informação da estrutura química do polissacarídeo.

Abaixo segue o Quadro 2.1 com as especificações para os produtos intermediários (PRRP e PSTT) e para a vacina Hib, considerando-se cada método empregado.

Quadro 2.1 – Correlação entre ensaios físico-químicos de produtos e intermediários da vacina Hib.

Ensaio físico-químico	PRRP	PSTT	Vacina Hib	Especificações	Situação
Conteúdo de D-ribose (método de Bial)	Realizado	Realizado	Realizado	PRP: $\geq 32\%$ PSTT: a ser quantificado Vacina Hib: 10 a 15 mg/dose	Método validado e equipamento qualificado
Conteúdo de fósforo (Método de Chen)	Realizado	Não	Não	PRRP 6,8 - 9,0% (p/p)	Método validado e equipamento qualificado

Caso o material candidato seja adequado para uso como material de referência, ele poderá ser utilizado nos ensaios de rotina do Controle de Qualidade do LAFIQ, no laboratório

de controle de processos do DEBAC e pelo INCQS que realiza controle de vacinas para liberação pela ANVISA.

O Departamento de Vacinas Bacterianas (DEBAC) de Biomanguinhos, responsável pela formulação da vacina Hib e produtos intermediários, produziu em 2008, aproximadamente 50 lotes de PRRP, PSTT e Vacina Hib.

O material de referência produzido neste estudo, se estável, está programado para ser utilizado por 5 anos, período considerando a validade do PRRP. Entretanto, reforça-se que o prazo estabelecido deve ser confirmado através do estudo de estabilidade, já que esta validade estimada ainda não foi comprovada para o PRRP em solução aquosa.

3. Requisitos para o planejamento de um material de referência

O material de referência *in house* deve ser estabelecido de acordo com a necessidade levantada pelo laboratório e considerando-se as características do material candidato à material de referência. O planejamento deve conter no mínimo, os requisitos descritos nos itens 3.1 e seus sub-itens. Qualquer alteração referente ao planejamento deverá ser justificada (ILAC:1998).

3.1. Itens para a elaboração de um material de referência

De acordo com ILAC:1998, os produtores de materiais de referência devem criar, implementar e manter um sistema de gestão da qualidade adequado a extensão das suas atividades, incluindo o tipo, faixa e magnitude do material de referência produzido em comprometimento a tais quesitos.

Deve ser incluído na política de qualidade também o compromisso de produzir o material de referência de acordo com as definições das normas vigentes, onde valores de propriedade são assegurados utilizando técnicas estatísticas aceitáveis.

3.1.1. Objetivo de uso do material de referência

Verificar qual a finalidade do material de referência em elaboração, para qual propósito ele foi desenhado, quais os testes a serem realizados (quais as características relevantes para que ele possa ser utilizado como MR).

3.1.2. Definição de concentração e quantidade

Através de avaliações junto às equipes que requerem o uso do material de referência, definir a quantidade e concentração ideal para uso pelo requisitante.

3.1.3. Garantia da integridade do material de referência

De acordo com o Inmetro:2005, dois critérios essenciais para estabelecer o material de referência são os testes de homogeneidade e estabilidade. Para tal devem ser estabelecidas quantidades de amostras utilizadas no estudo, temperatura e tempo para os quais o material deverá ser avaliado.

3.1.4. Documentação

Todo material de referência elaborado deve seguir os procedimentos padronizados (POP ou IT), definidos pelo produtor do MR.

3.1.5. Identificação da amostra

Definir regras para determinação de seu nome e codificação, para o correto reconhecimento do material.

3.1.6. Procedimento de preparação e envase

Seleção da metodologia para o preparo e envase do material de referência, bem como a escolha dos recipientes onde serão acondicionados os materiais produzidos.

3.1.7. Fator econômico

Avaliar as necessidades internas e do mercado externo, verificar os custos de implantação, escala de produção, gastos com materiais e matérias-primas, padrões para rastreabilidade, gastos relativos às técnicas e aos números de repetições envolvidas e técnicas complementares.

3.1.8. Avaliação dos resultados

O uso de ferramentas estatísticas adequadas para avaliação dos resultados e a estimativa da incerteza de medição do material preparado são essenciais para definir seu potencial como material de referência.

3.1.9. Certificado

Documento que acompanha um MRC, declarando um ou mais valores de propriedades e suas incertezas e confirmando que os procedimentos necessários foram realizados para assegurar sua validade e rastreabilidade (ISO GUIA 31:2000).

O conteúdo mínimo de um certificado deve ser:

- Propriedade(s) de interesse;
- Seus valores;
- Suas incertezas;
- Descrição da rastreabilidade metrológica concebida ao material e dos valores de propriedade do MR;
- Finalidade de utilização;
- Data de validade (período de validade);

- Instruções de uso
- Condições de estocagem apropriada;
- Número de identificação do lote.

4. Planejamento técnico do MR PRRP

Nesta etapa, define-se o planejamento de todos os itens necessários para o material em questão. Abaixo, a figura 4.1 apresenta um esquema demonstrando a seqüência de etapas de preparação do MR.

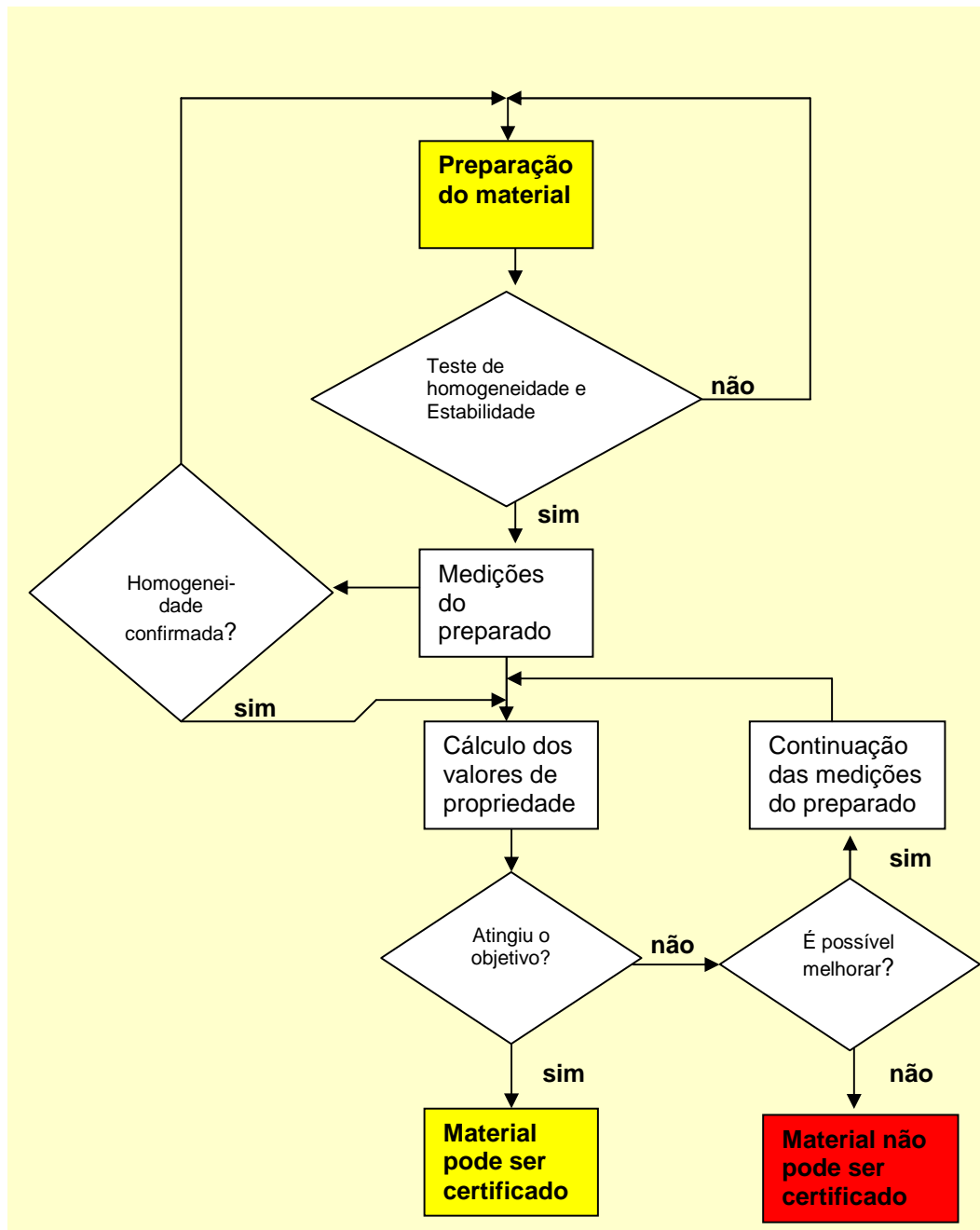


Figura 4.1 - Esquema experimental do Preparo do material de referência (ISO GUIDE 35:2003).

4.1. Preparo do material candidato a MR

4.1.1. Concentração e quantidade

Para utilização do PRRP como material de referência, optou-se por trabalhar em solução aquosa, pois o PRRP é um polímero sólido de difícil partição e dificulta o processo de preparo de amostras individuais.

O material será preparado em batelada utilizando-se em torno de 1,000g do PRRP para 2L em balão volumétrico. A concentração final da solução de PRRP obtida será de aproximadamente 0,5 mg/mL.

A tabela 4.1 apresenta as quantidades necessárias para realização dos testes. Elas foram determinadas pela GSK, durante o processo de transferência de produção e controle da vacina contra Hib.

Tabela 4.1- Concentração de PRRP para os testes de D-ribose e fósforo

Teste	Concentração do MR para o teste	Quantidade utilizada no ensaio	Procedimento de diluição	Volume do MR
D-ribose	0,05mg/mL	0,4mL x 2	Utilizar 1,0 mL da solução de 0,5 mg/mL e diluir para 10,0mL	1,0mL
Fósforo	0,5mg/mL	0,2mL x 2	---	0,4mL
Total	---	---	---	1,4mL

4.1.2. Envase

De acordo com orientações contidas no documento “Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and other Biological Reference Standards-WHO 2004”, o envase deverá ser realizado em uma sala limpa ou em cabina de fluxo laminar equipada com filtro HEPA (High Efficiency Particulate Arresting) para evitar qualquer forma de contaminação.

O volume de envase, nesta proposta, será de 4mL, totalizando aproximadamente 500 frascos, devidamente etiquetados e identificados.

Os frascos a serem utilizados são provenientes do DEPFI, cujo processo de limpeza e esterilização será o mesmo realizado para frascos de envase de vacinas injetáveis.

4.2. Caracterização

A caracterização será realizada de duas formas, a saber:

4.2.1. Estrutural

A identidade do PRRP será verificada com a utilização da Espectrometria de RMN (^1H , ^{13}C , heteronuclear, ^{31}P).

1) Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. Por meio desta técnica, têm sido realizados, ao longo dos anos, testes de identidade e pureza de polissacarídeos capsulares utilizados na produção de vacinas. Dentre eles, o PRRP Hib pode ser habilmente reconhecido, frente aos estruturalmente distintos polissacarídeos (Jones, 2000).

Na prática, o espectro RMN pode fornecer informações sobre contaminação existente no lote de PRRP Hib, natureza da degradação ou processos de ativação ao qual o material pode ter sido exposto.

Neste sentido, o NIBSC preconiza o emprego desta técnica, como teste de consistência entre lotes produzidos. Abaixo se encontram descritos os motivos para esta seleção:

1. o espectro registrado é específico para o PRRP Hib;
2. pode ser reproduzido para diferentes lotes formulados;
3. a comparação entre diversos produtores leva a espectros essencialmente idênticos;
4. o teste é robusto, frente a pequenas variações nas condições experimentais.

Sendo assim, a inclusão da espectrometria RMN como ferramenta na verificação da identidade do material em estudo, é relevante e consistente com a proposta deste trabalho.

Dentre as aplicações da técnica de RMN, a identidade é a mais conveniente para determinar a cadeia média do polissacarídeo, complementando as técnicas de dosagem (Lemercinier, 2000).

4.2.2. Nominal

Os conteúdos de D-ribose pelo método colorimétrico (Método de Bial) e de fósforo (método de Chen) serão ensaiados. Ambos são necessários para determinar a incerteza associada à caracterização.

4.3. Teste de homogeneidade

Para garantir a manutenção das propriedades físico-químicas do material investigado, o estudo da homogeneidade da amostra é um dos fatores preponderantes para demonstrar esta propriedade em uma amostragem representativa de frascos (unidades). Para assegurar esta qualidade, cada frasco deve ser avaliado e a incerteza da homogeneidade deve ser incluída na estimativa da incerteza de medição do valor de propriedade do material estudado. O número

de frascos depende do tamanho do grupo, de modo que o número das amostras escolhidas do grupo possa ser considerado "representativo" do grupo como um todo.

Assim o ISO GUIDE 35 será utilizada como referência para cada parâmetro estudado, de modo a disponibilizar uma análise crítica dos resultados previamente obtidos.

4.3.1. Procedimento para realização do teste de homogeneidade

Para testar a homogeneidade nos frascos e entre frascos, 15 frascos serão retirados aleatoriamente do lote envasado, utilizando-se a tabela de números aleatórios (anexo 1) para esta seleção.

Os frascos serão enumerados de 1 a 15 e os ensaios (conteúdo de D-ribose e de fósforo), serão realizados em triplicata para cada frasco.

4.4. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade será utilizado para determinar o prazo de validade e condições de armazenagem ideais e verificar a estabilidade do material em um curto espaço de tempo, sob condições não ideais.

Para o planejamento do estudo de estabilidade do candidato a MR, além das normas ISO 30 a 35 sobre material de referência, será utilizada, também, o guia do ICH sobre testes de estabilidade para produtos biológicos (ICH, 1995). Esta norma ressalta que produtos biológicos têm datas de validade que diferem de acordo com a sua origem. O planejamento do estudo deve considerar a expectativa relacionada ao produto, ou seja, ao seu histórico. Como diretriz, o ICH recomenda que:

- Produtos com validade estimada de 1 ano ou menos deverão ser ensaiados mensalmente para os primeiros 3 meses e posteriormente em intervalos de 3 meses.

- Produtos com propostas de validade de mais de 1 ano, devem ter seus estudos realizados a cada 3 meses durante o primeiro ano de armazenamento, a cada 6 meses durante o segundo ano e anualmente.

4.4.1. Planejamento para estudo de estabilidade a longo prazo

Como citado anteriormente, o PRRP possui validade estimada de 5 anos, estocado a -20°C. Com base nesta informação, a estabilidade do material será avaliada a temperatura de 4°C, -20°C e -70°C (Mawas, 2007), durante o período de 5 anos.

Para este trabalho, o candidato a MR será avaliado mensalmente, por um período de 6 meses. A tabela 4.2 apresenta os parâmetros e os tempos (T (mês)) em que as amostras serão analisadas.

Tabela 4.2 - Planejamento para estudo de estabilidade (mês).

Testes	T0 Mês 0	T1 Mês 1	T2 Mês 2	T3 Mês 3	T4 Mês 4	T5 Mês 5	T6 Mês 6	T9 Mês 9	T12 Mês 12	T18 Mês 18	T24 Mês 24	T36 Mês 36	T48 Mês 48	T60 Mês 60
D-ribose %														
Fósforo %														

O estudo de estabilidade será acompanhado por 5 anos ou até a verificação de degradação do material. Como foi citado anteriormente, neste projeto serão relatados e avaliados somente os resultados obtidos durante os **6 primeiros meses** devido à limitação de tempo.

4.4.2. Estudo de estabilidade acelerado

Este estudo tem por objetivo verificar o comportamento do material sob “condições de transporte”. É importante saber o que acontece com o material, se as condições necessárias para transporte não forem obedecidas (ISO GUIDE 35:2003). De acordo com as diretrizes constantes no documento: “Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (2004, WHO), o estudo de estabilidade acelerado deve considerar temperatura semelhante ou superior à temperatura de entrega do material de referência, visando observar a ocorrência de degradação do produto em temperaturas não ideais de armazenagem (por exemplo: 20°C ou 37°C). Para este estudo, foram selecionadas as temperaturas de 25°C e 37°C, pois são as temperaturas utilizadas para estudo de estabilidade de vacinas produzidas em Biomanguinhos, considerando-se a média da temperatura ambiente de regiões tropicais.

O estudo de estabilidade a curto prazo ou acelerado será realizado no período de 2 meses (8 semanas), com os testes realizados semanalmente, segundo o planejamento apresentado na tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Planejamento para estudo de estabilidade acelerado.

testes	T1 Semana1	T2 Semana2	T3 Semana3	T4 Semana4	T5 Semana5	T6 Semana6	T7 Semana7	T8 Semana8
D-ribose: %								
Fósforo: %								

5. Ferramentas estatísticas para avaliação de um material de referência

Nesta etapa, definiram-se quais as principais ferramentas estatísticas para cada etapa do processo de elaboração do material de referência.

5.1. Avaliação estatística dos resultados de homogeneidade

A homogeneidade será analisada entre frascos e para cada frasco. A comparação de médias pertencentes a diferentes frascos, bem como em cada frasco, será obtida através da análise de variância (ANOVA).

No resumo da análise de variância, conforme a tabela 5.1, pode-se fazer a comparação entre o valor de $F_{calculado}$ e o $F_{tabelado}$ (crítico). Caso o mesmo seja inferior ao crítico, pode-se considerar o material homogêneo para 95% de significância.

Tabela 5.1. Análise de Variância.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>Gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-p</i>	<i>F crítico</i>
Entre frascos						
Nos frascos						
Total						

onde SQ: soma quadrática, gl: graus de liberdade, MQ: média quadrática.

5.2. Avaliação estatística dos resultados de estabilidade

5.2.1. Reprodutibilidade interna

A reprodutibilidade interna, também denominada precisão intermediária, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando-se o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos (Inmetro, 2007).

A avaliação foi realizada através do coeficiente de variação (CV) de cada teste a cada temperatura do estudo.

O cálculo do CV é feito da seguinte forma:

$$CV(\%) = \frac{s}{\text{média}} * 100 \quad \text{equação 2}$$

Onde:

s é o desvio padrão

O valor de CV obtido deve ser < 5% para ser considerado reprodutível (Anvisa, 2003).

5.2.2. Análise de tendência por modelo empírico de regressão linear

A principal forma de avaliação da estabilidade recomendada pelo ISO GUIDE 35 é o uso de análise de tendência (trend analysis). O primeiro passo para avaliação dos dados para o estudo de estabilidade é verificar qualquer tendência dos dados que possam ser observados. Para pequenos problemas de instabilidade onde o mecanismo básico é desconhecido, uma aproximação linear através de um modelo empírico é aceitável. Neste estudo, não há modelo físico-químico que poderia realmente descrever o mecanismo de degradação para o material de referência em estudo.

O modelo empírico para estudo de estabilidade pode ser expresso como:

$$\psi = \beta_0 + \beta_1 \Xi + \varepsilon \quad \text{equação 3}$$

Onde β_0 e β_1 são coeficientes de regressão e ε denota o componente de erro randomizado.

O componente de erro randomizado, ε , pode ser composto somente pelo erro randômico, mas também pode conter um ou mais fatores sistemáticos. No caso de estudo de estabilidade, x é o tempo e y é o valor de propriedade do candidato a material de referência.

O valor obtido de caracterização é o intercepto deste modelo (T_0), onde a sensibilidade não pode ter diferença significante de zero.

O cálculo da sensibilidade é realizado da seguinte forma:

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}}) * (y_i - y_{\text{média}})}{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}})^2} \quad \text{equação 4}$$

Onde $y_{\text{média}}$ = média dos resultados e $x_{\text{média}}$ = média do tempo

O intercepto é calculado da seguinte forma:

$$b_0 = y_{\text{média}} - b_1 x_{\text{média}} \quad \text{equação 5}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2} \quad \text{equação 6}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{média}})^2}} \quad \text{equação 7}$$

$s(b_1)$ é o desvio ou incerteza associada à sensibilidade (slope).

A avaliação da sensibilidade deve ser feita da seguinte forma:

$$|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$$

onde o valor de *t-Student* (t) para $n-2$ graus de liberdade e $P=0,95$ (95% nível de confiança).

Se a condição da expressão acima for obedecida, a sensibilidade é insignificante. Como consequência, não há instabilidade observada.

5.2.3. Análise de resíduos

Chama-se resíduo de um modelo de regressão a diferença entre o valor observado e o valor estimado da variável independente representado por:

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{equação 8}$$

Onde o valor e_i representa o erro através da diferença entre o resultado obtido e o valor previsto através da regressão linear.

Através da análise de resíduos verifica-se que os erros têm distribuição aproximadamente normal, com variância constante. Se os erros forem distribuídos normalmente, então aproximadamente 95% dos resíduos padronizados cairão no intervalo $[-2,+2]$. Se os valores estiverem muito longe desta faixa, pode ser indicativo da instabilidade da amostra ou presença de *outliers*, o que poderia ser uma observação atípica do restante dos dados (Montgomery, 2002). Entretanto sua existência deve ser avaliada para verificar se a fonte de erro é proveniente do material.

Para cálculo do resíduo padronizado ou resíduo padrão, utiliza-se a seguinte equação:

$$\text{Resíduo padrão} = \frac{e_i}{\sqrt{MQE}} \quad \text{equação 9}$$

onde

e_i - resíduo

$$\text{MQE (média quadrática do resíduo)} = \frac{\sum (e_i - e_{\text{média}})^2}{n - 2} \quad \text{equação 10}$$

5.3. Estimativa da incerteza de medição

O conceito de incerteza como um atributo quantificável é relativamente novo na história da medição, embora erro e análise tenham sido, há muito, uma parte da prática da ciência da medição ou metrologia. O resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando e desta forma é necessária a inclusão da incerteza de medição para que a expressão torne-se completa (ABNT Inmetro:2003).

Segundo o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, a incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição e é caracterizada como a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando.

Para se estimar a incerteza global (incerteza padrão combinada, $u_c(y)$) deve-se levar em consideração a contribuição de todas as fontes de incerteza, denominadas de componentes de incerteza padrão, durante o processo de medição. Para se obter a incerteza expandida, U , multiplica-se a incerteza padrão combinada por um fator de abrangência, k , que garante um intervalo de confiança dentro do qual acredita-se estar o valor verdadeiro do mensurando. No Guia EURACHEM (1999), frequentemente usa-se o valor de $k=2$, para um nível de confiança de aproximadamente 95%, e uma distribuição normal de probabilidade.

Os componentes da incerteza podem ser classificados em dois tipos: Tipo A, cuja avaliação é realizada através de análise estatística de uma série de observações da grandeza medida (condição de repetitividade) e Tipo B, quando se assume que cada grandeza de entrada tem uma distribuição e um intervalo de dispersão. Além disto, as distribuições podem ser classificadas em uniforme, retangular, triangular, normal, etc. Assim, através de cada fonte de incerteza pode-se estimar a incerteza padrão combinada (u_c). No entanto, a combinação somente poderá ser realizada através da incerteza padrão relativa, considerando-se que u_c , é a raiz quadrada da soma quadrática das incertezas padrão relativas de todos os componentes que contribuem para a estimativa da incerteza de medição.

A expressão geral da incerteza de medição é:

$$U = k \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\delta y}{\delta x}\right)^2 * u^2(x_i)} \quad \text{equação 11}$$

Onde:

U =incerteza expandida de medição

k =fator de abrangência usado para calcular a incerteza expandida

$$\frac{\delta y^2}{\delta x} = C_i \quad \text{equação 12}$$

C_i= coeficiente de sensibilidade = derivada parcial da função y (y =f(x₁, x₂,...x_i)) em relação a grandeza de entrada x_i .

u(x_i) = incerteza padrão da grandeza de entrada estimada x_i

O resultado de medição será expresso por y ± U, sendo y corresponde ao mensurando e U a incerteza expandida.

5.3.1. Fontes de incerteza

De acordo com a EURACHEM, a incerteza do resultado pode provir de muitas fontes possíveis tais como efeitos de matriz, condições ambientais, pureza dos reagentes, incerteza das massas e equipamentos volumétricos, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição.

Para determinação da incerteza do material de referência, as incertezas relacionadas ao método estão incluídas no componente de caracterização.

Abaixo encontram-se alguns exemplos de fontes de incerteza fornecidos pelos guias da Eurachem e ISO GUM:

- Menisco do balão volumétrico;
- Curva de calibração;
- Instrumento de pesagem;
- Condições ambientais de umidade relativa, pressão, temperatura;
- Resolução do equipamento;

5.3.2. Componentes de incerteza

Para estimativa da incerteza total, tratam-se cada fonte de incerteza separadamente para se obter a contribuição de cada fonte.

5.3.2.1.-Componente do tipo A (IQM,2009)

A Avaliação do tipo A (u_A) é utilizada para obter o valor de repetitividade ou aleatoriedade de um processo de medição em um dado momento.

Calcula-se a incerteza deste componente utilizando a seguinte fórmula:

$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{equação 13}$$

5.3.2.2 - Componente do tipo B (Stavale, 2005)

Podem ser estimados pelos seguintes fatores:

- Incerteza dos certificados de calibrações ou padrões (u_p)

As incertezas obtidas dos certificados dos padrões utilizados devem ter distribuição normal, com fator de abrangência (k) e nível de confiança de aproximadamente 95%.

O cálculo da distribuição é feito da seguinte forma:

$$u_p = \frac{U_{cc}}{k_{cc}} \quad \text{equação 14}$$

onde

U_{cc} = Incerteza expandida declarada no certificado de calibração ou do padrão.

k_{cc} = Fator de abrangência da incerteza declarada no certificado.

Pelo ISO GUM as incertezas devem estar na mesma probabilidade (68%) para proceder à expansão, através do k, para atingir o nível de confiança de 95%.

Os componentes de possuam certificados com valores de incerteza declarados como balanças, balões volumétricos, micropipetas, espectrofotômetro entre outros utilizados neste projeto, devem ter a incerteza determinada desta forma.

- Distribuição retangular (u_r)

Quando somente é possível assumir limites superiores ou inferiores do erro (efeito sistemático) de uma grandeza de influência sobre um mensurando, deve-se assumir que a sua distribuição é do tipo retangular. Utiliza-se este tipo de distribuição para resolução de balança e outros equipamentos analíticos.

O cálculo da distribuição é feito da seguinte forma:

$$u_r = \frac{a_i}{\sqrt{3}} \quad \text{equação 15}$$

onde:

a_i = metade do intervalo de tolerância da incerteza considerada.

- Distribuição triangular (u_i)

Esta distribuição é referente a equipamentos analógicos, ou para algumas vidrarias, por exemplo, a bureta, pois refere-se à tendência a um valor central e probabilidade próximo aos limites (IQM,2009).

$$u_i = \frac{a_i}{\sqrt{6}} \quad \text{equação 16}$$

- Erros sistemáticos não corrigidos (IQM,2009)

Idealmente, os erros de equipamento/instrumentos devem ser utilizados corrigindo-se o desvio dos valores relacionados ao material. Entretanto, quando não ocorrem, devem ser estimados e considerados como uma incerteza padrão e neste caso o divisor deve se igual a 1.

5.3.3. Graus de liberdade efetivos (v_{eff}) (INMETRO,2006)

Para estimar o valor de um fator de abrangência k correspondente a uma probabilidade de abrangência especificada, é necessário que seja considerado a contabilidade da incerteza padrão $u(y)$ da estimativa de saída y . Isto implica considerar o quão bem $u(y)$ estima o desvio padrão associado ao resultado da medição. Para uma estimativa do desvio padrão de uma distribuição normal, os graus de liberdade desta estimativa, que depende do tamanho da amostra na qual ela está baseada, é uma medida da contabilidade.

Para uma incerteza padrão u obtida de uma avaliação do Tipo A, ou seja, obtida através de uma série de observações, os graus de liberdade são dados por $v_{eff} = n - 1$.

Os graus de liberdade com uma incerteza padrão $u(x_i)$ obtida pela avaliação do Tipo B é mais complicada, entretanto, é uma prática comum efetuar tais avaliações de maneira a assegurar que qualquer sub-estimativa seja evitada. Se, por exemplo, os limites inferior e superior são estabelecidos, eles são usualmente escolhidos de tal forma que a probabilidade da grandeza em questão estar fora desses limites é de fato extremamente pequena. Sob a hipótese de que esta prática seja seguida, os graus de liberdade da incerteza padrão $u(x_i)$ obtidos de uma avaliação do Tipo B podem ser tomados como sendo $v_i \rightarrow \infty$.

Estimar os graus de liberdade efetivos v_{eff} da incerteza padrão $u(y)$, associada à estimativa de saída y a partir da fórmula de Welch-Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{u^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad \text{Equação 17}$$

onde os $u_i(y)$ ($i=1,2,\dots,N$), são as contribuições para a incerteza padrão associada à estimativa de saída y , resultante da incerteza padrão associada à estimativa de entrada x_i , que se admite sejam mutuamente independentes estatisticamente, e ν_i são os graus de liberdade efetivo da contribuição da incerteza padrão $u_i(y)$.

A obtenção do fator de abrangência k é feita através do quadro 5.1. Estes valores são baseados na distribuição- t avaliada para uma probabilidade de abrangência de 95,45%. Se ν_{eff} não for inteiro, o que é usualmente o caso, considerar ν_{eff} para o próximo menor inteiro.

Quadro 5.1 - Fatores de abrangência k para diferentes graus de liberdade ν_{eff}

ν_{eff}	1	2	3	4	5	6	7	8	10	20	50	∞
K	13,97	4,53	3,31	2,87	2,65	2,52	2,43	2,37	2,28	2,13	2,05	2,00

5.4. Procedimento para determinação da incerteza do MRC

De acordo com ISO Guide 35, é feita a determinação à incerteza do MRC da seguinte forma:

- Se expressa na relação entre o valor de propriedade a ser certificada e todas as contribuições nas quais o valor de propriedade depende matematicamente.
- Determina-se o valor de todas as contribuições, quer com base na análise estatística da série de dados ou por outros meios.
- Utilizam-se as incertezas padrão do tipo A e as principais do tipo B.
- Calcula-se o valor de característica a ser certificado.
- Determina-se a incerteza padrão combinada do valor de propriedade a partir das incertezas padrões e as covariâncias associadas com as contribuições, usando a fórmula de propagação.

O modelo utilizado para o processo de determinação da incerteza para certificação do lote pode ser visualizado na figura 5.1:

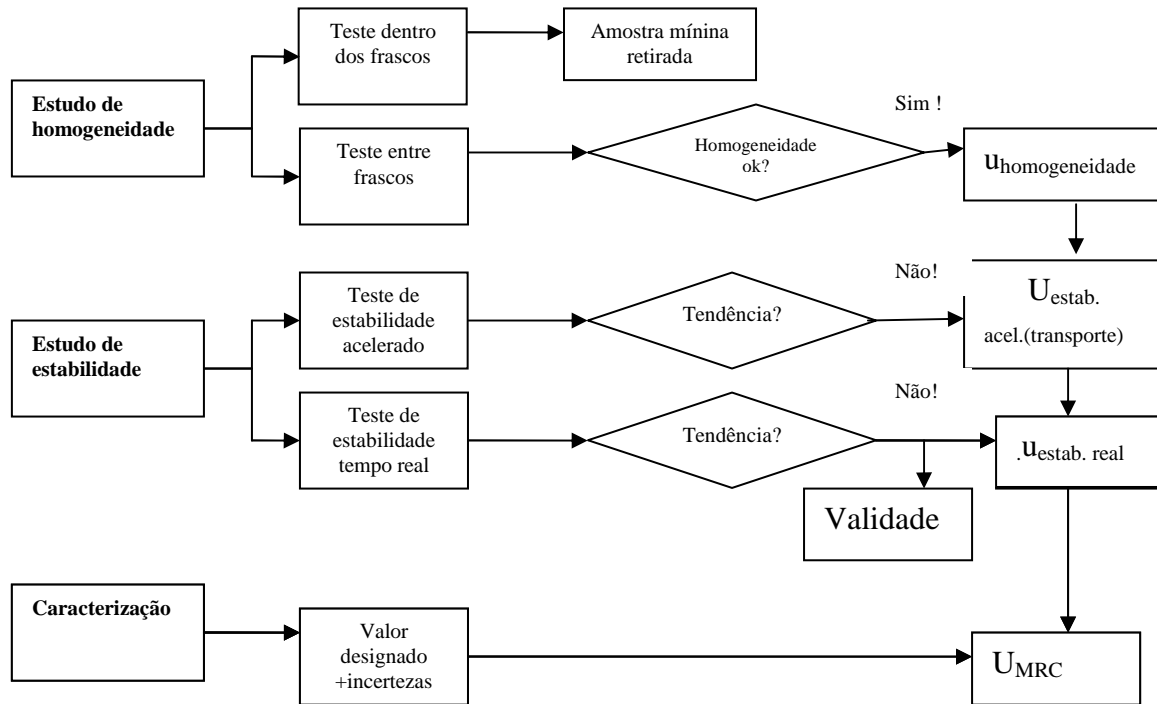


Figura 5.1 - fluxograma do processo de determinação da incerteza (Adriaan M.H.Van der Veen, 2001).

Neste trabalho será utilizado o modelo da figura 5.1, visando atender a norma ISO Guide 35. Este é o processo típico para estimativa de incerteza do material de referência. Outras abordagens experimentais são possíveis entretanto a linha de raciocínio para a estimativa da incerteza do valor próprio do de um material de referência permanece essencialmente a mesma.(Van der Veen, 4, 2001)

Após a verificação dos componentes de incerteza, a incerteza combinada padrão do MRC pode ser expressa por:

$$U_{MRC} = k\sqrt{(u_{caracterização}^2 + u_{homogeneidade}^2 + u_{armazenagem}^2 + u_{transporte}^2)} \quad \text{equação 18}$$

onde:

k= fator de abrangência para um nível de confiança de 95%.

Para cálculo da incerteza combinada padrão, realizou-se a avaliação de cada um dos componentes acima.

5.4.1. Cálculo do componente de incerteza da Caracterização

A caracterização é o processo de determinação do valor de propriedade do material de referência, como parte da certificação do lote. (ISO GUIDE 35,2003).

Para cálculo do componente de incerteza de caracterização, inclui-se as variáveis relacionadas ao processo de medição, como a pesagem da amostra, preparação, leitura,

pipetagem, entre outros. Portanto utilizou-se os valores de repetitividade (incerteza tipo A) e as incertezas relacionadas à medição (tipo B).

5.4.2. Cálculo do componente de incerteza de Homogeneidade

Seguindo o ISO GUIDE 35, a determinação do componente de incerteza deve ser determinado através da análise de variância.

Para o cálculo, há duas possibilidades:

Quando a média quadrática entre frascos for maior que a média quadrática dentro do frasco, utiliza-se:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{\frac{(M_{\text{Quadráticaentre frascos}} - M_{\text{Quadrática dentro dos frascos}})}{n}} \quad \text{equação 19}$$

Quando a média quadrática entre frascos for menor que a média quadrática dentro do frasco.

Neste caso utiliza-se a expressão:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt[4]{\frac{M_{\text{Dentro dos frascos}}}{n} * \frac{2}{(n-1)}} \quad \text{equação 20}$$

onde n = replicata

5.4.3. Componente de incerteza da estabilidade

De acordo com o ISO GUIDE 35, Para determinação deste componente, utiliza-se o desvio padrão da sensibilidade, denominado em $s(b_1)$ e o tempo utilizado.

$$u_{\text{estabilidade}} = s(b_1)(\text{desvio padrão calculado em análise de tendência}) \times \text{tempo} \quad \text{equação 21}$$

6. Rastreabilidade e confiabilidade

A busca pela melhoria dos métodos analíticos é constante. Garantir a confiabilidade de uma medição através do treinamento de analistas, validação dos métodos, uso de padrões, calibração/qualificação de equipamentos, procedimentos de controle e garantia da qualidade definidos, são exigidos cada vez mais para empresas com política de qualidade regulamentada por órgãos de controle. De acordo com B.King,2003, os principais tópicos que devem ser considerados para garantir uma medição com confiabilidade/rastreabilidade representados na figura abaixo:

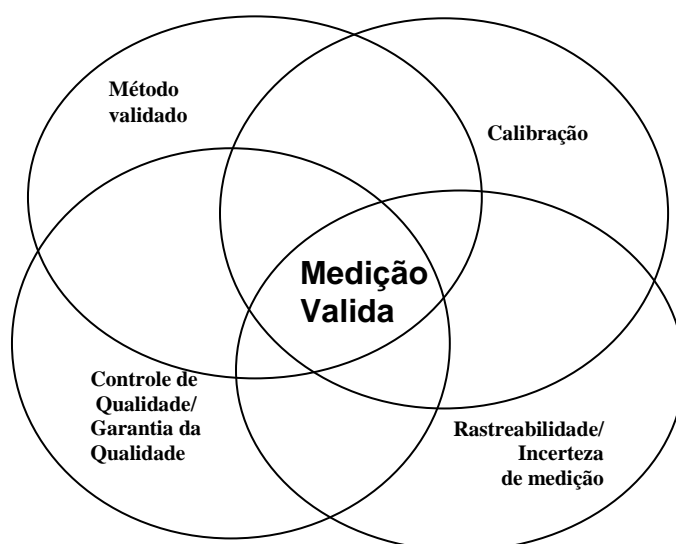


Figura 6.1 – Principais tópicos para confiabilidade/ rastreabilidade de uma medição analítica (B. king, 2003).

Todos os tópicos acima fazem parte do sistema da qualidade de Biomanguinhos. De acordo com o VIM:2000, a rastreabilidade é a propriedade do resultado de uma medição ou do valor de um padrão que está relacionado a referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia continua de comparações, todas tendo incertezas estabelecidas. Nesta dissertação, para demonstrar a rastreabilidade dos resultados e confiabilidade dos métodos utilizados, focaram-se os seguintes tópicos:

- Validação dos métodos;
- Utilização de material de referência certificado.

6.1. Validação de métodos

Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT. 2000).

Os métodos para determinação de D-ribose e fósforo estão implantados no LAFIQ e foram validados em 2004, cujos respectivos documentos de validação são:

- Validação da determinação colorimétrica do conteúdo de polissacarídeo pelo método de orcinol – nº 1109/2004

- Validação da determinação de fósforo – nº 89/2004;

O método para determinação da concentração de fósforo, entretanto necessitou de pequenos ajustes para uniformizar com técnica realizada para determinação de fósforo e da vacina contra meningite A + C e do polissacarídeo C. Em consenso com os responsáveis/analistas do LAFIQ, realizou-se a alteração do procedimento padronizado e a revalidação do método.

6.1.1. Revalidação do método de determinação do conteúdo de fósforo

6.1.2. Precisão

Segundo a Resolução 899 da ANVISA, precisão é a **avaliação** da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. É considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intracorrída); Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e Reprodutibilidade (precisão inter-laboratórios).

6.1.2.1. Precisão Intermediária

“Concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes”.– ANVISA RE 899 (2003).

Com base nesta definição, os dados de precisão intermediária são obtidos utilizando analistas diferentes em dias diferentes de um lote de PRRP. Os dados são avaliados através do coeficiente de variação relativo (CV) e pela análise de variância (ANOVA).

6.1.2.2. Repetitividade

“Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação” – ANVISA RE 899 (2003).

Com base nesta definição, avalia-se a repetitividade para um dos três principais analistas executantes deste teste na rotina do laboratório. Para determinação da incerteza, utiliza-se o analista com maior coeficiente de variação.

6.1.2.3. Resultados de Precisão

A tabela 6.1 apresenta os resultados obtidos por 3 analistas para a avaliação da repetitividade e precisão intermediária.

Tabela 6.1 - Resultados de fósforo no PRRP obtidos por 3 analistas.

Nº determinações	ANALISTA		
	A	B	C
1	8,05	8,56	8,55
2	8,63	8,58	8,64
3	8,44	8,60	8,66
4	8,23	8,52	8,64
5	8,63	8,56	8,20
6	8,35	8,60	8,49
7	8,08	8,52	8,60
8	8,16	8,64	8,55
9	8,59	8,54	7,93
Média %(m/m)	8,35	8,57	8,47
Desvio padrão	0,232	0,038	0,247
REPETITIVIDADE - CV(%)	2,77	0,45	2,91
média total	8,46		
Desvio padrão	0,21		
PRECISÃO INTERMÉDIARIA - CV(%)	2,48		

Avaliação: Verificou-se que tanto em repetitividade quanto em precisão intermediária, os valores obtidos estão dentro do coeficiente de variação aceitável da resolução 899 da Anvisa que é $\leq 5\%$.

Para avaliação da precisão intermediária, realizou-se a verificação da homogeneidade das variâncias, através do teste estatístico ANOVA, tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Teste ANOVA para precisão intermediária.

RESUMO						
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Coluna 1	9	75,15	8,35	0,054		
Coluna 2	9	77,13	8,57	0,001		
Coluna 3	9	76,26	8,47	0,061		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,221	2	0,110	2,858	0,077	3,403
Dentro dos grupos	0,928	24	0,039			
Total	1,149	26				

Avaliação: Os critérios de F calculado $< F$ crítico e Valor-P $> 0,05$ foram considerados para avaliar a precisão intermediária, e atendem ao estabelecido, pois F calculado (2,858) $< (3,403)$ F crítico e valor-P: $0,077 > 0,05$.

6.1.2.4. Avaliação final de precisão

Como os critérios acima foram obedecidos, pode-se concluir que estatisticamente, não há diferença significativa entre os resultados obtidos neste parâmetro. Desta forma reforça-se que o método implantado tem uma precisão intermediária aceitável.

6.1.3. Especificidade

“A Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz” - ANVISA RE 899 (2003).

Com base nesta definição, foram realizadas as determinações de fósforo na amostra e na amostra enriquecida (dihidrogenofosfato de potássio).

6.1.3.1. Resultados de Especificidade

A tabela 6.3 apresenta os resultados dos ensaios realizados para a avaliação da especificidade do método.

Tabela 6.3 – Recuperação - Adição de padrão.

AMOSTRA	Nº	leitura Abs	concentração ug/mL
PRRP	1	0,379	0,864
	2	0,376	0,857
	3	0,377	0,859
	4	0,389	0,887
	5	0,374	0,852
	6	0,361	0,821
	7	0,376	0,857
	8	0,388	0,885
MÉDIA		0,378	0,860
	Nº	Leitura Abs	concentração ug/mL+0,50ug/mL
PRRP+0,50uL padrão	1	0,604	1,396
	2	0,605	1,398
	3	0,601	1,389
	4	0,595	1,374
	5	0,612	1,415
	6	0,598	1,381
	7	0,606	1,400
	8	0,606	1,400
MÉDIA		0,603	1,398
Cálculo de recuperação	Valor adicionado		1,360
	$\frac{(C_1 - C_2)}{C_3} * 100 \quad \text{equação 22}$ <p>onde:</p> <p>C1 = Concentração determinada na amostra adicionada C2 = Concentração determinada na amostra não adicionada C3 = Concentração adicionada (0,50ug/mL)</p>		RESULTADO MÉDIO
			107%

Avaliação: A resolução da Anvisa Nº 899 e o Inmetro não definem critérios de especificidade. O documento orientativo de validação de métodos do Inmetro (2008) informa que em certos casos, podem ocorrer resultados superestimados, devido à diferença da natureza do padrão utilizado e da matriz, como de fato ocorreu. Desta forma, este teste foi realizado para verificação de um aumento da resposta em relação à amostra.

6.1.4. Linearidade e Faixa

“A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa é o intervalo especificado entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. É derivado do estudo de linearidade” (ANVISA RE 899, 2003). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Para este ensaio, os valores determinados

para a curva de linearidade estão apresentados na tabela 6.4. Esta avaliação é feita através da regressão linear dos dados.

Tabela 6.4 - Preparo da curva padrão de fósforo.

Concentração de fósforo	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/tubo}$ ($\mu\text{g}/4\text{mL}$)	Volume (mL) da solução padrão de $5\mu\text{g/mL}$	Volume de água (mL)
branco	0	0	0	4,0
P1	0,25	1,0	0,4	3,6
P2	0,50	2,0	0,6	3,4
P3	1,00	4,0	0,8	3,2
P4	1,50	6,0	1,2	2,8
P5	2,00	8,0	1,6	2,4

6.1.4.1. Resultados de Linearidade e Faixa

Na tabela 6.5 constam as leituras das concentrações da curva padrão de fósforo, os desvios padrão e os coeficientes de variação.

Tabela 6.5 –Avaliação dos resultados da curva de calibração.

	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Abs	Média	Desv.Padrão	CV%	Variância
C1	0,25	0,110				
	0,25	0,112	0,111	0,001	1,037	1,3E-06
	0,25	0,112				
C2	0,50	0,218				
	0,50	0,219	0,219	0,002	0,696	2,3E-06
	0,50	0,221				
C3	1,00	0,441				
	1,00	0,442	0,441	0,001	0,131	3,3E-07
	1,00	0,441				
C4	1,50	0,660				
	1,50	0,660	0,659	0,002	0,263	3,0E-06
	1,50	0,657				
C5	2,00	0,876				
	2,00	0,880	0,878	0,003	0,322	8,0E-06
	0	0,000				

6.1.4.2. Teste de Grubbs

Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Grubbs (Grubbs F. 1974), que se destina a verificar a existência de valores aberrantes. Neste teste, rejeitam-se valores em relação à estimativa do desvio-padrão (Leite F. 1998).

Para aplicação do teste, utiliza-se amplitude em relação à média:

- 1 – colocar os valores obtidos em ordem crescente.
- 2 – Determinar a média aritmética.
- 3 – Determinar a amplitude do maior (maior valor – média).
- 4 – Testar o maior valor do conjunto, segundo a equação:

$$G = \frac{(x_{\text{maior}} - x_{\text{Média}})}{s} \quad \text{equação 23}$$

s = desvio padrão

- 5 – Testar o menor valor do conjunto, segundo a equação:

$$G = \frac{(x_{\text{Menor}} - x_{\text{Média}})}{s} \quad \text{equação 24}$$

O valor G obtido deve ser comparado ao valor tabelado de Grubbs com 95% de confiança.

O valor tabelado de Grubbs para n resultados deve ser maior que o valor encontrado, caso contrário o valor é rejeitado.

Os resultados da aplicação do teste de Grubbs constam na tabela 6.6.

Tabela 6.6 – Resultados do teste de Grubbs.

Para um valor aberrante			<i>G crítico</i>		<i>I,155</i>
Medida Abs	Gsuperior	Ginferior	Valor testado		Resultado
0,1100	0,577	1,155			
0,1120			MÁX	0,1120	OK
0,1120			MÍN	0,1100	OK
0,2180	1,091	0,873			
0,2190			MÁX	0,2210	OK
0,2210			MÍN	0,2180	OK
0,4410	1,155	0,577			
0,4420			MÁX	0,4420	OK
0,4410			MÍN	0,4410	OK
0,6600	0,577	1,155			
0,6600			MÁX	0,6600	OK
0,6570			MÍN	0,6570	OK
0,8760	0,707	0,707			
0,8800			MÁX	0,8800	OK
0,0000			MÍN	0,8760	OK

6.1.4.3. Verificação de Homocedasticidade

Observando a equação da reta através dos resultados da curva de calibração da concentração versus absorvância, suponhamos que o erro em y tem a mesma distribuição para todos os n pontos, o que constitui o chamado caso homocedástico. Os resíduos devem apresentar a mesma variância para cada observação de X . Se os pontos estão distribuídos aleatoriamente, sem demonstrar um comportamento definido, há homocedasticidade. Mas se existe alguma tendência (crescimento/oscilação), então há heterocedasticidade. Havendo heterocedasticidade, o modelo deve ser modificado. Para a verificação deste critério, utiliza-se o teste de Cochran descrito a seguir.

6.1.4.4. Teste de Cochran

Este teste avalia a homogeneidade das variâncias, o que permite utilizar a curva de calibração com um limite de confiança aceitável. O valor de Cochran calculado deve ser menor que o valor de Cochran tabelado para considerar que as variâncias são homogêneas conforme o aumento da concentração. Isto caracteriza um comportamento homocedástico para a curva de calibração e o cálculo é feito através da expressão:

$$C = \frac{s_{\text{máximo}}^2}{\sum s^2} \quad \text{equação 25}$$

Onde:

s_{Max}^2 é a maior variância

$\sum s^2$ o somatório das variâncias

Para este caso o valor de $C_{\text{calc}} = 0,533$.

Pode-se concluir que os resultados são homocedásticos pois $C_{\text{calc}}(0,533) < C_{\text{tab}}(0,684)$.

6.1.4.5. Regressão linear e coeficientes da reta

Os coeficientes angular e linear da reta construída com os valores do tabela 6.5 estão apresentados na tabela 6.7 e no gráfico 6.1.

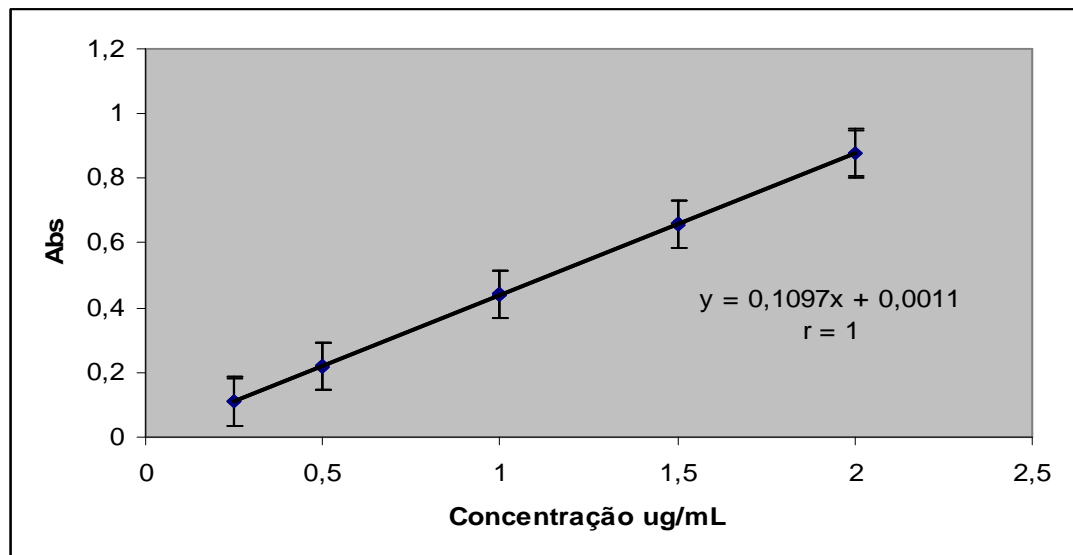


Gráfico 6.1 – Regressão linear e coeficientes da reta - validação

Tabela 6.7 - Dados da equação da equação da regressão linear.

coeficiente de correlação (r)	1,00
coeficiente angular (a)	0,1097
coeficiente linear (b)	0,0011

Avaliação: O coeficiente de correlação linear é usado para determinar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. De acordo com a resolução do Inmetro (2007), para linearidade, $r > 0,90$ é requerido, e para Anvisa (2003), $r \geq 0,99$. Verifica-se $r = 1,00$ obtido atende ao critério estabelecido.

6.1.4.5. Análise de resíduos

Chama-se resíduo de um modelo de regressão a diferença entre o valor observado e o valor estimado da variável dependente, $e_i = y_i - \hat{y}_i$, conforme descrito no item 5.2.3. Na tabela 6.8 consta o resultado da análise de resíduo realizado neste trabalho e no gráfico 6.2, a distribuição destes resíduos.

Tabela 6.8 – Resultados da análise de resíduos.

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	0,1110	-0,0010	-0,6123
2	0,1110	0,0010	0,6240
3	0,1110	0,0010	0,6240
4	0,2206	-0,0026	-1,6244
5	0,2206	-0,0016	-1,0063
6	0,2206	0,0004	0,2300
7	0,4399	0,0011	0,6783
8	0,4399	0,0021	1,2964
9	0,4399	0,0011	0,6783
10	0,6592	0,0008	0,5085
11	0,6592	0,0008	0,5085
12	0,6592	-0,0022	-1,3459
13	0,8785	-0,0025	-1,5158
14	0,8785	0,0015	0,9567

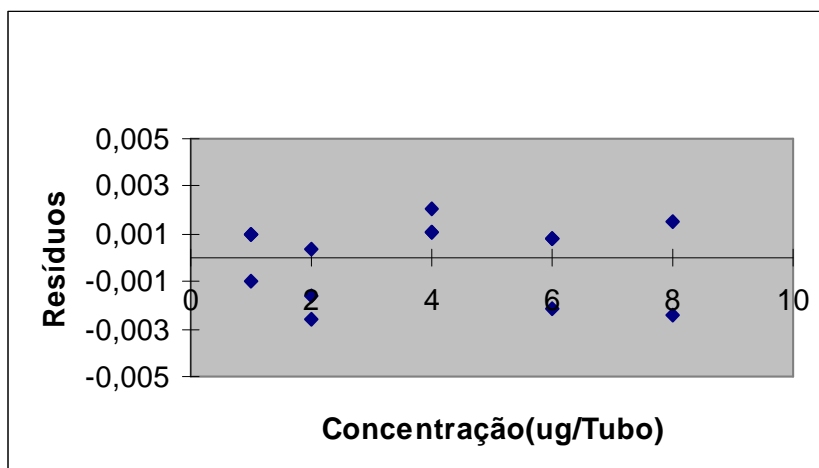


Gráfico 6.2 – Distribuição de resíduos – validação

Avaliação: Os resíduos estão distribuídos de forma homogênea e com valores dentro do intervalo estimado para normalidade a 95% [-2,+2], o que demonstra homogeneidade das variâncias nos pontos de calibração. Isto significa que as medições realizadas são suficientes para que se tenha confiabilidade nos resultados.

6.1.4.5. Precisão do instrumento

A precisão do instrumento avalia a variação relacionada a cada ponto da curva em interação com a resposta do equipamento (Ermer J,2005) e os resultados encontram-se na tabela 6.9.

Tabela 6.9 – Avaliação da precisão do instrumento.

Nível de concentração (pontos da curva de calibração – ug/mL)	média	Desvio padrão	CV%	Avaliação
0,25	0,23	0,0026	1,04	APROVADO
0,50	0,47	0,0035	0,70	APROVADO
1,00	0,98	0,0013	0,13	APROVADO
2,00	1,48	0,0039	0,26	APROVADO
2,50	1,98	0,0064	0,32	APROVADO

Avaliação: Os resultados obtidos dos coeficientes de variação de cada ponto da curva de calibração são aceitáveis demonstrando uma resposta de leitura do equipamento adequada.

6.1.5. Incerteza de medição do método de fósforo

O quadro 6.1 apresenta as principais fontes de incerteza consideradas para a estimativa da incerteza de medição associada ao conteúdo de fósforo e a tabela 6.10 as incertezas associadas a cada fonte.

Quadro 6.1 – Principais fontes de incertezas associadas à medição do conteúdo de fósforo.

Símbolo	Nome / Fonte de incerteza
u_{1A}	Precisão intermediária atribuída ao laboratório = $s/\text{raiz}(n)$ s = desvio padrão amostral entre as 27 medidas dos 3 analistas, 9 medidas de cada analista $n = 27$
u_{2A}	Ajuste da Curva
u_{1B}	Incerteza da calibração do espectrofotômetro (Certificado)
u_{2B}	Dúvida na leitura da Espectrofotômetro ("resolução")
u_{3B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{4B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{5B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (assumido)
u_{6B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (Certificado)
u_{7B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{8B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (assumido)
u_{9B}	Incerteza calibração da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{10B}	Erro não corrigido da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{11B}	Incerteza da calibração da Balança utilizada na pesagem da amostra (Certificado)
u_{12B}	Dúvida na leitura da Balança utilizada na pesagem da amostra ("resolução")
u_{13B}	Incerteza da micropipeta da alíquota digerida (Certificado)
u_{14B}	Erro não corrigido da micropipeta da alíquota digerida (Certificado)
u_{15B}	Incerteza do coeficiente linear da regressão linear (referente a solução padrão de fósforo)
u_{16B}	Incerteza do coeficiente angular da regressão linear (referente a solução padrão de fósforo)

Tabela 6.10 - Cálculo de Estimativa de Incerteza dos Resultados das Análises de fósforo (planilha de cálculo).

Símbolo	Valor (±)		PA (%)	Distribuição de probabilidade divisor		C _i Coeficiente de Sensibilidade		Incerteza Padrão PA = 68% (%)	V Graus de Liberdade
<i>u</i> _{1A}	0,040	%	68	normal	1	1		± 0,04041	26
<i>u</i> _{2A}	0,020	%	100	retangular	$\sqrt{3}$	1		± 0,01166	infinito
<i>u</i> _{1B}	0,009	ABS	95	normal	k = 2	18,868	% / ABS	± 0,08491	infinito
<i>u</i> _{2B}	0,0005	ABS	100	retangular	$\sqrt{3}$	18,868	% / ABS	± 0,00545	infinito
<i>u</i> _{3B}	0,03	mL	95,45	normal	K= 2,87	0,745	% / mL	± 0,00779	infinito
<i>u</i> _{4B}	0,01	mL	100	padrão (assumida)	1	0,745	% / mL	± 0,00745	infinito
<i>u</i> _{5B}	0,040	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,745	% / mL	± 0,01721	infinito
<i>u</i> _{6B}	0,01	mL	95,45	normal	k = 2,43	0,745	% / mL	± 0,00307	infinito
<i>u</i> _{7B}	0,03	mL	100	padrão (assumida)	1	0,745	% / mL	± 0,02235	infinito
<i>u</i> _{8B}	0,030	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,745	% / mL	± 0,01290	infinito
<i>u</i> _{9B}	0,001	mL	95,45	normal	k = 2,32	14,906	% / mL	± 0,00643	infinito
<i>u</i> _{10B}	0,002	mL	100	padrão (assumida)	1	14,906	% / mL	± 0,02981	infinito
<i>u</i> _{11B}	1000	ug	100	normal	k = 2,87	0,0000745	% / ug	± 0,03	4
<i>u</i> _{12B}	20	ug	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,0000745	% / ug	± 0,00	infinito
<i>u</i> _{13B}	0,0001	mL	100	retangular	k =2,18	74,536	% / mL	± 0,00342	16
<i>u</i> _{14B}	0,0002	mL	100	padrão (assumida)	1	74,536	% / mL	± 0,01491	infinito
<i>u</i> _{15B}	0,0021	ABS	95	normal	k =2,00	18,868	% / ABS	± 0,01981	infinito
<i>u</i> _{16B}	0,00014	ABS/ug	96	normal	k =2,00	70,310	% .ug/ABS	± 0,00492	infinito
<i>u</i> _C	0,11		68	Normal					
U	0,22	%	95	Normal	k =	1,96			V_{eff} = 705,81

Onde: *u*_C = Incerteza Padrão Combinada; U=Incerteza Expandida; k=fator de abrangência;

PA=Nível da Confiança (Probabilidade de Abrangência).

A incerteza associada ao método encontrado é de 0,22 %. A Tabela 6.11 demonstra as principais fontes de incerteza associadas ao método:

Tabela 6.11 – Principais fontes de incerteza do método de fósforo.

Nome / Fonte de incerteza	Contribuição para Incerteza	Possíveis causas do valor da incerteza
Precisão intermediária	13%	Variação sistemática do laboratório
Incerteza da calibração do espectrofotômetro (certificado de calibração)	58%	Variação da calibração do equipamento no comprimento de onda do método

6.1.6. Avaliação final da validação de método

As verificações realizadas avaliando os parâmetros analíticos demonstraram estatisticamente que o método atende ao que foi pretendido, ou seja, determinar o conteúdo de fósforo do PRRP com a confiabilidade necessária. Os resultados dos parâmetros avaliados nesta validação vêm ratificar a validação realizada anteriormente.

6.2. Utilização do padrão internacional

Sempre que possível, os materiais de referência devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Um MRC possui um valor de concentração, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. É muito importante, portanto, que o fornecimento desses MRC seja realizado por organismos reconhecidos e confiáveis. (Inmetro, 2007).

Em 2001/2002, a implantação/validação dos métodos para controle de qualidade de produtos intermediários e da vacina Hib no LAFIQ, foram realizados utilizando materiais disponíveis na época, como lotes produzidos pela Glaxosmithkline, com os resultados do certificado de liberação como “valor referência” para comparação dos resultados obtidos em Biomanguinhos, além de outros materiais e padrões químicos com pureza acima de 99%. Entretanto, não havia disponibilidade de padrões com as características da vacina Hib.

A partir de um workshop realizado pelo WHO/NIBSC (National Institute Biological Standard and Control), recomendou-se a preparação do PRRP referência com quantidade conhecida de polissacarídeo que poderia ser usado como *cross-calibrate* de vários métodos para quantificar o conteúdo de PRRP. Este material deveria ser utilizado no bulk sacarídeo, bulk conjugado e formulação final feito sob supervisão da WHO para facilitar a calibração das dosagens, requerido particularmente por produtores e laboratórios de controle nacionais (Mawas, 2007).

O primeiro padrão internacional de polissacarídeo capsular Hib, o PRRP, foi elaborado a partir de um estudo colaborativo internacional com participação de 10 laboratórios, incluindo 5 produtores e 4 laboratórios de controle nacionais, além do NIBSC.

No estudo colaborativo, realizaram os testes de quantificação de D-ribose, fósforo e HPAEC-PAD e RMN.

O material de referência foi totalmente estabelecido em outubro de 2005 como primeiro padrão internacional de PRRP pelo Expert Committee of Biological Standards of the WHO (WHO report BS/2018/haemophilus), com o conteúdo de $4,933 \pm 0,267$ mg/ampola, determinado através do conteúdo de D-ribose por 7 laboratórios entre os 10 participantes (Mawas, 2007).

Para a elaboração do material de referência, o NIBSC utilizou-se 900mL de PRRP líquido e cloreto de sódio como estabilizante. O mesmo foi liofilizado e envasado em ampolas. O código de identificação do lote do MR é 02/208.

6.2.1. Resultados de D-ribose do padrão internacional NIBSC/WHO

6.2.1.1. Preparação do padrão

A ampola do padrão lote 02/208 contendo 4,933 mg de PRRP, foi reconstituído conforme orientação do certificado, colocando 1 mL de água ultrapura. A seguir foi feita uma diluição de 250 vezes da “solução-mãe”. Foram separadas 7 alíquotas para teste, número de amostras mínimo para avaliação de repetitividade de acordo com DOQ-CGCRE-008 - INMETRO, 2007. A tabela 6.12 apresenta os resultados obtidos do ensaio realizado na solução teste do padrão internacional.

Tabela 6.12– Resultados do PRRP pelo conteúdo de D-ribose do padrão internacional NIBSC/WHO.

Nº	mg/mL
1	4,874
2	5,023
3	4,862
4	4,862
5	4,943
6	4,713
7	4,851
Média	4,875
Desvio padrão	0,0946

Avaliação inicial: Todos os resultados encontrados estão dentro do valor declarado no certificado com sua incerteza associada (certificado 02/208). Para comprovação desta afirmação, realizou-se outra inferência estatística denominada teste de hipótese. Neste caso foi utilizado a distribuição de *t-Student* devido ao número de resultados obtidos ser menor que 30.

6.2.1.2. Formulação da Hipótese

Este teste de hipótese compara os resultados do ensaio com o valor declarado no certificado do MRI. O valor de μ_0 é o valor do certificado de PRRP, cujo valor é 4,933 mg/mL e a média obtida no laboratório foi de 4,785mg/mL, em condições de repetitividade. O teste de hipótese é bilateral com 95% de significância.

Hipótese de interesse:

$$H_0 : \mu = \text{média}$$

$$H_1 : \mu \neq \text{média}$$

$$T = \frac{\text{média} - \mu}{s/\sqrt{n}} \quad \text{equação 26}$$

$$T = \frac{4,875 - 4,933}{0,0946/\sqrt{7}} = -1,622$$

$$\text{Como } \alpha=0,05/2= 0,025$$

Na tabela de *t de Student*, para $n=7$, temos 2,365.

O valor de T calculado (-1,622) encontra-se dentro do intervalo [-2,365, 2,365] para 95% de significância. Comprovando que não há, estatisticamente diferença significativa entre os resultados.

6.2.1.3. Índice z-score

O Laboratório de Controle Físico-químico de Biomanguinhos avalia os seus resultados de ensaio utilizando como ferramenta de análise o índice z-score (IUPAC 2006, Inmetro 2007) e para este estudo foi aplicado este índice, conforme a equação a seguir:

$$z = \frac{(x_{\text{laboratório}} - x_v)}{S} \quad \text{equação. 27}$$

$$z = \frac{4,875 - 4,933}{0,267} = - 0,22 \text{ ou seja em módulo} = \mathbf{0,22}$$

X_{lab} = Valor obtido pelo laboratório

X_v = Valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC)

s = unidade de desvio (incerteza do MRC)

A avaliação é realizada de acordo com a seguinte escala de pontuação (IUPAC 2006, Inmetro 2007):

$IzI \leq 2$ = satisfatório

$2 < IzI \leq 3$ = questionável

$IzI > 3$ = Insatisfatório

Conforme demonstrado acima, o resultado alcançado é satisfatório para o teste de D-ribose.

6.2.1.4. Avaliação final dos resultados para o teste de D-ribose do padrão internacional

Segundo os itens 6.2.1.2 e 6.2.1.3, o padrão contendo D-ribose está conforme, pois estatisticamente não foi verificado nenhuma inconsistência.

6.2.2. Uso do padrão internacional para o método de Fósforo.

Como citado anteriormente, o padrão internacional de PRRP foi certificado através do conteúdo de D-ribose. O artigo de Mawas (2007) que descreve a elaboração do padrão, entretanto, discute os diversos métodos utilizados para controle de qualidade de PRRP e os resultados encontrados para cada método de todos os laboratórios envolvidos. Realizou-se o teste com o padrão para o conteúdo de fósforo e comparamos com o valor médio encontrado pelos laboratórios participantes.

6.2.2.1. Preparo do padrão para o uso no teste de fósforo

O padrão de PRRP lote 02/208 foi reconstituído conforme orientação do certificado, adicionando 1 mL de água ultra-pura em uma ampola com 4,933 mg de PRRP. Para o teste de fósforo, não são necessárias outras diluições. O teste determina a quantidade de fósforo. O artigo apresenta os valores da massa de PRRP determinados através da conversão do valor de fósforo médio de cada laboratório. Desta forma, utilizou-se um fator de conversão, 11,9 (relação do peso molecular do fósforo com o peso molecular de PRRP), empregado na determinação de PRRP para realizar a comparação entre resultados.

Para esta avaliação foram separadas 3 alíquotas para teste devido a pouca disponibilidade de amostra e foi aplicado somente o teste de z-score comparando resultado médio encontrado pelos laboratórios participantes com os resultados obtidos no LAFIQ.

6.2.2.2. Resultados do artigo sobre o primeiro padrão internacional de PRRP

A tabela 6.13, extraída do artigo de Mawas (2007), contém os resultados obtidos para os teores de fósforo e ribose.

Tabela 6.13 – Resultados do estudo colaborativo para elaboração do 1º padrão internacional de PRRP:

Summary of results (mean PRP content in mg) for the Hib PRP standard

Method	Lab	Mean	CV ^a	Method	Lab	Mean	CV ^a		
Ribose	1	4.723	3.2%	HPAEC-PAD	1	5.746	8.3%		
	2	4.975	2.5%		2	4.523	2.7%		
	3	5.191	4.0%		5	5.560	3.0%		
	5	5.028	—		8	6.688	7.0%		
	6	5.103	0.8%		9a	5.113	5.4%		
	7	4.893	3.8%		9b	6.335	4.0%		
	10	4.615	2.3%		10	4.239	10.4%		
	Phosphorus	2	4.937		1.2%	NMR	4	4.986	0.3%
		3	5.365		2.2%				
		7	5.159		2.0%				
8		4.985	0.3%						
9		4.939	3.3%						

Overall means with 95% confidence intervals and between-lab CV: Ribose: 4.933 (4.743–5.123); 4.2%; Phosphorus: 5.077 (4.847–5.307); 3.6%; HPAEC-PAD: 5.458 (4.626–6.290); 16.5%; All methods: 5.155 (4.886–5.424); 11.2%.

^a CV of mean results obtained for four ampoules of candidate standard.

fonte: Mawas F et al. Evaluation of the saccharide content and stability of de first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. Biologicals (2007),doi: 10.1016/J.biologicals.2007.

Para comparação do resultado obtido no laboratório com o do artigo, utilizou-se o resultado médio de fósforo do estudo colaborativo (5,077mg/mL). Como nesta tabela não consta o desvio padrão calculou-se o desvio padrão pelo CV médio.

$$\text{CV médio} = 3,6\%$$

$$\text{CV} = s/\text{média} \times 100 \text{ então } 3,6 = s / 5,077 \times 100 \rightarrow s = 0,183$$

6.2.2.3. Resultados obtidos no Laboratório Físico-químico

Os resultados de PRRP do conteúdo de fósforo mensurado no padrão internacional NIBSC/WHO estão apresentados na tabela 6.14.

Tabela 6.14 – Resultados de PRRP do conteúdo de fósforo do padrão internacional NIBSC/WHO:

Nº	Quantidade de PRRP (mg/mL)
1	4,941
2	5,105
3	5,039
Média	5,033

6.2.2.4. Cálculo do Índice z-score para fósforo

Utilizando a formula do item 6.2.1.3, temos o seguinte cálculo para o valor de z:

$$z = \frac{(X_{\text{lab}} - X_v)}{s} = \frac{5,033 - 5,077}{0,183} = |-0,24| = \mathbf{0,24}$$

Avaliação final: De acordo com a escala de pontuação descrita no item 6.2.1.3, o resultado encontra-se em $|Z| \leq 2$, ou seja, satisfatório, demonstrando que o método atende à determinação de fósforo em PRRP ratificando a validação do método de fósforo, descrito neste trabalho.

7. Resultados do material candidato a MR

7.1. Dados experimentais do preparo do material de referência

O Departamento de Vacinas Bacterianas, DEBAC, disponibilizou uma parte do lote de PRRP de identificação 074HPRP006 fabricado em abril de 2007 para produção do material candidato a MR em janeiro de 2008. Este material ficou armazenado até a sua utilização, em câmara fria a -20°C, mesma temperatura de estocagem do PRRP no DEBAC. A validade para uso de PRRP na produção da vacina Hib é de 5 anos.

Para utilização do PRRP no preparo da solução do MR candidato, foi determinada a massa seca do polímero. Segundo o documento da WHO Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae type b* conjugate vaccines, 2000, a umidade deve ser determinada por um método aceitável, aprovado pela Autoridade Nacional de Qualidade. No Brasil, a ANVISA é a autoridade em alimentos, medicamentos e vacinas.

O método de secagem do material é o estabelecido para controle de qualidade do PRRP em testes de rotina, utilizando balança termogravimétrica de acordo com a IT 1037, de determinação de umidade residual, do LAFIQ. Esta instrução de trabalho foi objeto de avaliação na auditoria realizada pela Anvisa envolvendo várias etapas da implantação de controle de qualidade da Hib, sem restrições ao método utilizado para determinação da umidade, no LAFIQ.

Todas as metodologias e cálculos referentes aos componentes do PRRP são dados em percentual sobre a massa seca. Neste estudo, a secagem do PRRP foi realizada no laboratório farmacêutico Mantecorp/RJ, utilizando uma balança de modelo similar ao do LAFIQ, devidamente calibrada, com certificado de calibração por laboratório credenciado junto a RBC. A utilização da balança da Mantecorp foi necessária para não atrasar a elaboração do material, já que a balança do LAFIQ estava em manutenção corretiva e havia sido encaminhada para assistência técnica em São Paulo.

A tabela 7.1 apresenta as condições utilizadas na secagem do PRRP, cujos resultados constam na tabela 7.2 e estão representados nos gráficos 7.1 e 7.2.

Tabela 7.1 - Condições do método de secagem do PRRP.

 Equipamento: Balança termogravimétrica

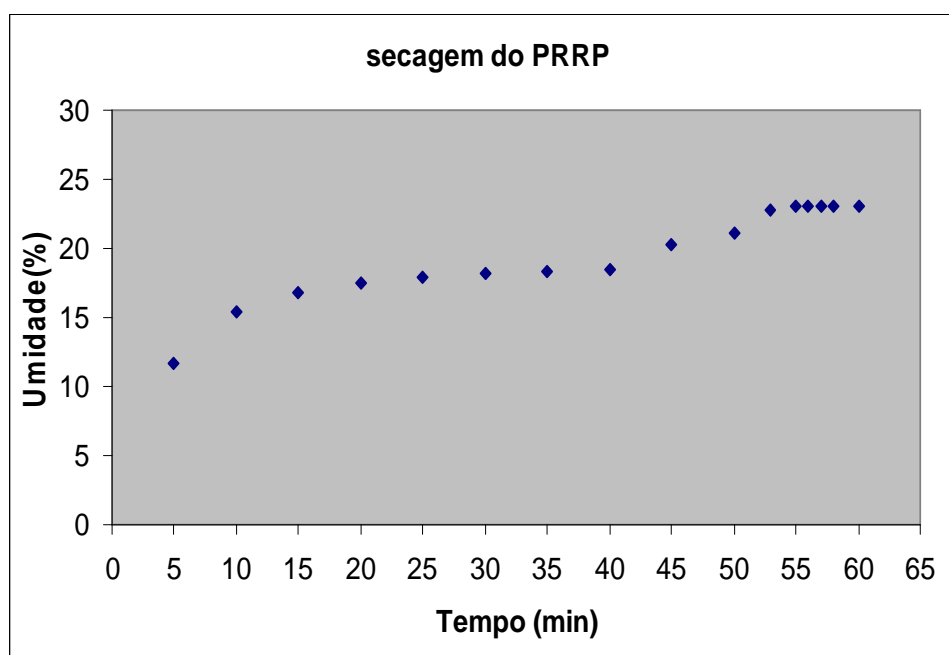
 Modelo: HB 43 Mettler toledo

 Temperatura 60°C

 Tempo: 60 minutos

Tabela 7.2 - Tempo x umidade perdida x massa final do PRRP.

Tempo (min)	umidade perdida %	massa final(g)
5	11,7	1,064
10	15,35	1,020
15	16,85	1,002
20	17,51	0,994
25	17,93	0,989
30	18,17	0,986
35	18,34	0,984
40	18,51	0,982
45	20,33	0,960
50	21,16	0,950
53	22,82	0,930
55	23,07	0,927
56	23,07	0,927
57	23,07	0,927
58	23,07	0,927
60	22,99	0,928

**Gráfico 7.1- Umidade perdida x tempo de secagem do PRRP**

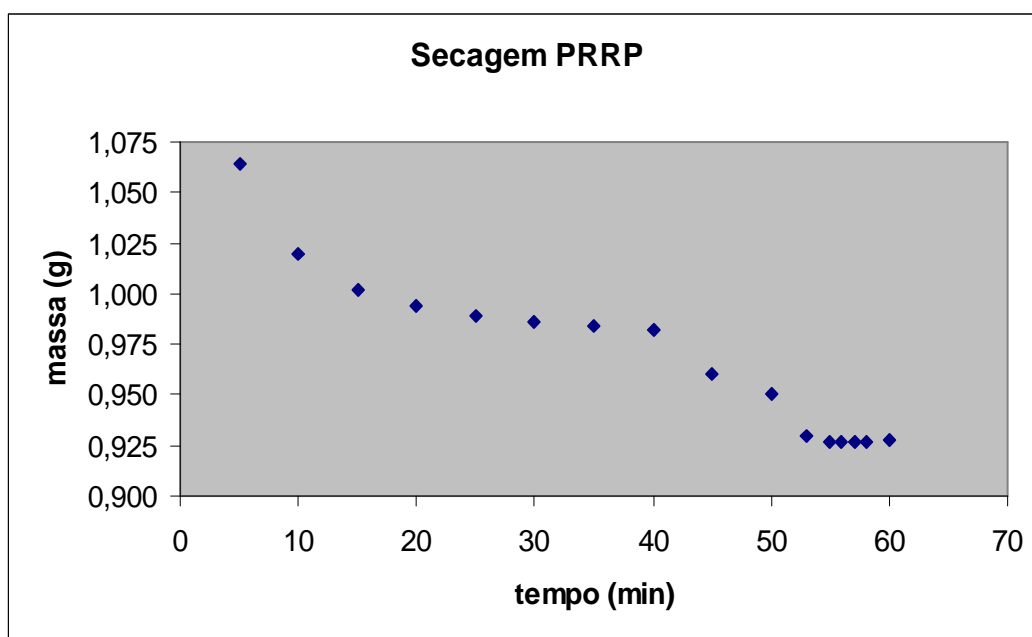


Gráfico 7.2 - Massa x tempo de secagem do PRRP

Após o tempo de secagem programado, para garantir a secagem do material para determinação da massa seca, foi realizada uma nova programação de secagem a 60°C por 30 minutos e a massa manteve-se constante.

7.2. Preparo da solução

O PRRP seco foi colocado no balão volumétrico de 2L calibrado. Posteriormente, foi adicionada água ultra-pura até aproximadamente 1/3 do volume. Como o PRRP dissolve-se vagorosamente, o balão volumétrico foi armazenado a 4°C por 24h para permitir a completa dissolução do material. Em seguida, o balão foi retirado da câmara fria e ao chegar à temperatura ambiente, completou-se o volume para 2L. A solução foi homogeneizada e mantida no balão volumétrico até o momento do envase em temperatura ambiente.

7.3. Testes e avaliação do material candidato a MR

De forma a facilitar a verificação da adequabilidade do material candidato para os métodos de determinação de fósforo e D-ribose, os resultados obtidos de caracterização, homogeneidade, estabilidade e incerteza de medição de cada técnica serão avaliados separadamente. Sua caracterização será realizada avaliando-se a estrutura por RMN e a nominal por D-ribose e fósforo.

7.4. Ressonância magnética nuclear (RMN) – Caracterização estrutural

Os testes descritos neste item da dissertação foram realizados em Farmanguinhos, na Plataforma de Métodos Analíticos/ Laboratório de RMN. Os parâmetros de análise estão descritos abaixo, levando-se em consideração os parâmetros definidos na literatura (Lemercinier, 2000) e ajustados pelo Laboratório de RMN (Farmanguinhos).

As análises de RMN de ^1H foram realizadas em espectrômetro Bruker 500 (^1H - 500 MHz, ^{13}C - 125 MHz) em D_2O 99.96% deuterado da CIL. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ) em relação ao DSS (4,4-dimetil-4-silapenato-1-sulfonato). O assinalamento dos sinais do espectro de RMN de ^1H do PRRP material de referência internacional (NIBSC/WHO) e o PRRP utilizado para preparação do MR foi obtido. As possíveis atribuições foram realizadas com base na literatura (Lemercinier, 2000) e nos espectros registrados para outros lotes de PRRP, provenientes da GSK, no período de transferência de tecnologia. Para estes lotes citados, foram obtidos os espectros de COSY 90 (onde pode-se estabelecer as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados), HSQC e HMBC (técnicas que produzem informações sobre acoplamentos entre hidrogênio e carbono). Os experimentos foram realizados com *delay* igual a 1.5s, 65K (^1H). Os programas de pulso e o processamento foram realizados com o software XWINNMR 3.5 da BRUKER.

7.4.1. Espectros de ^1H RMN do Padrão Internacional NIBSC e do material candidato. Análise comparativa e atribuições

A seguir é apresentada a estrutura do PRRP (polirribosil-ribitol fosfato), com a identificação de cada hidrogênio presente na estrutura para proceder à atribuição, figura 7.1.

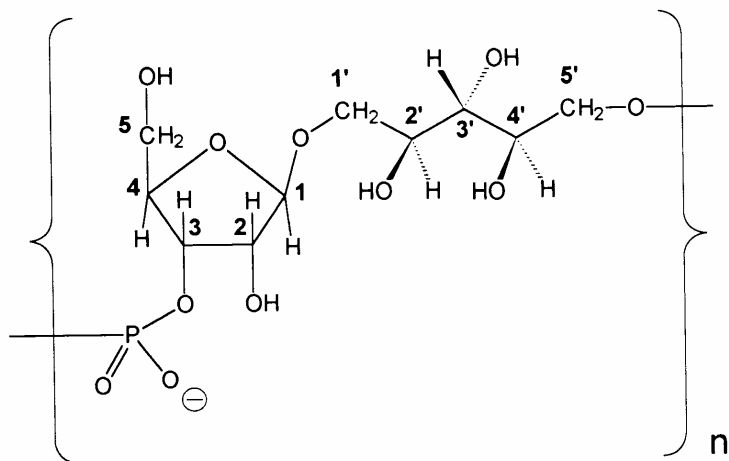


Figura 7.1 – Identificação dos H presentes no PRRP – Relatório de caracterização da GSK

O material de referência internacional foi utilizado como padrão para comparação do perfil espectral do material candidato, produzido em Biomanguinhos.

Nas figuras 7.2 e 7.3 são apresentados os espectros de ^1H (próton), os assinalamentos dos hidrogênios e deslocamentos químicos correspondentes para o MRI e para o Material candidato.

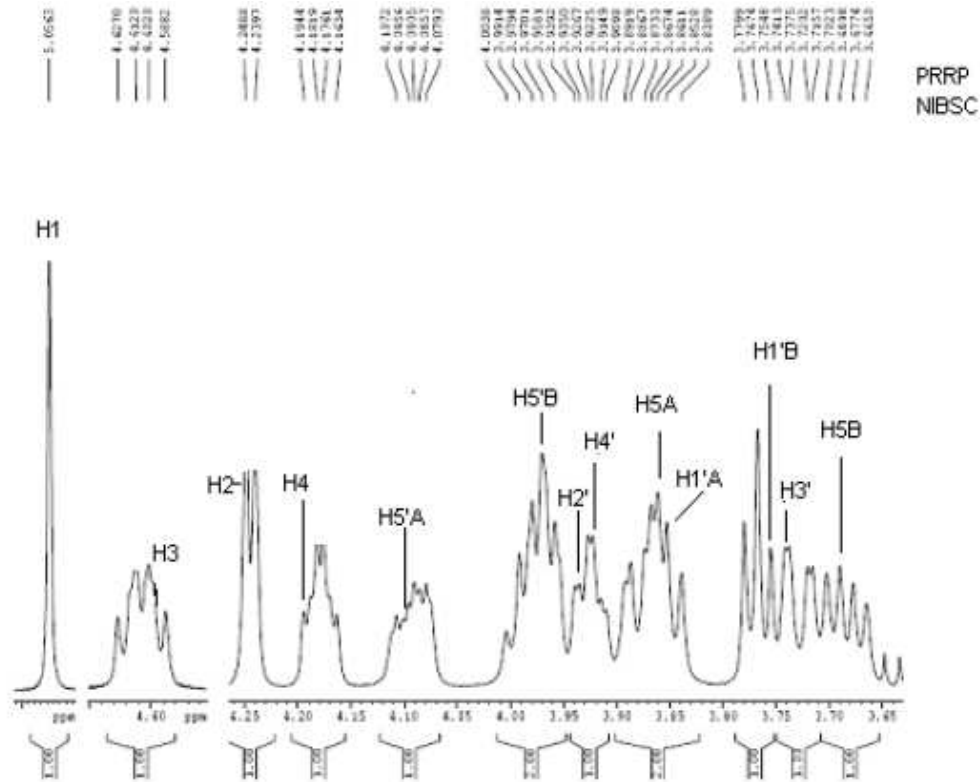


Figura 7.2 - Espectro de ^1H (próton) do PRRP utilizado para o preparo do MR.

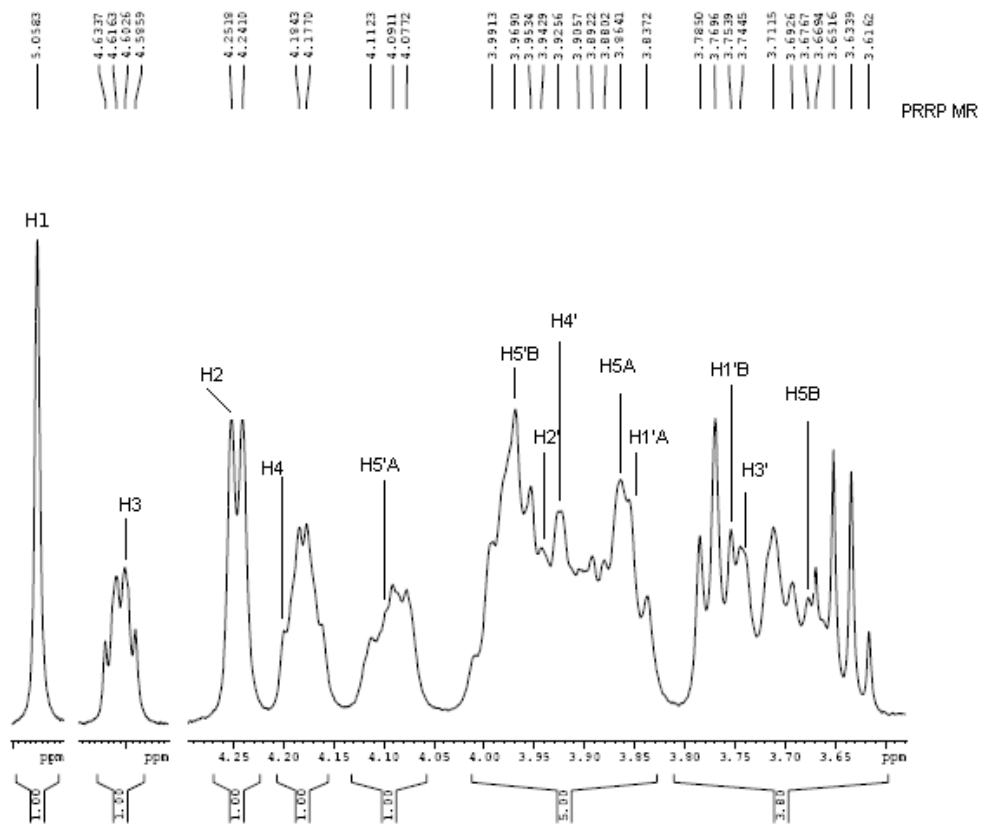


Figura 7.3 - Espectro de ^1H do PRRP NIBSC

Uma primeira avaliação demonstrou que foi encontrado o mesmo perfil para os lotes analisados, porém com algumas diferenças de intensidade e deslocamentos químicos no espectro. Estas diferenças podem estar relacionadas à concentração das amostras, temperatura e tipo de solvente utilizado. O espectro do PRRP MR foi obtido com DMSO. Em contrapartida, para a análise do PRRP NIBSC utilizou-se água deuterada como solvente; fato este que justifica a alta definição dos sinais observados para este espectro, devido à substituição do H da hidroxila pelo deutério. Apesar deste fato, foi possível realizar comparações entre as amostras analisadas, com base nos dados fornecidos pela literatura, procedendo às possíveis atribuições realizadas para os deslocamentos químicos.

Tabela 7.3 - Atribuições para os deslocamentos químicos (δ) de hidrogênio em ppm.

Proton	PRRP (NIBSC)	PRRP (material candidato)
H1	5.056	5.058
H2	4.246	4.251
H3	4.602	4.602
H4	4.194	4.184
H5A	3.867	3.864
H5B	3.689	3.676
H1'A	3.852	3.864
H1'B	3.753	3.754
H2'	3.939	3.942
H3'	3.737	3.744
H4'	3.926	3.922
H5'A	4.104	4.106
H5'B	3.989	3.997

Segundo a tabela acima, as atribuições para cada sinal encontrado são coincidentes para ambos os espectros.

Os espectros registrados, tanto do MRI, quanto do Material candidato apresentaram o mesmo perfil, apesar das diferenças observadas na resolução dos sinais, bem como nos deslocamentos químicos.

Deste modo, pode-se considerar estes resultados bastante satisfatórios, corroborando com a estrutura esperada do lote de PRRP, que será utilizado para o planejamento de um Material de Referência *in-house*.

7.5. Caracterização Nominal por D-ribose

A quantidade do polissacarídeo pode ser estimada pela medição do conteúdo de D-ribose. O conteúdo de D-ribose não pode ser menor que 32% em relação à massa seca do polissacarídeo que é determinado pela reação de Bial para pentose, usando D-ribose como um padrão (WHO, 2000).

Para a caracterização do material, foram retiradas 8 alíquotas da solução de PRRP contida no balão volumétrico antes do processo de envase. A tabela 7.4 contém os resultados obtidos para o conteúdo de D-ribose.

Tabela 7.4 – Resultados obtidos na caracterização nominal (conteúdo de D-ribose).

Nº	D-ribose, %
1	40,69
2	41,38
3	41,46
4	40,44
5	41,06
6	42,11
7	40,76
8	41,64

O valor nominal do material é a média dos resultados encontrados na caracterização de D-ribose. Para visualizar a dispersão dos resultados de conteúdo da D-ribose, foi confeccionada uma carta de controle de acordo com a norma ISO 5725-6 (gráfico 7.3), que estabelece os seguintes limites:

- Linha central (média);
- Limites de controle superior e inferior (1s e -1s);
- Limites de atenção superior e inferior (2s e -2s);
- Limites de ação superior e inferior (3s e -3s).

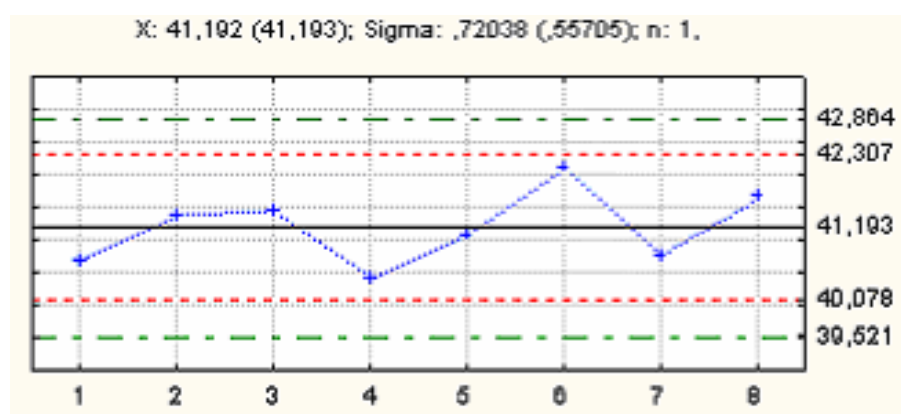


Gráfico 7.3 – Carta de controle dos resultados de conteúdo de D-ribose

- Linha central (linha preta);
 - Limites de controle superior e inferior (área entre as linhas vermelhas);
 - Limites de atenção superior e inferior (área entre as linhas verdes);
- Limites de ação superior e inferior = (áreas após as linhas verdes) .

Observando o gráfico acima, verificamos que a distribuição dos resultados (linha azul) é homogênea. Os resultados encontrados estão dentro dos limites de controle, indicando que eles apresentam desvios aceitáveis em relação à média.

7.5.1. Resultados em condições de repetitividade

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições de análise, isto é, no mesmo dia com um único analista e o mesmo equipamento totalizando 8 repetições. Os resultados de avaliação constam na tabela 7.5.

Tabela 7.5 - Resultados para a avaliação da repetitividade.

Média %	41,19
Desvio Padrão	0,56
Coefficiente de variação (CV%)	1,35

Avaliação: O coeficiente de variação encontrado (1,35) é menor que 5%, o que demonstra a repetitividade dos resultados, de acordo com a resolução da ANVISA nº 899, 2003.

7.6. Envase do material candidato

Após os testes de caracterização nominal de D-ribose e fósforo (item 7.10), o material foi envasado nas condições planejadas (item 4.1.2). O total de frascos envasados foi de 496. Em seguida, foi realizada a avaliação da homogeneidade do material candidato.

7.7. Estudo de homogeneidade para conteúdo de D-ribose

Os frascos numerados foram selecionados de acordo com a tabela de números aleatórios da apostila da disciplina estatística MPTI/2007 (apêndice, página 37). Nesta tabela (anexo 1), a partir da última coluna, selecionou-se os três últimos algarismos da sequência numérica (1 a 496). Foram separados 14 frascos, que foram re-enumerados para o estudo de homogeneidade e constam na tabela 7.6.

Tabela 7.6 - Identificação/separação dos frascos para teste de homogeneidade.

Nova numeração	Nº frasco
1	198
2	262
3	460
4	255
5	306
6	48
7	78
8	165
9	359
10	207
11	396
12	390
13	9
14	142

Após a separação dos frascos, foram retiradas 3 alíquotas de cada frasco e identificadas como 1, 2 e 3 (Ex: frasco 1 alíquota 1, frasco 1 alíquota 2 e frasco 1 alíquota 3) e assim sucessivamente. Todos os testes de homogeneidade foram realizados no mesmo dia, evitando variação em relação aos testes e a estabilidade do MR ainda a ser comprovada. Os resultados encontram-se na tabela 7.7.

Tabela 7.7 - Resultados de estudo de homogeneidade de D-ribose (%).

	Frasco	Resultados “intra-frascos” (%)		
		Alíquota		
		1	2	3
Resultados de cada frasco - “entre frascos” (%)	1	41,48	39,99	41,06
	2	40,32	40,23	40,73
	3	42,61	40,92	41,48
	4	40,47	40,77	40,73
	5	42,03	41,89	42,18
	6	41,48	41,50	41,76
	7	42,07	40,26	40,96
	8	41,72	40,84	40,96
	9	41,64	39,10	41,95
	10	41,02	40,81	41,93
	11	40,63	41,66	40,51
	12	41,56	40,46	40,38
	13	41,25	41,31	40,82
	14	40,36	40,15	40,77

Realizou-se o teste de ANOVA (Análise de Variância Univariável) para verificar a homogeneidade das variâncias. Esta análise é usada para testar hipóteses a respeito da importância de cada parâmetro existente ao modelo proposto. Os resultados da análise de variância apresentam-se na tabela 7.8.

Tabela 7.8 - Avaliação Estatística dos resultados de homogeneidade de D-ribose usando ANOVA.

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>		
Frasco 1	3	122,53	40,84	0,590		
Frasco 2	3	121,27	40,42	0,072		
Frasco 3	3	125,02	41,67	0,740		
Frasco 4	3	121,97	40,66	0,025		
Frasco 5	3	126,10	42,03	0,022		
Frasco 6	3	124,74	41,58	0,023		
Frasco 7	3	123,29	41,10	0,827		
Frasco 8	3	123,52	41,17	0,225		
Frasco 9	3	122,69	40,90	2,441		
Frasco 10	3	123,75	41,25	0,356		
Frasco 11	3	122,80	40,93	0,397		
Frasco 12	3	122,40	40,80	0,437		
Frasco 13	3	123,38	41,13	0,070		
Frasco 14	3	121,27	40,42	0,099		
ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre frascos	8,34	13	0,641	1,42	0,211	2,089
Dentro dos frascos	12,65	28	0,452			
Total	20,99	41				

Avaliação: Com base nos resultados, observa-se que o F calculado é menor que o F crítico (tabelado) e o valor-P está acima de 0,05. Desta forma, verifica-se que não há diferença significativa entre os resultados, demonstrando homogeneidade dos resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância. Conclui-se que o lote produzido atende ao requisito da homogeneidade para o teste de D-ribose.

7.8. Estudo de estabilidade para conteúdo de D-ribose

7.8.1. Estudo de estabilidade em tempo real para o conteúdo de D-ribose no MR.

Para este estudo foi considerado seis meses o tempo para avaliar a estabilidade do material candidato a MR. As amostras foram submetidas a três temperaturas, 4°C, -20 °C e -70°C, para verificar qual temperatura ideal de armazenagem. O condicionamento foi realizado em local adequado (freezers, câmaras frias) com controle de temperatura diário com variação média de 5°C. A amostragem foi aleatória em T₀ (tempo zero). Na tabela 7.9 estão apresentados as médias (triplicata) de todos os resultados do estudo de estabilidade obtidos ao longo dos 6 meses e a representação gráfica dos resultados médios nas três temperaturas, gráfico 6.

Tabela 7.9 – Resultados (valores médios) do estudo de estabilidade em diferentes temperaturas de armazenagem.

MÊS	VALORES MÉDIOS		
	4°C	-20°C	-70°C
0	41,19	41,19	41,19
1	40,99	40,59	40,76
2	40,04	40,94	39,58
3	41,89	41,24	41,75
4	40,10	40,36	40,76
5	41,56	41,25	41,30
6	41,46	41,66	41,94

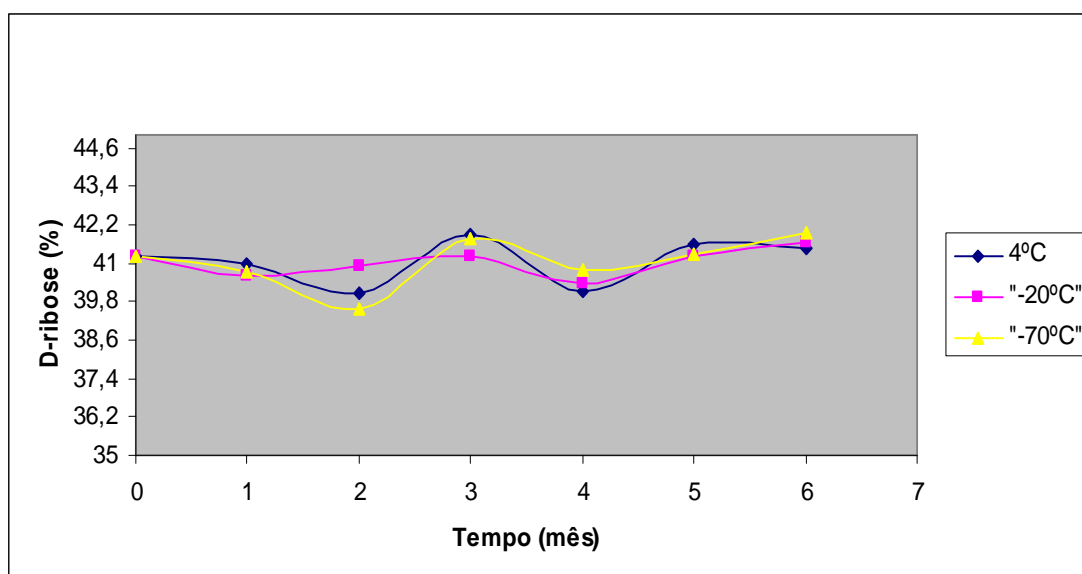


Gráfico 7.4 – Resultados do estudo de estabilidade em tempo real - Conteúdo de D-ribose (%).

A variabilidade observada no gráfico pode ser decorrente da condição de reprodutibilidade em que foram analisadas as amostras, um vez que os valores encontrados, nas três temperaturas, no sexto mês, não difere significativamente do valor obtido em T_0 .

7.8.2. Resultados da reprodutibilidade interna nas temperaturas de armazenagem em tempo real para D-ribose

A Tabela 7.10 apresenta os resultados obtidos de conteúdo de D-ribose a cada mês, em triplicata, para 4^o, - 20^o e - 70^oC. Outros parâmetros como a média, desvio padrão e coeficiente de variação também estão apresentados na mesma tabela.

Tabela 7.10 - Resultados do conteúdo de D-ribose no estudo de estabilidade a 4°C, - 20°C e - 70°C:

Temperatura	4°C			- 20°C			- 70°C		
Mês	valor 1	valor 2	valor 3	valor 1	valor 2	valor 3	valor 1	valor 2	valor 3
1	40,77	40,92	41,27	40,27	40,58	40,92	41,04	40,92	40,31
2	40,32	39,64	40,17	40,17	39,60	43,04	39,53	39,68	39,53
3	41,33	42,47	41,88	41,44	40,89	41,40	42,69	42,14	40,41
4	39,93	40,51	39,85	39,97	40,98	40,13	41,10	41,10	40,09
5	41,58	40,98	42,13	41,58	40,54	41,62	41,50	41,50	40,90
6	41,63	41,79	40,96	41,67	41,71	41,59	41,59	41,86	42,37
Média %	41,01			41,01			41,01		
Desvio Padrão	0,82			0,84			0,95		
Coef. de variação (CV%)	2,01			2,04			2,32		

De acordo com a Resolução nº 899 da ANVISA, para precisão, onde a reprodutibilidade interna está inclusa, o valor máximo aceitável de CV(%) deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%. Na tabela 7.10, os coeficientes de variação encontrados foram menores por este critério e, portanto, isto é um indicativo de estabilidade do material nas 3 temperaturas estudadas.

7.8.3. Análise de tendência dos resultados do estudo a 4°C, - 20°C e - 70°C.

Para esta avaliação estatística, foram consideradas as médias de todos os meses, inclusive o tempo zero do estudo (T_0), levando-se em conta o valor de 41,19 % de D-ribose (tabela 22). As médias e os resultados de valores de análise de tendência calculados conforme o item 5.2.2 estão descritos na tabela 7.11, para as 3 temperaturas estudadas.

Tabela 7.11 - Valores médios obtidos e resultados de análise de tendência para o teste de**D-ribose:**

T(mês)	4°C	-20°C	-70°C
0	41,19	41,19	41,19
1	40,99	40,59	40,76
2	40,04	40,94	39,58
3	41,89	41,24	41,75
4	40,10	40,36	40,76
5	41,56	41,25	41,30
6	41,46	41,66	41,94
b ₁	0,0720	0,076	0,161
b ₀	40,82	40,803	40,555
s	0,767	0,447	0,769
s(b ₁)	0,1449	0,084	0,145

A sensibilidade é avaliada pela expressão $b_1 I < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$, cujo valor de *T-Student* (t) para n-2 graus de liberdade e P=0,95 (95% nível de confiança) é igual a 2,015, então:

$$\text{Para } 4^{\circ}\text{C temos: } 10,0720 I < 2,015 \times 0,1449 = 0,0720 < 0,1568$$

Para -20°C , o resultado encontrado para a expressão acima é $0,076 < 0,170$ e para -70°C é $0,1614 < 0,293$.

Como as condições da expressão foram obedecidas, a sensibilidade ou inclinação é insignificante. Como consequência, não há instabilidade observada nos resultados de estudo de estabilidade em tempo real, a 4°C , a -20°C e -70°C , durante seis meses de estudo.

7.8.4. Análise de resíduos dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, para conteúdo de D-ribose, em tempo real.

Para avaliar a dispersão dos valores obtidos em relação aos valores previstos foi utilizando a ferramenta estatística chamada análise de resíduos. Esta análise foi aplicada para os dados nas três temperaturas (4°C , -20°C e -70°C) e encontram-se nas tabelas 7.12, 7.13 e 7.14. A plotagem dos respectivos resíduos estão apresentados nos gráficos 7.5, 7.6 e 7.7 e, o ajuste de linha nos gráficos 7.8, 7.9 e 7.10.

Tabela 7.12 - Resultados de resíduos a 4°C .

Mês	<i>Y</i> previsto	Resíduos	Resíduos padrão
0	40,817	0,373	0,532
1	40,889	0,097	0,139
2	40,961	-0,918	-1,311
3	41,033	0,860	1,228
4	41,105	-1,009	-1,441
5	41,177	0,386	0,551
6	41,249	0,211	0,301

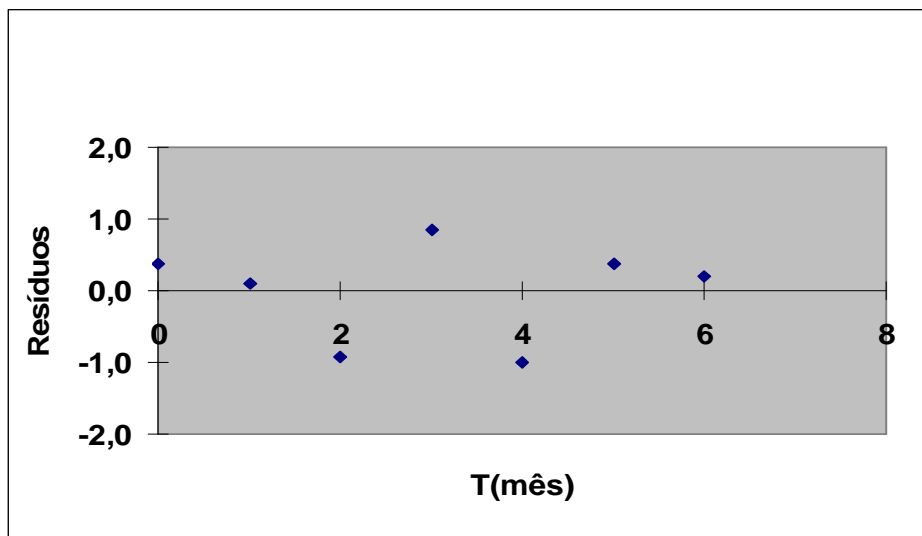
Tabela 7.13 - Resultados de resíduos a -20 °C.

<i>Mês</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	40,803	0,387	0,949
1	40,879	-0,289	-0,709
2	40,956	-0,019	-0,046
3	41,032	0,211	0,518
4	41,108	-0,748	-1,834
5	41,185	0,062	0,152
6	41,261	0,396	0,970

Tabela 7.14 - Resultados de resíduos a -70°C.

<i>Mês</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	40,555	0,635	0,904
1	40,717	0,040	0,057
2	40,878	-1,298	-1,849
3	41,040	0,707	1,007
4	41,201	-0,438	-0,623
5	41,362	-0,062	-0,089
6	41,524	0,416	0,593

Foi verificado que os resíduos padrões, nas três temperaturas, apresentam-se dentro da faixa de normalidade, isto é, entre os valores -2 e +2.

**Gráfico 7.5 - Plotagem de resíduos (4°C).**

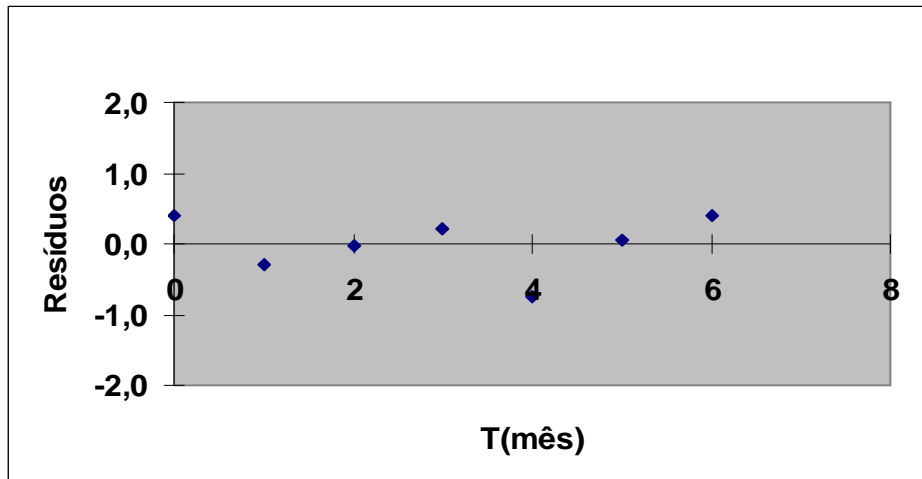


Gráfico 7.6 - Plotagem de resíduos (-20°C).

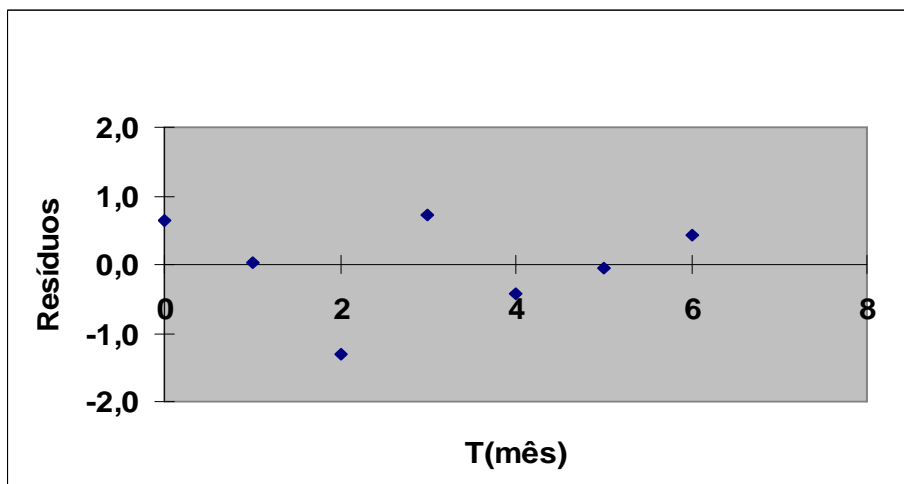


Gráfico 7.7 - Plotagem de resíduos (-70°C).

Nos gráficos de plotagem de resíduos para as três temperaturas estudadas foi verificada uma distribuição homogênea dos resíduos, sem apresentar uma tendência.

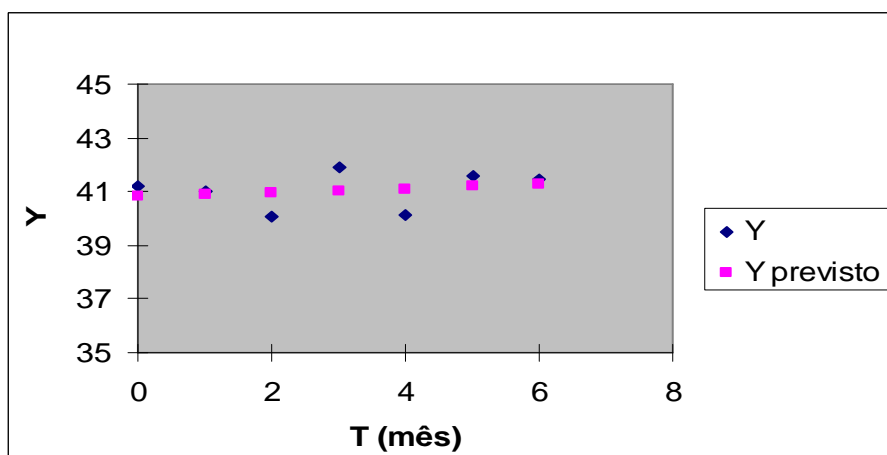


Gráfico 7.8 - Plotagem de ajuste da linha (4°C).

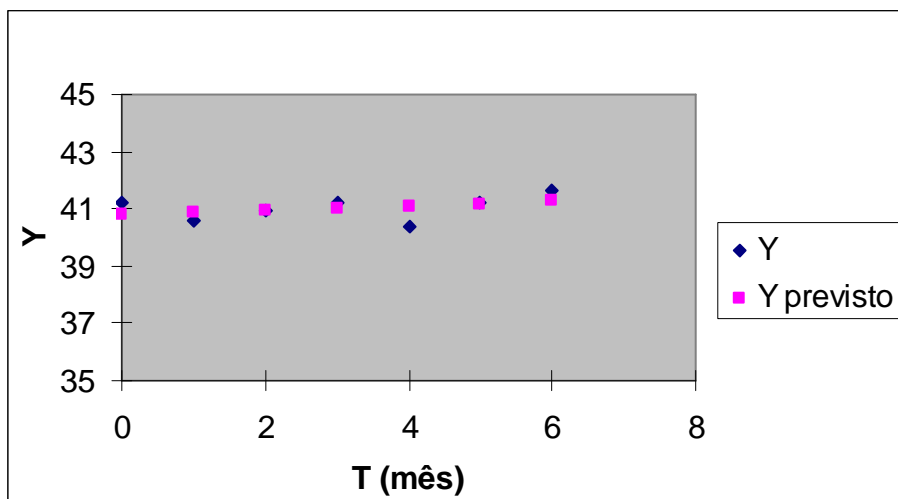


Gráfico 7.9 - Plotagem de ajuste da linha (-20°C).

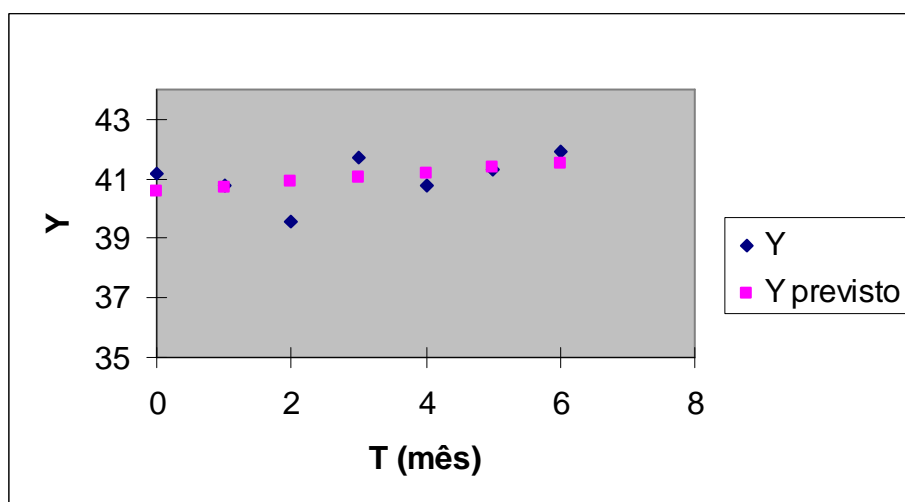


Gráfico 7.10 - Plotagem de ajuste da linha (-70°C).

Verificou-se nos gráficos de plotagem de ajuste de linha, nas três temperaturas estudadas, que os valores encontrados estão próximos dos valores previstos. A variação dos valores entre os pontos 2 e 4 (entre a 2^o e 4^o meses) são maiores que os outros, entretanto de acordo com as avaliações estatísticas realizadas anteriormente, todos os valores são aceitáveis, comprovando estabilidade do material armazenado a 4°C e nas demais temperaturas.

7.8.5. Estudo de estabilidade acelerado para o conteúdo de D-ribose no MR a 25^oC e 37^oC.

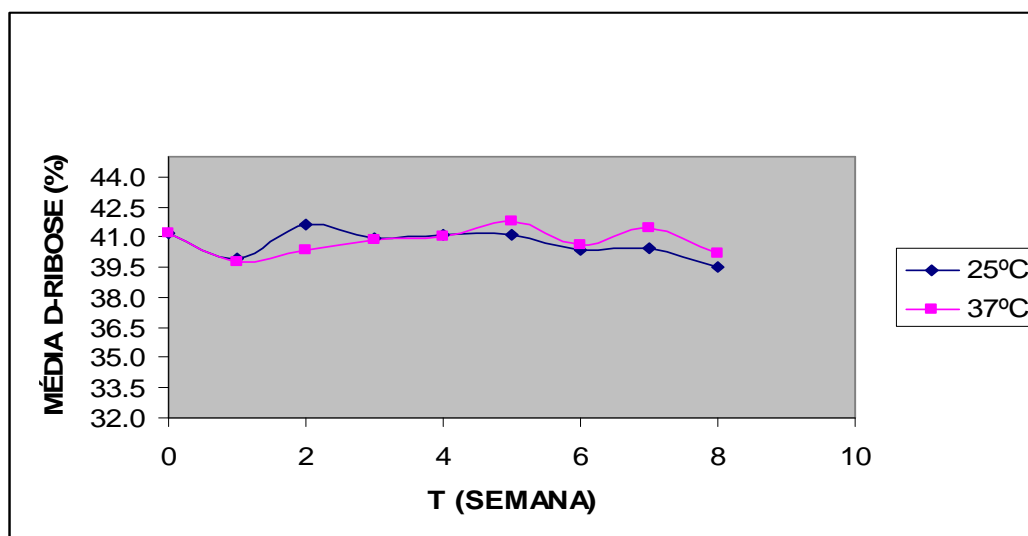
Realizou-se o estudo de estabilidade acelerado nas temperaturas de 25^oC e 37^oC. Os resultados das triplicatas e as médias obtidas encontram-se nas tabelas 7.15 e 7.16. Para visualizar as alterações ocorridas, construiu-se um gráfico (gráfico 7.11) com as médias em ambas as temperaturas.

Tabela 7.15 - Resultados de D-ribose no estudo de estabilidade acelerado a 25°C.

semana	valor 1	valor 2	valor 3	Média
0	---	---	---	41,19
1	39,54	40,00	40,23	39,92
2	41,74	41,66	41,55	41,65
3	41,29	40,53	40,91	40,91
4	40,64	41,44	41,25	41,11
5	41,34	41,08	40,97	41,13
6	39,92	40,31	40,92	40,38
7	39,32	40,51	41,59	40,47
8	39,70	39,70	39,16	39,52

Tabela 7.16 - Resultados de D-ribose no estudo de estabilidade acelerado a 37°C.

semana	valor 1	valor 2	valor 3	Média
0	---	---	---	41,19
1	39,35	39,73	40,23	39,77
2	40,24	40,05	40,86	40,38
3	41,29	39,77	41,48	40,85
4	41,25	41,06	40,67	40,99
5	41,91	41,80	41,76	41,82
6	40,46	41,62	39,69	40,59
7	41,09	41,51	41,89	41,50
8	40,28	40,36	40,01	40,22

**Gráfico 7.11 - Médias dos resultados de conteúdo de D-ribose versus semana do estudo acelerado a 25°C e 37°C.**

Pode-se observar que as variações são similares para as duas temperaturas estudadas e não houve uma variação significativa no teor de conteúdo de D-ribose ao longo de 8 semanas.

Para verificar a repetitividade dos resultados calcularam-se as médias, desvios padrão e coeficientes de variação (CV%) e os resultados estão apresentados na tabela 7.17.

Tabela 7.17 - Resultados de precisão dos testes realizados com amostras a 25°C e 37°C.

Temperatura das amostras em estudo	25°C	37°C
Média %	40,64	40,77
Desvio Padrão	0,79	0,79
Coefficiente de variação (CV%)	1,95	1,95

Os coeficientes de variação são menores que 5%, indicando uma repetitividade de acordo com a resolução nº899 da ANVISA.

7.8.6. Análise de tendência dos resultados a 25°C e 37°C.

A análise de tendência foi realizada conforme o item 5.2.2. Neste estudo foram consideradas as médias de todas as semanas, inclusive o tempo zero do estudo (T_0), cujo valor da caracterização é 41,19% de conteúdo de D-ribose, descrito na tabela 7.18.

Tabela 7.18- valores médios de D-ribose e resultados da análise de tendência (MR a 25°C e 37°C).

T	25°C	37°C
0	41,19	41,19
1	39,92	39,77
2	41,65	40,38
3	40,91	40,85
4	41,11	40,99
5	41,13	41,82
6	40,38	40,59
7	40,47	41,50
8	39,52	40,22
b_1	-0,123	0,045
b_0	41,188	40,632
s	0,632	0,678
$s(b_1)$	0,082	0,088

Para a avaliação da sensibilidade foi aplicada a equação $|b_1| < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ cujo o valor de *T-Student* (t) para $n-2$ graus de liberdade e $P=0,95$ (95% nível de confiança) é igual a 1,895.

Para o estudo a 25°C a comparação obtida foi $0,123 < 0,155$ e para 37°C foi $0,045 < 0,166$. Como a condição da expressão foi atendida, não há instabilidade observada nos resultados de estabilidade acelerada nas temperaturas estudadas, durante dois meses de estudo, confirmando a estabilidade do material.

7.8.7. Análise de resíduo dos resultados de estudo de estabilidade do conteúdo de D-ribose para 25 °C e 37 °C.

Os resultados da análise de resíduos, nas duas temperaturas, estão contidos nas tabelas 7.19 e 7.20 a plotagem dos resíduos estão nos gráficos 7.12 e 7.13 e plotagem do ajuste da linha nos gráficos 7.14 e 7.15.

Tabela 7.19 - Resultados de resíduos a 25°C.

<i>semana</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	41,188	0,002	0,003
1	41,066	-1,143	-1,936
2	40,944	0,706	1,196
3	40,821	0,089	0,150
4	40,699	0,411	0,696
5	40,577	0,554	0,938
6	40,454	-0,071	-0,120
7	40,332	0,142	0,240
8	40,209	-0,689	-1,168

Tabela 7.20 - Resultados de resíduos a 37°C.

<i>semana</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	40,634	0,556	0,876
1	40,678	-0,908	-1,431
2	40,723	-0,340	-0,535
3	40,768	0,079	0,125
4	40,812	0,181	0,285
5	40,857	0,966	1,523
6	40,901	-0,311	-0,491
7	40,946	0,551	0,868
8	40,991	-0,774	-1,220

Foi verificado que os resíduos padrões, nas temperaturas estudadas, apresentam-se dentro da faixa de normalidade, isto é, entre os valores -2 e +2.

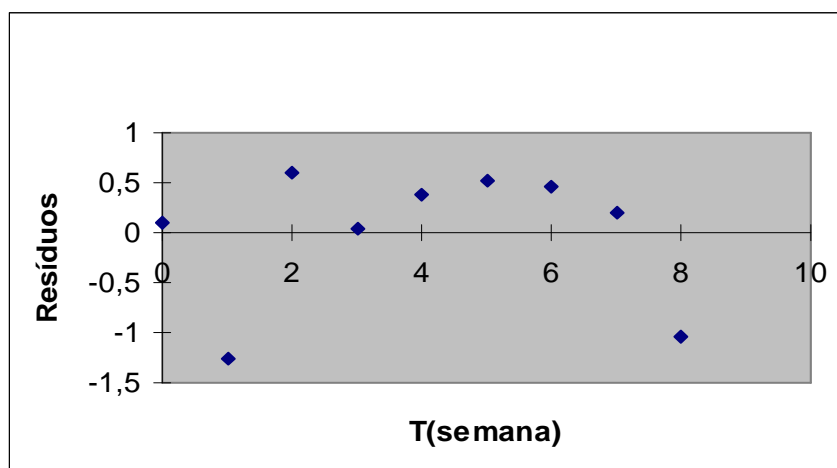


Gráfico 7.12 – D-ribose - Plotagem de resíduos a 25°C.

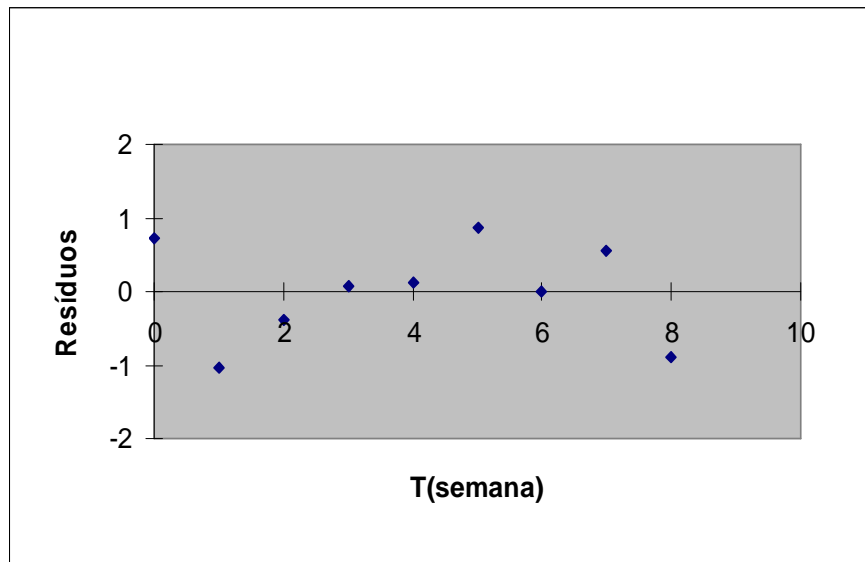


Gráfico 7.13 – D- ribose - Plotagem de resíduos a 37°C.

Nestes gráficos, verifica-se uma distribuição homogênea dos resíduos, sem apresentar uma tendência, ou seja, sem apresentar um aumento ou decréscimo de resíduos ao longo do tempo decorrente da degradação da amostra.

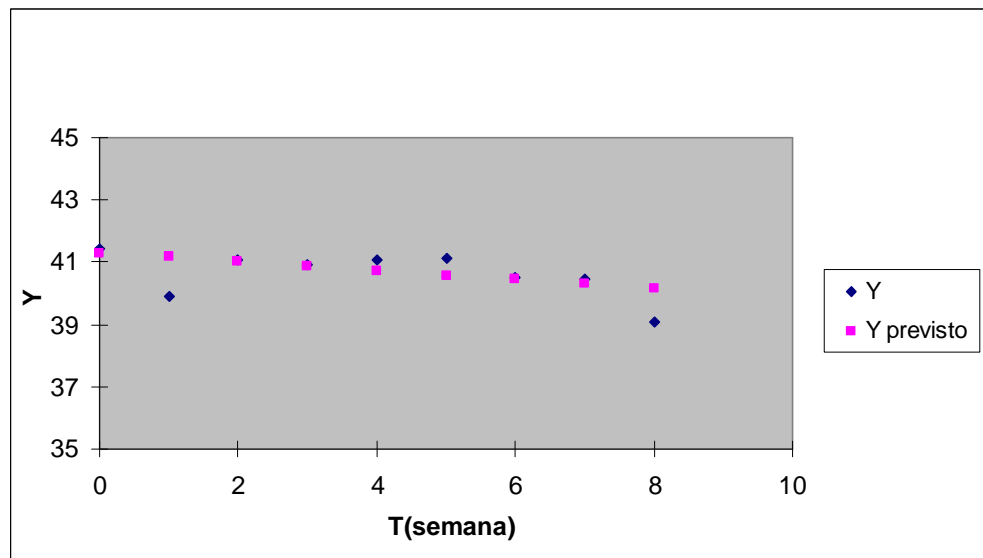


Gráfico 7.14 - Plotagem de ajuste da linha (25 °C).

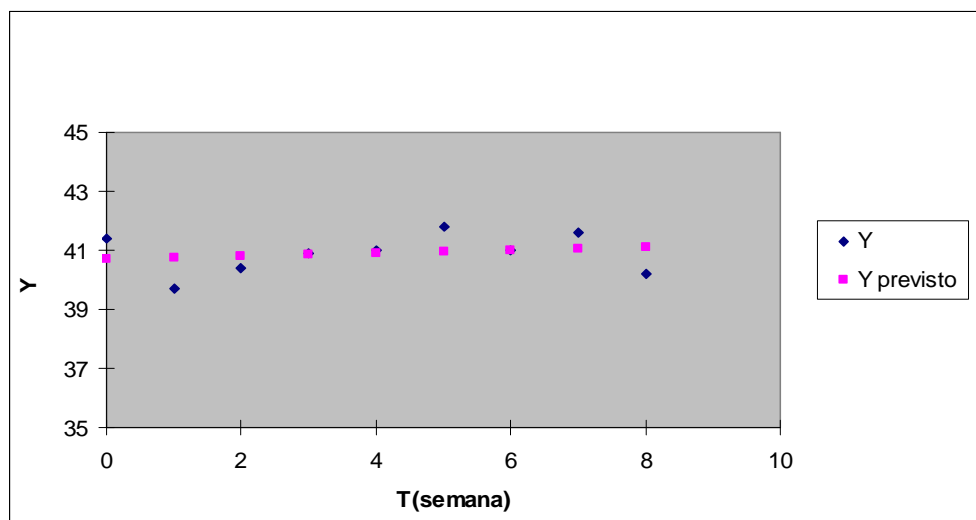


Gráfico 7.15 - Plotagem de ajuste da linha (37 °C).

Verificou-se nos gráficos de plotagem de ajuste de linha que os valores encontrados estão próximos dos valores previstos e a dispersão existente é menor no final do período de 8 semanas de avaliação, comprovando estabilidade do material armazenado à 25⁰C e a 37°C.

7.9. Caracterização Nominal por Fósforo

A caracterização do MR em relação ao conteúdo de fósforo foi realizada utilizando-se o método de Chen (implantado/validado no LAFIQ), retirando-se alíquotas diretamente do frasco de solução antes do envase do material. A tabela 7.21 contém os resultados obtidos na análise realizada nas mesmas condições.

Tabela 7.21 - Resultados de caracterização de Fósforo

n	Conteúdo de fósforo (%)
1	7,78
2	7,85
3	7,82
4	7,64
5	7,85
6	7,83
7	8,13
8	7,70
9	7,89
10	7,76
Média %	7,83
Desvio Padrão	0,13
Coefficiente de variação (CV%)	1,67

O valor nominal encontrado para o conteúdo de fósforo foi de 7,83% e o coeficiente de variação obtido em condições de repetitividade encontrado foi de 1,65; menor que 5% que

é o critério estabelecido pela Resolução nº 899 (ANVISA), portanto os resultados são homogêneos entre si.

Para visualização da distribuição dos resultados, foi confeccionada a carta de controle, de acordo com a norma ISO 5725-6. O gráfico 7.16 foi realizado da mesma forma que o utilizado para caracterização de D-ribose, item 7.5, com a presença da linha central, os limites de controle, limites de atenção e limites de ação.

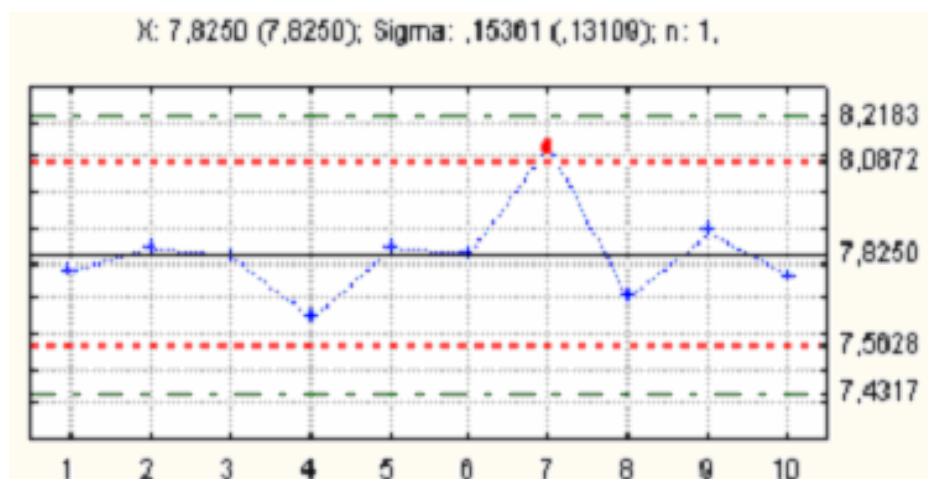


Gráfico 7.16 - Carta de controle dos resultados de caracterização de fósforo.

Nesta carta, apenas um ponto está entre os limites de atenção. Neste caso este resultado é o maior entre os demais, definido como amplitude superior do conjunto de dados. Para avaliar se o este valor é aberrante foi aplicado o teste de Grubbs, conforme o item 6.1.4.3.1, realizado na validação do teste de fósforo onde,

$$G = \frac{7,83 - 7,89}{0,13} = 0,462$$

O valor tabelado para n=10 é de =2,290, para 95% de significância. Como $G_{\text{encontrado}} < G_{\text{tabelado (95%)}}$ ou seja $0,462 < 2,290$, o valor suspeito não é considerado aberrante.

7.10. Teste de homogeneidade para conteúdo de fósforo

As amostras foram separadas da mesma forma descrita no estudo da homogeneidade para o conteúdo de D-ribose, item 7.7. sendo os mesmos frascos. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7.22 e a tabela 7.23 contém os dados da aplicação da ANOVA.

Tabela 7.22- Resultados do estudo de homogeneidade de fósforo.

	Frasco	Resultados “intra-frascos” (%)		
		Alíquota		
		1	2	3
Resultados de cada frasco - “entre frascos” (%)	1	7,82	7,79	7,84
	2	7,68	8,00	7,96
	3	7,84	8,08	7,84
	4	7,63	7,86	7,94
	5	7,82	8,44	7,86
	6	7,74	7,81	7,84
	7	7,61	7,73	7,92
	8	7,70	7,90	7,75
	9	7,78	7,98	7,49
	10	7,90	7,88	7,61
	11	7,80	7,77	7,47
	12	7,59	8,04	7,81
	13	7,84	7,81	7,86
	14	7,88	7,82	7,59

Tabela 7.23 – Análise de variância dos resultados do estudo de homogeneidade de fósforo.

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Frasco 1	3	23,443	7,81	0,0007		
Frasco 2	3	23,650	7,88	0,0304		
Frasco 3	3	23,759	7,92	0,0198		
Frasco 4	3	23,434	7,81	0,0275		
Frasco 5	3	24,115	8,04	0,1204		
Frasco 6	3	23,385	7,79	0,0024		
Frasco 7	3	23,256	7,75	0,0258		
Frasco 8	3	23,353	7,78	0,0112		
Frasco 9	3	23,253	7,75	0,0615		
Frasco 10	3	23,388	7,80	0,0267		
Frasco 11	3	23,036	7,68	0,0328		
Frasco 12	3	23,434	7,81	0,0520		
Frasco 13	3	23,501	7,83	0,0007		
Frasco 14	3	23,289	7,76	0,0240		
ANOVA						
Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre Frascos	0,291	13	0,0224	0,718	0,731	2,09
Dentro dos Frascos	0,872	28	0,031			
Total	1,163	41				

Verificou-se que o $F_{\text{calculado}}$ é menor que o $F_{\text{crítico}}$ (tabelado) e o *valor-P* está acima de 0,05. Desta forma, verificamos que não há diferença significativa entre os valores obtidos, demonstrando homogeneidade de resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância. Conclui-se que o lote produzido para uso como material de referência atende em homogeneidade para o teste de fósforo.

7.11. Estudo de estabilidade para conteúdo de fósforo no MR.

7.11.1. Estudo de estabilidade para conteúdo de fósforo em tempo real

O estudo de estabilidade do material candidato a MR foi realizado para avaliação dos resultados das amostras armazenadas a 4°C, -20 °C e -70°C. Inicialmente estava prevista uma avaliação mensal até o sexto mês, entretanto ocorreu um problema técnico no equipamento, impossibilitando a execução dos testes nos 2º, 3º e 4º meses seguintes. Com a substituição do equipamento por um novo devidamente calibrado, pode-se dar continuidade aos testes de estabilidade. A estabilidade foi avaliada com os resultados do 1º, 5º e 6º meses. O resultado de caracterização em T₀ também foi utilizado.

Além da verificação da estabilidade através de testes estatísticos, procedeu-se à avaliação dos valores obtidos, em comparação com a especificação técnica do PRRP para conteúdo de fósforo, cujo valor deve estar entre 6,8 a 9,0% (WHO, 2000).

Na tabela 7.24 encontram-se as médias de todos os resultados do estudo de estabilidade obtidos ao longo dos 6 meses de estudo e a representação gráfica dos resultados médios das três temperaturas no gráfico 19.

Tabela 7.24 – Resultados do estudo de estabilidade para conteúdo de fósforo em diferentes temperaturas de armazenagem (tempo real).

MÊS	VALORES MÉDIOS		
	4°C	-20°C	-70°C
0	7,83	7,83	7,83
1	7,94	8,05	7,99
5	7,78	8,05	7,94
6	7,83	7,80	7,61

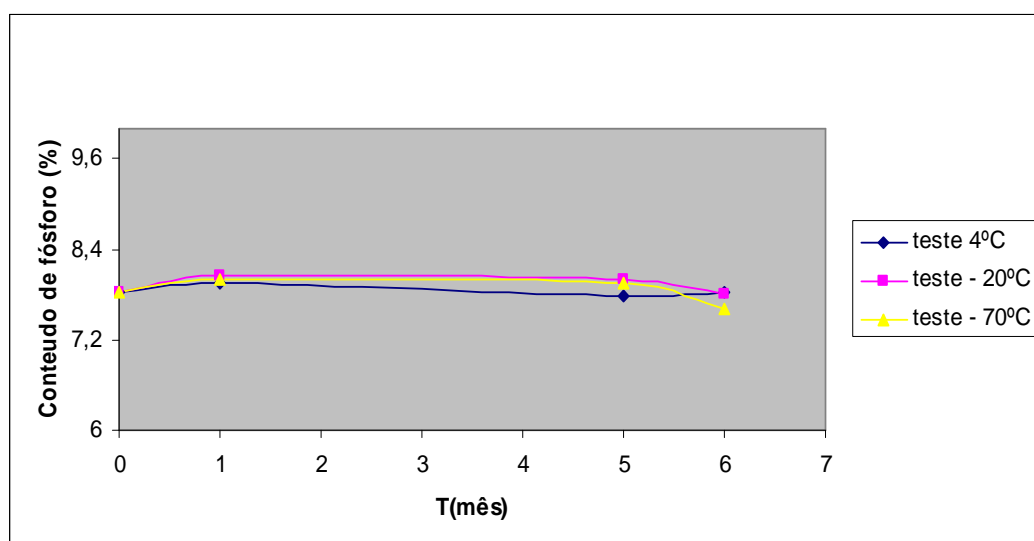


Gráfico 7.17 – Estudo de estabilidade em tempo real - Conteúdo de Fósforo (%).

Com base no gráfico 7.17, é possível visualizar o comportamento dos resultados do material candidato, armazenado em diferentes temperaturas. Os valores médios foram obtidos em triplicata e avaliados com parâmetros de “reprodutibilidade interna” que está apresentado no item 7.11.2.

7.11.2. Resultados de conteúdo de fósforo e reprodutibilidade interna nas diferentes temperaturas de armazenagem, em tempo real.

A Tabela 7.25 apresenta os resultados obtidos a cada mês nas temperaturas de 4°C, -20°C e -70°C. Os ensaios das amostras foram realizados em triplicata.

Tabela 7.25 - Resultados do conteúdo de fósforo no estudo de estabilidade em diferentes temperaturas.

Temperatura	4°C			- 20°C			- 70°C		
Mês	valor 1	valor 2	valor 3	valor 1	valor 2	valor 3	valor 1	valor 2	valor 3
1	7,93	8,01	7,89	8,07	8,03	8,07	8,05	7,99	7,95
5	7,85	7,77	7,71	7,93	8,01	8,01	7,99	7,93	7,89
6	8,04	7,77	7,67	7,77	7,73	7,89	7,62	7,60	7,60
Média %	7,85			7,95			7,85		
Desvio Padrão	0,13			0,12			0,19		
Coefficiente de variação (CV%)	1,63			1,57			2,36		

Os valores obtidos das médias dos resultados de fósforo, nas amostras armazenadas a 4°C, -20°C e -70°C, podem ser consideradas estatisticamente iguais ao valor médio de caracterização de 7,83% \pm 0,22%. Os coeficientes de variação obtidos são menores que 5%, indicando uma reprodutibilidade interna (precisão intermediária) aceitável de acordo com a resolução nº899 da ANVISA.

7.11.3. Análise de tendência dos resultados do estudo a 4°C, - 20°C e - 70°C.

Para esta avaliação estatística, foram consideradas as médias de todos os meses, inclusive o tempo zero do estudo (T_0), considerando-se o valor da caracterização de 7,83 % de fósforo (Tabela 7.26).

Tabela 7.26 - Resultados médios do conteúdo de fósforo, armazenados a 4°C, em relação ao tempo.

T (meses)	4°C	-20°C	-70°C
0	7,83	7,83	7,83
1	7,94	8,05	7,99
5	7,78	7,99	7,94
6	7,83	7,80	7,61
b₁	-0,012	-0,008	-0,030
b₀	7,882	7,942	7,932
s(b₁)	0,014	0,029	0,035

Para a avaliação da sensibilidade foi aplicada a equação $I b_1 I < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ cujo valor de *T-Student* (*t*) para *n-2* graus de liberdade e *P=0,95* (95% nível de confiança) é igual a 2,92.

Para 4°C: $I-0,012 I < 2,92 \times 0,014$ então: $0,012 < 0,040$

-20°C: $I0,008 I < 2,92 \times 0,029 = 0,008 < 0,084$

-70°C: $I-0,030 I < 2,92 \times 0,035 = 0,030 < 0,103$

Como as condições da expressão foram obedecidas, a sensibilidade ou inclinação é insignificante. Como consequência, não há instabilidade observada nos resultados de estudo de estabilidade de fósforo em tempo real, a 4°C, a - 20°C e - 70°C, durante seis meses de estudo.

7.11.4. Análise de resíduos para determinação de fósforo em tempo real a 4°C, - 20°C e - 70°C

As tabelas 7.27, 7.28 e 7.29 apresentam os resultados das análises de resíduos realizadas nas três temperaturas.

Tabela 7.27 - Resultados de resíduos à 4°C (Fósforo).

Observação	<i>Y</i> previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	7,882	-0,052	-0,910
2	7,870	0,070	1,234
3	7,820	-0,040	-0,708
4	7,808	0,022	0,384

Tabela 7.28 - Resultados de resíduos a -20 °C (Fósforo).

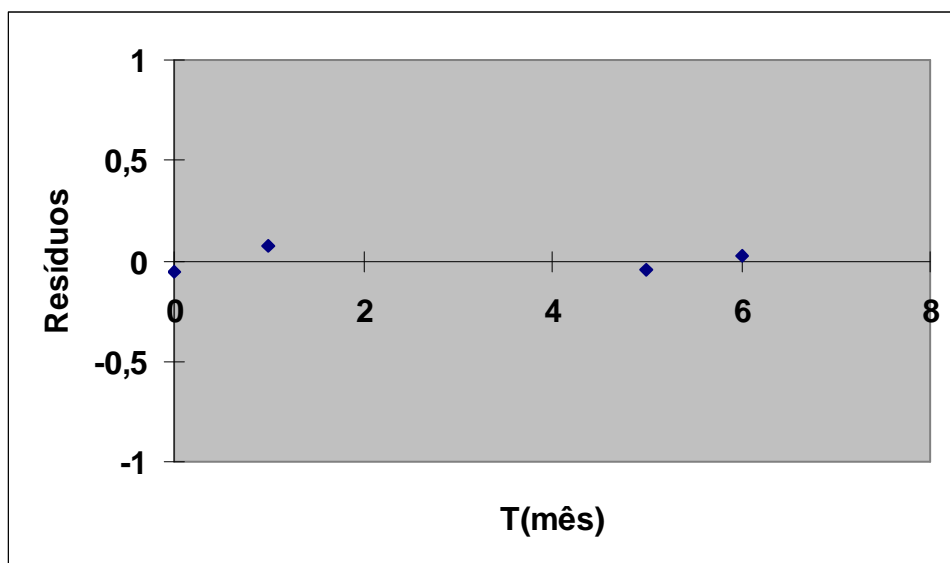
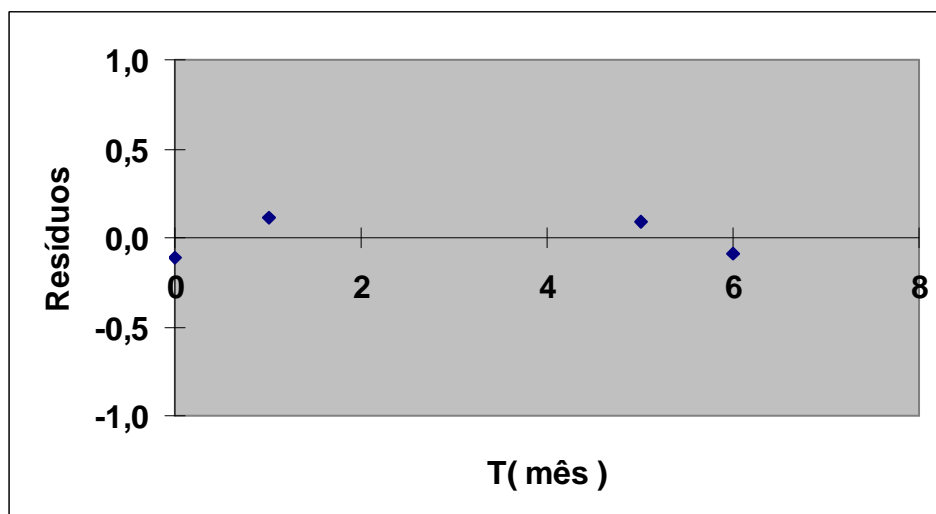
Observação	<i>Y</i> previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	7,942	-0,112	-0,938
2	7,934	0,116	0,977
3	7,901	0,089	0,744
4	7,893	-0,093	-0,783

Tabela 7.29- Resultados de resíduos a -70°C (fósforo).

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	7,933	-0,103	-0,698
2	7,903	0,092	0,624
3	7,783	0,157	1,067
4	7,753	-0,146	-0,993

Foi verificado que os resíduos padrões, nas três temperaturas, apresentam-se dentro da faixa de normalidade, isto é, entre os valores -2 e +2.

A plotagem dos resíduos, nas diferentes temperaturas, está apresentada graficamente nos gráficos 7.18, 7.19, e 7.20, e o ajuste de linhas nos gráficos 7.21, 7.22 e 7.23.

**Gráfico 7.18 - plotagem de resíduos - Fósforo (4°C).****Gráfico 7.19 - plotagem de resíduos -Fósforo (-20°C).**

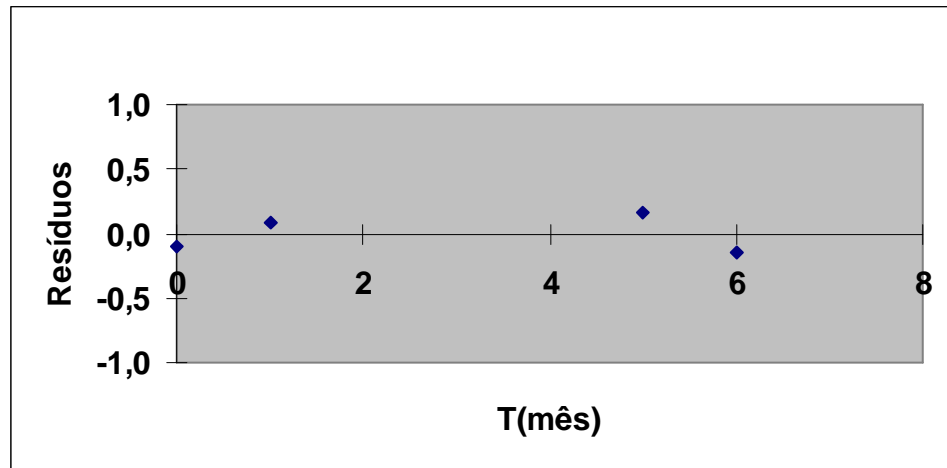


Gráfico 7.20 - plotagem de resíduos - Fósforo (-70°C).

Nos gráficos 7.18, 7.19, e 7.20, verificam-se uma distribuição homogênea dos resíduos, com valores dispersos sem apresentar uma tendência que demonstre instabilidade do candidato a MR para fósforo, com os resíduos distribuídos na faixa de 0,5 a -0,5.

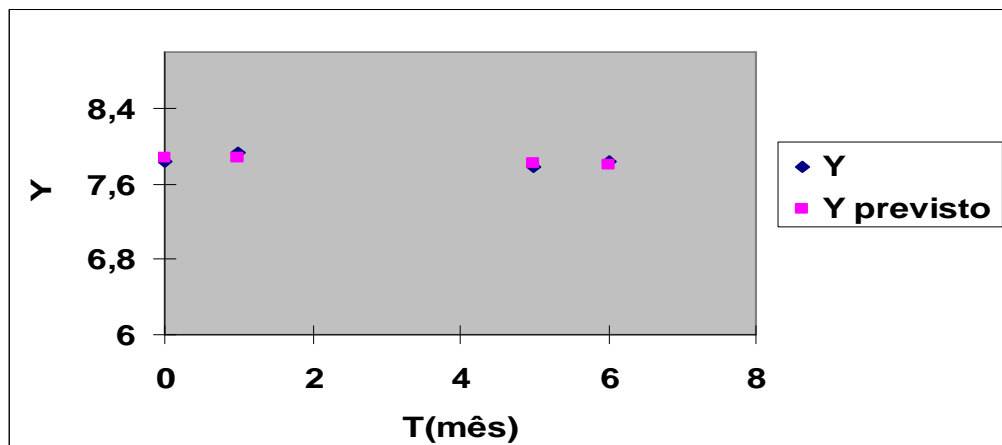


Gráfico 7.21 - Plotagem de ajuste da linha (4°C).

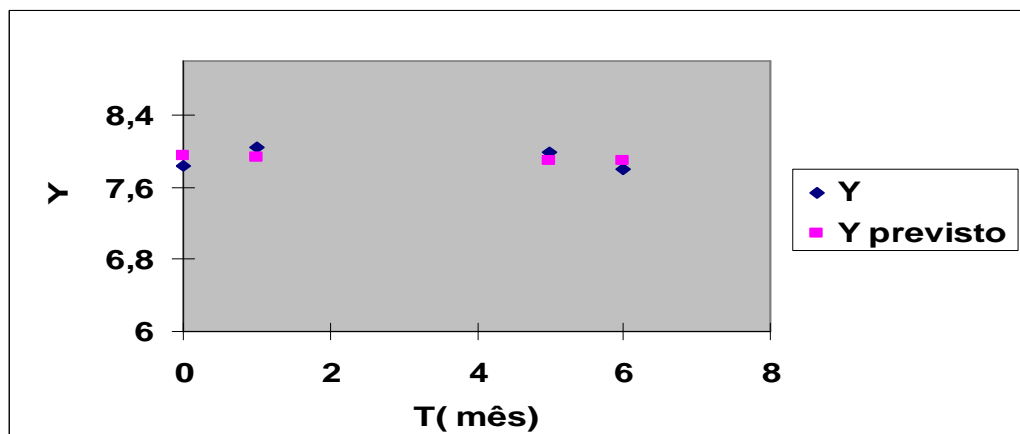


Gráfico 7.22 - Plotagem de ajuste da linha (-20°C).

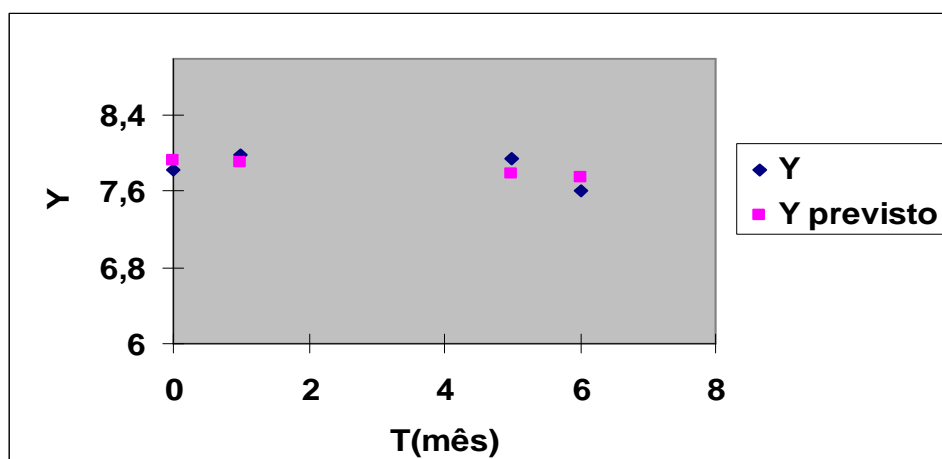


Gráfico 7.23 - Plotagem de ajuste da linha (-70°C).

Os gráficos 7.21, 7.22 e 7.23 demonstram que os valores encontrados estão próximos dos valores previstos, confirmando uma dispersão de resultados aceitável para o período de 6 meses de avaliação, comprovando estabilidade do material armazenado a 4^o, - 20^o e -70°C.

7.11.5. Estudo de estabilidade acelerado para o conteúdo de fósforo no MR a 25°C e 37°C.

Realizou-se o estudo de estabilidade acelerado nas temperaturas de 25°C e 37°C durante 8 semanas. Os resultados das triplicatas e os valores médios encontram-se nas tabelas 7.30 e 7.31 para visualizar as alterações ocorridas, confeccionou-se um gráfico versus médias em ambas as temperaturas.

Tabela 7.30- Resultados de fósforo no estudo de estabilidade acelerado a 25°C

semana	valor 1	valor 2	valor 3	média 25 °C
1	7,69	7,59	7,57	7,62
2	7,81	8,18	8,1	8,03
3	7,94	8,15	7,86	7,98
4	7,82	8,04	7,98	7,95
5	7,99	8,05	8,03	8,02
6	8,15	7,75	7,83	7,91
7	7,89	7,95	8,01	7,95
8	7,75	7,98	8,08	7,94

Tabela 7.31 - Resultados de fósforo no estudo de estabilidade acelerado a 37°C

semana	valor 1	valor 2	valor 3	média 37°C
1	7,75	7,75	7,51	7,67
2	8,06	7,93	8,00	8,00
3	8,13	7,96	7,88	7,99
4	7,94	8,06	8,08	8,03
5	7,99	8,03	8,07	8,03
6	8,03	7,93	8,15	8,04
7	7,95	7,48	7,91	7,78
8	7,85	7,98	8,00	7,94

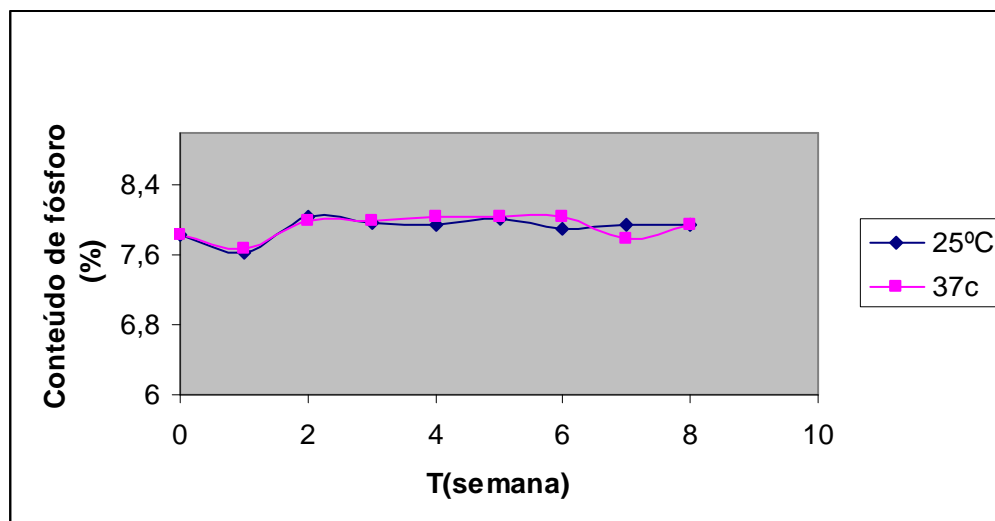


Gráfico 7.24- Médias dos resultados de fósforo versus semana do estudo acelerado a 25°C e 37°C.

O gráfico acima demonstra os resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerado e inclui o valor de caracterização (T_0).

A repetitividade dos resultados foi demonstrada através do coeficiente de variação (CV%), em que todos os CVs são menores que 5%, tabela 7.32 que indica precisão aceitável de acordo com a resolução nº 899 da ANVISA.

Tabela 7.32 - Resultados de precisão dos testes realizados com amostras a 25°C e 37°C.

Temperatura das amostras em estudo	25°C	37°C
Média %	7,92	7,93
Desvio Padrão	0,17	0,17
Coeficiente de variação (CV%)	2,16	2,13

7.11.6. Análise de tendência dos resultados a 25°C e 37°C

A análise de tendência foi realizada conforme o item 5.2.2. Neste estudo foram consideradas as médias de todas as semanas, inclusive o tempo zero do estudo (T_0) cujo valor da caracterização é 7,83% de conteúdo de fósforo, descrito na tabela 7.33.

Tabela 7.33 - valores médios do conteúdo de fósforo a 25 °C e 37⁰C.

T	25°C	37°C
0	7,83	7,83
1	7,62	7,67
2	8,03	8,00
3	7,98	7,99
4	7,95	8,03
5	8,02	8,03
6	7,91	8,04
7	7,95	7,78
8	7,94	7,94
b₁	0,021	0,015
b₀	7,832	7,864
s	0,120	0,135
s(b₁)	0,015	0,017

Para a avaliação da sensibilidade foi aplicada a equação $I b_1 I < t_{0,95,n-2} \cdot s(b_1)$ cujo o valor de *T-Student* (t) para n-2 graus de liberdade e P=0,95 (95% nível de confiança) é igual a 1,895. Para o estudo a 25⁰C a comparação obtida foi $0,021 < 0,029$ e para 37⁰C foi $0,015 < 0,033$. Como a condição da expressão foi atendida, não há instabilidade observada nos resultados de estabilidade acelerada nas temperaturas estudadas, durante dois meses de estudo, confirmando a estabilidade do material mesmo em condições não ideais de armazenamento.

7.11.7. Análise de resíduo dos resultados de estudo de estabilidade do conteúdo de fósforo para 25⁰C e 37⁰C

Os resultados da análise de resíduos, nas duas temperaturas, estão contidos nas tabelas 7.34 e 7.35 e a plotagem dos resíduos estão nos gráficos 7.25 e 7.26.

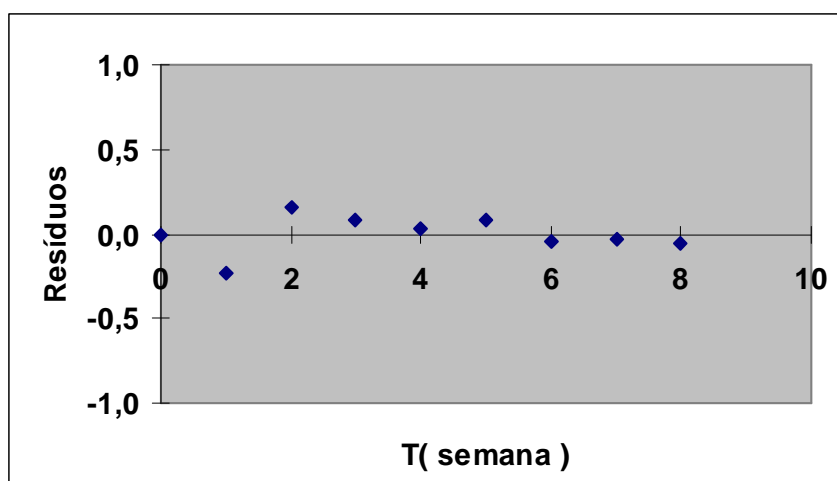
Tabela 7.34 - Resultados de resíduos a 25°C.

<i>Tempo (semana)</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	7,832	-0,002	-0,022
1	7,853	-0,233	-2,077
2	7,873	0,157	1,396
3	7,894	0,086	0,767
4	7,914	0,036	0,317
5	7,935	0,085	0,758
6	7,955	-0,045	-0,405
7	7,976	-0,026	-0,231
8	7,996	-0,056	-0,503

Tabela 7.35 - Resultados de resíduos a 37°C.

<i>Tempo (semana)</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
0	7,864	-0,034	-0,270
1	7,879	-0,209	-1,656
2	7,894	0,106	0,843
3	7,909	0,081	0,646
4	7,923	0,107	0,846
5	7,938	0,092	0,728
6	7,953	0,087	0,690
7	7,968	-0,188	-1,490
8	7,983	-0,043	-0,338

Verifica-se que os resíduos padrões estão dentro da faixa de normalidade entre -2 e +2, sendo somente a observação 2 (-2,077), sujeita à análise, segundo a tabela 7.34. Como este resultado foi referente à 1ª semana (T_1) do estudo acelerado e outros resultados mantiveram-se dentro da normalidade, supõe-se que o fato não é decorrente do material candidato a material de referência, e sim proveniente do erro analítico.

**Gráfico 7.25 – Fósforo - Plotagem de resíduos a 25°C.**

Neste gráfico, observa-se que os resultados médios estão bem próximos a linha central, exceto o ponto 1 referente à primeira semana, que já foi justificado anteriormente.

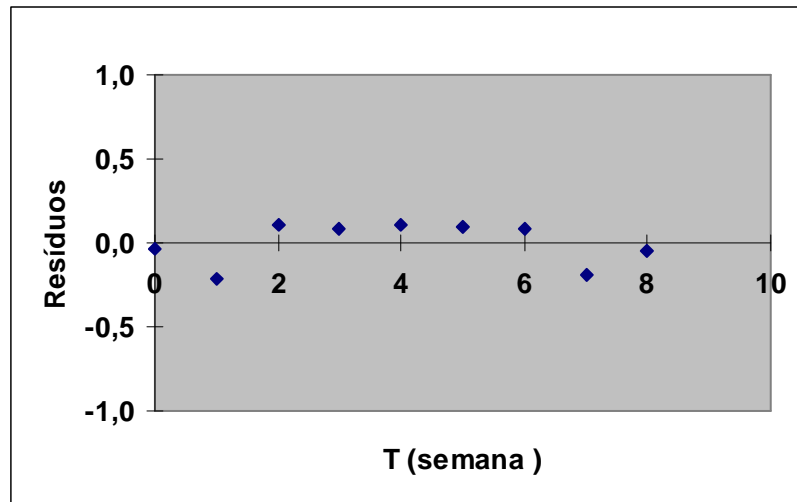


Gráfico 7.26 – Fósforo - Plotagem de resíduos a 37°C.

No gráfico 7.26, observa-se que os resultados médios estão bem próximos a linha central, exceto o ponto 1 referente à primeira semana, que já foi justificado anteriormente.

À temperatura de 37°C, entre os pontos 2 a 6 (2º a 6º semana) os resultados apresentaram uma leve tendência superior dos resíduos. Porém como os resíduos estão dentro do intervalo de 2 a -2 [2,-2] e conclui-se que o material em estudo manteve a estabilidade enquanto estocado a 37°C, durante 2 meses.

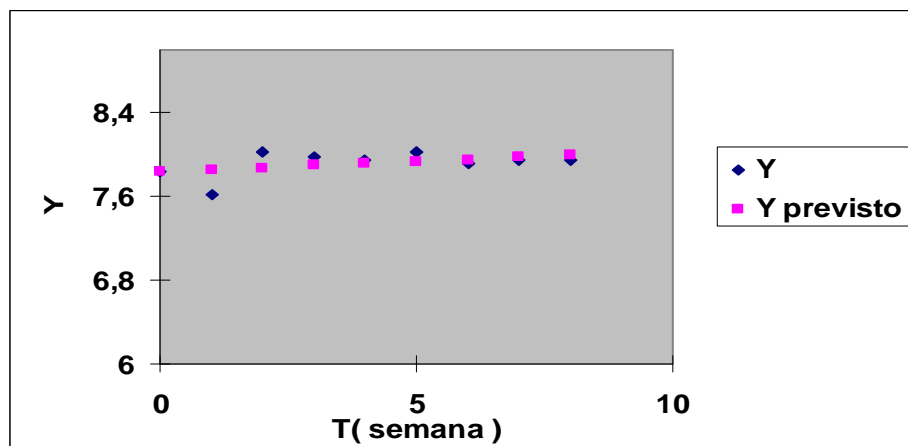


Gráfico 7.27 - Plotagem de ajuste da linha (25 °C).

Com base no gráfico 7.27, verifica-se que os valores encontrados estão próximos dos valores previstos com dispersão aceitável para o período de 8 semanas de avaliação, comprovando estabilidade do material armazenado à 25°C.

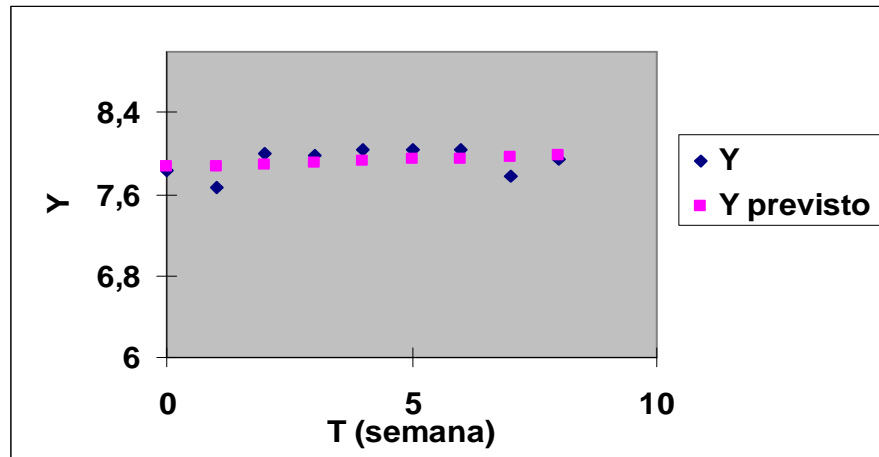


Gráfico 7.28 - Plotagem de ajuste da linha (37 °C).

Verificou-se através do gráfico acima que os valores encontrados estão próximos dos valores previstos. Visualmente, apresenta uma variação aceitável, comprovada estatisticamente nas avaliações de repetitividade, análise de tendência e análise de resíduos. Desta forma, é reafirmada a estabilidade do material armazenado a 37°C.

7.12. Resultados de incerteza para certificação do material de referência de PRRP

7.12.1. Cálculo do componente de incerteza associada a caracterização:

De acordo com o item 5.3, os componentes para cálculo da incerteza associada a caracterização considerados na determinação deste componente de incerteza estão descritos no quadro 7.1.

Quadro 7.1 – componentes da incerteza de caracterização de D-ribose:

Símbolo	Nome / Fonte de incerteza
u_{1A}	repetitividade atribuída na caracterização= $s/\text{raiz}(n)$ s = desvio padrão amostral entre as 8 medidas n = 8
u_{2A}	Ajuste da Curva
u_{1B}	Incerteza da calibração do espectrofotômetro (Certificado)
u_{2B}	Dúvida na leitura do Espectrofotômetro ("resolução")
u_{3B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)-v-13-002
u_{4B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{5B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (assumido)
u_{6B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (Certificado)V-13-282
u_{7B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{8B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (assumido)
u_{9B}	Incerteza calibração da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{10B}	Erro não corrigido da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{11B}	Incerteza da calibração da Balança utilizada na pesagem da amostra (Certificado)
u_{12B}	Dúvida na leitura da Balança utilizada na pesagem da amostra ("resolução")
u_{13B}	Incerteza da micropipeta da alíquota para desenvolvimento de cor (Certificado)
u_{14B}	Erro não corrigido da micropipeta p/ desenvolvimento de cor (Certificado)
u_{15B}	Incerteza do coeficiente linear da regressão linear (referente a solução padrão de D-ribose)
u_{16B}	Incerteza do coeficiente angular da regressão linear (referente a solução padrão de D-ribose)

Tabela 7.36- Cálculo de estimativa de incerteza dos resultados de caracterização de D-ribose.

Símbolo	Valor (±)		PA (%)	Distribuição de probabilidade		C_i Coeficiente de Sensibilidade		Incerteza Padrão PA = 68% (%)	V_{eff} Graus de Liberdade
					divisor				
u_{1A}	0,198	%(m/m)	68	normal	1	1		± 0,19799	7
u_{2A}	0,201	%(m/m)	100	retangular	$\sqrt{3}$	1		± 0,11605	infinito
u_{1B}	0,024	ABS	95	normal	k =2,00	35,714	% / ABS	± 0,42857	infinito
u_{2B}	0,0005	ABS	100	retangular	$\sqrt{3}$	35,714	% / ABS	± 0,01031	infinito
u_{3B}	1,10	mL	95,45	normal	k=2,00	0,020	% / mL	± 0,01100	infinito
u_{4B}	2,90	mL	100	padrão (assumida)	1	0,020	% / mL	± 0,05800	infinito
u_{5B}	0,707	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,020	% / mL	± 0,00816	infinito
u_{6B}	0,01	mL	95,45	normal	k =2,43	4,071	% / mL	± 0,01675	infinito
u_{7B}	0,00	mL	100	padrão (assumida)	1	4,071	% / mL	± 0,00	infinito
u_{8B}	0,040	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	4,071	% / mL	± 0,09402	infinito
u_{9B}	0,001	mL	95,45	normal	k =2,32	40,714	% / mL	± 0,01755	infinito
u_{10B}	0,002	mL	100	padrão (assumida)	=1	40,714	% / mL	± 0,08143	infinito
u_{11B}	1000	ug	95,45	normal	k =2,00	0,0000407	% / ug	± 0,02	infinito
u_{12B}	500	ug	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,0000407	% / ug	± 0,01	infinito
u_{13B}	0,001	mL	100	normal	k =2,320	101,786	% / mL	± 0,04387	16
u_{14B}	0,002	mL	100	padrão (assumida)	1	101,786	% / mL	± 0,20357	infinito
u_{15B}	0,00144	ABS	95	normal	k =1,96	35,714	% / ABS	± 0,02624	732
u_{16B}	0,00148	ABS/ug	96	normal	k =1,97	290,816	% .ug/ABS	± 0,21848	413
u_{16B}	0,00148	ABS/ug	96	normal					
u_C	0,59	%(m/m)	68	Normal					

O valor da incerteza combinada da caracterização é de 0,59% para D-ribose. Este componente será utilizado na incerteza padrão combinada do MR.

Quadro 7.2 – Componentes para cálculo da incerteza associada a caracterização de fósforo.

Símbolo	Nome / Fonte de incerteza
u_{1A}	repetitividade (caracterização) = $s/\text{raiz}(n)$ s = desvio padrão amostral entre as 8 medidas n = 8
u_{2A}	Ajuste da Curva
u_{1B}	Incerteza da calibração do espectrofotômetro (Certificado)
u_{2B}	Dúvida na leitura da Espectrofotômetro ("resolução")
u_{3B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{4B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{5B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (assumido)
u_{6B}	Incerteza calibração do balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (Certificado)
u_{7B}	Erro não corrigido do balão volumétrico utilizado na dissolução da amostra (Certificado)
u_{8B}	Erro de paralaxe para avolumar o balão volumétrico utilizado na diluição da amostra (assumido)
u_{9B}	Incerteza calibração da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{10B}	Erro não corrigido da micropipeta utilizada na diluição da amostra (Certificado)
u_{11B}	Incerteza da calibração da Balança utilizada na pesagem da amostra (Certificado)
u_{12B}	Dúvida na leitura da Balança utilizada na pesagem da amostra ("resolução")
u_{13B}	Incerteza da micropipeta da alíquota digerida (Certificado)
u_{14B}	Erro não corrigido da micropipeta da alíquota digerida (Certificado)
u_{15B}	Incerteza do coeficiente linear da regressão linear (referente a solução padrão de fósforo)
u_{16B}	Incerteza do coeficiente angular da regressão linear (referente a solução padrão de fósforo)

Tabela 7.37- Cálculo de Estimativa de Incerteza dos Resultados de caracterização de fósforo.

Símbolo	Valor (±)		PA (%)	Distribuição de probabilidade		C_i Coeficiente de Sensibilidade		Incerteza Padrão PA = 68% (%)	V_{eff} Graus de Liberdade
					divisor				
u_{1A}	0,046	%(m/m)	68	normal	1	1		±0,04596	7
u_{2A}	0,020	%(m/m)	100	retangular	$\sqrt{3}$	1		±0,01166	infinito
u_{1B}	0,009	ABS	95	normal	k =2	18,868	% / ABS	±0,08491	infinito
u_{2B}	0,0005	ABS	100	retangular	$\sqrt{3}$	18,868	% / ABS	± 0,00545	infinito
u_{3B}	0,03	mL	95,45	normal	k=2,870	0,745	% / mL	± 0,00779	infinito
u_{4B}	0,01	mL	100	padrão (assumida)	1	0,745	% / mL	± 0,00745	infinito
u_{5B}	0,040	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,745	% / mL	± 0,01721	infinito
u_{6B}	0,01	mL	95,45	normal	k= 2,430	0,745	% / mL	± 0,00307	infinito
u_{7B}	0,03	mL	100	padrão (assumida)	1	0,745	% / mL	±0,02235	infinito
u_{8B}	0,030	mL	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,745	% / mL	±0,01290	infinito
u_{9B}	0,001	mL	95,45	normal	k =2,32	14,906	% / mL	± 0,00643	infinito
u_{10B}	0,002	mL	100	padrão (assumida)	1	14,906	% / mL	± 0,02981	infinito
u_{11B}	1000	ug	100	normal	k =2,87	0,0000745	% / ug	± 0,03	4
u_{12B}	20	ug	100	retangular	$\sqrt{3}$	0,0000745	% / ug	± 0,00	infinito
u_{13B}	0,0001	mL	100	retangular	k = 2,180	74,536	% / mL	± 0,00342	16
u_{14B}	0,0002	mL	100	padrão (assumida)	1	74,536	% / mL	± 0,01491	infinito
u_{15B}	0,0021	ABS	95	normal	k =2,00	18,868	% / ABS	± 0,01981	infinito
u_{16B}	0,00014	ABS/ug	96	normal	k=2,00	70,310	% .ug/ABS	± 0,00492	infinito
u_C	0,11	%(m/m)	68	Normal					

O valor da incerteza combinada associada a caracterização é de 0,11%. Este componente será utilizado na incerteza padrão combinada de fósforo.

7.12.2. Cálculo do componente de incerteza associada a Homogeneidade.

O item 5.4.3 descreve a forma de calcular o componente de incerteza de homogeneidade.

Para D-ribose, através da tabela da ANOVA obtida no estudo da homogeneidade temos os valores das médias quadráticas entre frascos e dentro dos frascos de 0,641 e 0,452.

Para calcular a incerteza associada a homogeneidade utiliza-se a expressão abaixo:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{(M_{\text{quadrática entre frascos}} - M_{\text{quadrática dentro dos frascos}})/n} = \\ \sqrt{0,641 - 0,452/3} = 0,25\%$$

Para o Fósforo, as médias quadráticas entre frascos e intrafrascos são respectivamente 0,0224 e 0,0311, portanto como a condição MQ entre frascos < MQ intra frascos, calcula-se:

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt[4]{(M_{\text{quadrática dentro dos frascos}}/n) \times 2/df_{\text{dentro dos frascos}}} = \\ \sqrt[4]{0,03114/3 \times 2/2} = 0,10\%$$

7.12.3. Componente de incerteza associada a estabilidade

Para determinação deste componente, utilizou-se o desvio padrão da sensibilidade denominado em $s(b_1)$ que é a incerteza associada à sensibilidade (Slope) e o tempo utilizado.

$$u_{\text{estabilidade}} = Sb_1(\text{desvio padrão calculado em análise de tendência}) \times \text{tempo}$$

7.12.3.1. Componente da Incerteza associada a estabilidade em tempo real (temperatura de armazenagem)

Para avaliação da melhor temperatura de armazenagem do material, calcularam-se as incertezas associadas as três temperaturas, utilizando o tempo em meses, conforme foi utilizado na regressão linear, onde fez-se a determinação do $s(b_1)$, tabelas 7.38 e 7.39.

Tabela 7.38 - Componentes de incerteza da estabilidade tempo real (temperaturas de armazenagem) para D-ribose:

D-ribose (%):
$u_{\text{armazenagem a } 4^{\circ}\text{C}} = 0,145 \times 6 = 0,87$
$u_{\text{armazenagem a } -20^{\circ}\text{C}} = 0,091 \times 6 = 0,55$
$u_{\text{armazenagem a } -70^{\circ}\text{C}} = 0,145 \times 6 = 0,87$

Tabela 7.39 - Componentes de incerteza da estabilidade tempo real (temperaturas de armazenagem) para fósforo:

Fósforo(%)
$u_{\text{armazenagem a } 4^{\circ}\text{C}} = 0,014 \times 6 = 0,08$
$u_{\text{armazenagem a } -20^{\circ}\text{C}} = 0,029 \times 6 = 0,17$
$u_{\text{armazenagem a } -70^{\circ}\text{C}} = 0,035 \times 6 = 0,21$

Avaliando os resultados acima obtidos no estudo de estabilidade durante 6 meses, a temperatura de armazenagem que contribui para uma incerteza menor em D-ribose é a de -20°C, entretanto para fósforo, a melhor temperatura de armazenagem é a 4°C. Como o material contém ambos os componentes, elegeu-se a temperatura de armazenagem de 4°C para ser incluída no certificado do MR.

7.12.3.2. Componente da Incerteza de estabilidade no estudo acelerado (temperatura de transporte):

Para o estudo acelerado, determinou-se a incerteza através do mesmo calculo, utilizando o tempo em semanas, conforme utilizado na regressão linear, tabela 7.40 e 7.41.

Tabela 7.40- Componentes de incerteza da estabilidade do estudo acelerado (temperaturas de transporte) para D-ribose:

D-ribose(%)
$u_{\text{transporte a } 25^{\circ}\text{C}} = 0,082 \times 8 = 0,66$
$u_{\text{transporte a } 37^{\circ}\text{C}} = 0,082 \times 8 = 0,66$

Tabela 7.41 - Componentes de incerteza da estabilidade do estudo acelerado (temperaturas de transporte) para D-ribose:

Fosforo(%)
$u_{\text{transporte a } 25^{\circ}\text{C}} = 0,015 \times 8 = 0,12$
$u_{\text{transporte a } 37^{\circ}\text{C}} = 0,017 \times 8 = 0,14$

Neste caso, utilizou-se o maior valor de incerteza apresentado para cada material, como uma medida de segurança para usuário.

7.13. Incerteza combinada expandida

Calculada todas as fontes de incerteza do material, utiliza-se a equação abaixo para o cálculo da incerteza padrão combinada para os ensaios de D-ribose e fósforo.

$$u_{\text{MRC}} = k [u_{\text{caracterização}}^2 + u_{\text{homogeneidade}}^2 + u_{\text{armazenagem}}^2 + u_{\text{transporte}}^2]^{1/2}$$

Valor da incerteza combinada expandida para D-ribose

$$u_{MRC} = 2 \sqrt{(0,59)^2 + (0,25)^2 + (0,87)^2 + (0,66)^2} = 2,53\%$$

Valor da incerteza combinada expandida para Fósforo

$$u_{MRC} = 2 \sqrt{(0,11)^2 + (0,10)^2 + (0,17)^2 + (0,14)^2} = 0,53\%$$

Para verificar a contribuição de cada componente, o gráfico 7.29 e 7.30 e tabela 7.42 e 7.43 estão apresentados em percentuais de contribuição de cada componente para D-ribose e fósforo.

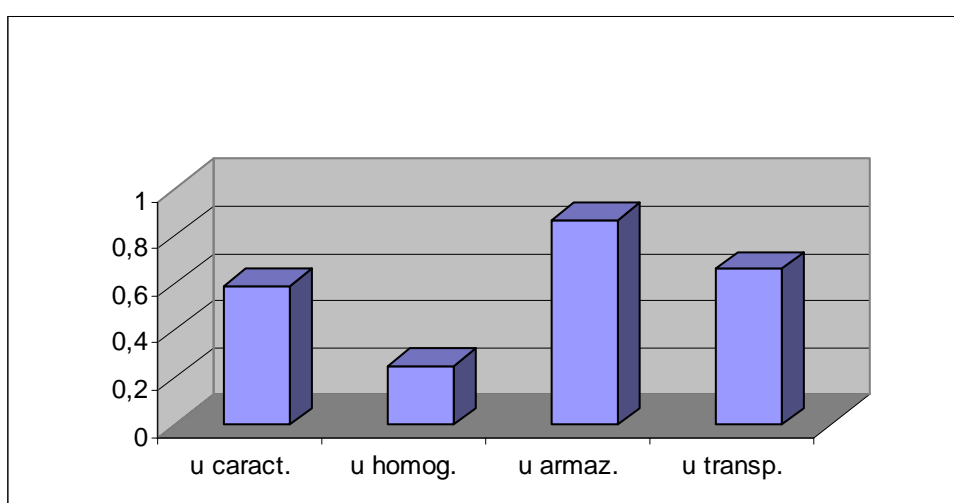


Gráfico 7.29- Contribuição dos componentes de incerteza do MRC para o resultado de D-ribose.

Tabela 7.42 – percentual de contribuição de cada componente na incerteza combinada padrão de D-ribose.

Componentes da incerteza combinada padrão	% de contribuição
u caracterização	25
u homogeneidade	11
u armazenagem	37
u transporte	28

Avaliação: Verificamos que as maiores fontes de incerteza para D-ribose são os componentes de estabilidade (transporte e armazenagem). Estes componentes de incerteza dominantes são do tipo B, indicando o valor do fator de abrangência equivalente a 2, conforme utilizado na equação de incerteza combinada padrão.

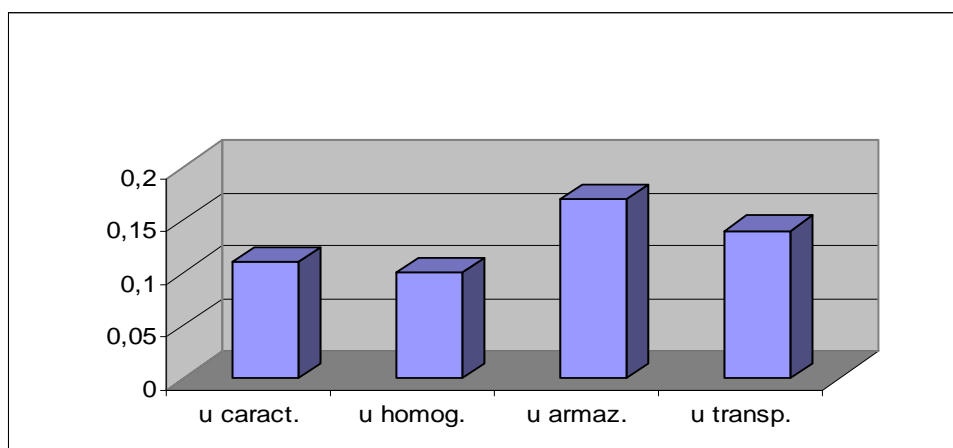


Gráfico 7.30 - Contribuição dos componentes de incerteza do MRC para o resultado de fósforo.

Tabela 7.43 – percentual de contribuição de cada componente na incerteza combinada padrão de fósforo.

Componentes da incerteza combinada padrão	% de contribuição
u caracterização	21
u homogeneidade	19
u armazenagem	33
u transporte	27

Verifica-se que a maior fonte de incerteza para fósforo também é a armazenagem e transporte. Portanto, conforme realizado em D-ribose, o valor do fator de abrangência equivalente a 2, conforme utilizado na equação de incerteza combinada padrão.

7.14. Certificação do material de referência

Todas as etapas de elaboração para certificação do material de referência proposto neste trabalho foram feitas, estabelecendo-se um modelo para documentação, considerando-se o fornecimento do material de referência *in house* para laboratórios externos (anexo 3).

8. Conclusão

Considerando-se as etapas relacionadas à obtenção do material de referência, pode-se verificar que:

- ❖ Na revalidação do método para determinação do conteúdo de fósforo foram avaliados os parâmetros da repetitividade, precisão intermediária, especificidade, linearidade e faixa de trabalho.
 - O resultado obtido para a repetitividade está dentro do coeficiente de variação aceitável pela Resolução 899 da Anvisa ($\leq 5\%$).
 - Para avaliação da precisão intermediária, realizou-se a verificação da homogeneidade das variâncias, através da análise de variância e os critérios de $F_{\text{calculado}} (2,858) < F_{\text{crítico}}(3,403)$ e *Valor-P* $(0,077) > 0,05$ foram atendidos.
 - A linearidade e faixa de trabalho foram avaliados através da curva de calibração de fósforo. Para a identificação de valores aberrantes foi aplicado o teste de Grubbs e para avaliação da homocedasticidade, o teste de Cochran. Todos os parâmetros verificados atendem ao critério de aceitação estabelecido, onde o coeficiente angular (a) é igual a 0,1097, o coeficiente linear (b) igual a 0,0011 e o coeficiente de correlação (r) igual a 1,000.
 - Os resíduos estão distribuídos de forma homogênea e com valores dentro do intervalo estimado para normalidade a 95% $[-2,+2]$, o que demonstra homogeneidade das variâncias nos pontos de calibração. Isto significa que as medições realizadas são suficientes para que se tenha confiabilidade nos resultados.
 - A incerteza expandida associada ao método encontrado foi de 0,22%. As fontes que mais contribuem para esta incerteza são: a da precisão intermediária, da calibração do espectrofotômetro e da micropipeta.

- O resultado de conteúdo de fósforo encontrado no trabalho (5,033 mg/mL de PRRP) foi comparado com o valor declarado no artigo do estudo colaborativo para a elaboração do padrão internacional de PRRP (5,077 mg/mL de PRRP). O resultado foi considerado satisfatório através do índice z-score.
- ❖ A comprovação da adequação do método para o conteúdo de D-ribose, ao seu propósito, foi confirmada através da comparação do valor obtido (4,875 mg/mL) com o valor declarado no certificado do padrão internacional (4,933±0,267 mg/mL). Através do teste de hipótese e índice de z-score foi comprovado que o resultado encontrado no trabalho não difere estatisticamente do valor declarado e é considerado satisfatório na escala de z-score.
- ❖ O planejamento para a produção do material de referência de PRRP foi definido neste trabalho e realizado atendendo a todos os quesitos necessários para elaboração de um material de referência *in house* em acordo com o ISO GUIDE 35.
- ❖ A caracterização nominal do material de referência *in house* para os conteúdos de D-ribose pelo método de Bial e de fósforo pelo método de Chen apresentaram os resultados médios de 41,19 % e 7,83 % respectivamente.
- ❖ A caracterização estrutural foi realizada por Ressonância magnética nuclear, comparando-se o perfil e os deslocamentos químicos para o padrão internacional em relação ao PRRP utilizado na preparação do material de referência.
 - As possíveis atribuições dos deslocamentos químicos de hidrogênio sugerem que o PRRP, utilizado na preparação do material de referência *in house*, é estruturalmente equivalente ao padrão internacional garantindo a identidade do material candidato.
- ❖ A homogeneidade entre frascos e intra frascos foi avaliada aplicando-se a análise de variância, obtendo-se os seguintes resultados:
 - Para D-ribose, o $F_{\text{calculado}}$ (1,42) é menor que o F_{critico} (2,09) e o valor-P (0,21) está acima de 0,05, indicando que não há diferença significativa entre os resultados confirmando a homogeneidade dos resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância.
 - Para fósforo, o $F_{\text{calculado}}$ (0,72) é menor que o F_{critico} (2,09) e o valor-P (0,73) está acima de 0,05, indicando que não há diferença significativa entre os

resultados confirmando a homogeneidade dos resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância.

- ❖ No estudo de estabilidade real e acelerado, verificou-se que o material manteve-se estável no tempo estabelecido, em todas as temperaturas. A avaliação do estudo foi realizada através da análise de tendência, recomendada pela ISO GUIDE 35.
- ❖ A incerteza combinada considerou todas as fontes de incerteza requeridas para a definição dos resultados de MR: caracterização nominal, homogeneidade e estabilidade.
 - Para D-ribose, a incerteza padrão associada à caracterização contribui com 25% , a associada à homogeneidade tem uma contribuição de 11% (sendo a de menor impacto), a associada ao transporte contribui com 28% e a de maior contribuição é aquela associada à armazenagem (estabilidade), de 37%.
 - Para fósforo, a incerteza padrão associada à caracterização contribui com 21%, a associada à homogeneidade tem uma contribuição de 19% (sendo também a de menor impacto), a associada ao transporte contribui com 27% e a de maior contribuição é aquela associada à armazenagem (estabilidade), de 33%.
- ❖ Com base nos estudos desenvolvidos e nos resultados obtidos neste trabalho (atendendo aos requisitos constantes nos ISO Guias 30-35), foi elaborado o Certificado do Material de Referência do PRRP que poderá ser utilizado pelos laboratórios de controle de qualidade.
 - Os valores estabelecidos para o material de referência *in house*, no certificado do material de referência são $41,19 \pm 2,53$ % para D-ribose e $7,83 \pm 0,53$ % para Fósforo.

Conclui-se que o material de referência *in house* produzido atende aos propósitos pré-estabelecidos em conformidade com as normas vigentes. Devido a sua abrangência, este material atenderá ao controle de qualidade do PRRP, PSTT e vacina Hib e poderá ser utilizado no controle físico-químico de Biomanguinhos e por outros laboratórios.

O estudo de estabilidade, conforme citado anteriormente, deverá ser estendido por 5 anos.

8.1. Considerações finais

A obtenção do material de referência *in house* de PRRP para os produtos relacionados ao controle de qualidade, é complemento das atividades relacionadas à melhoria e a confiabilidade das medições realizadas para controle de qualidade de produtos biológicos com características específicas como os produzidos em Biomanguinhos. As etapas relacionadas à elaboração técnica do MR *in house* estão definidas neste trabalho. Cada vez mais órgãos reguladores como ANVISA estão exigindo a utilização de materiais de referência no controle de qualidade.

Para um melhor aproveitamento deste projeto, novas etapas devem ser cumpridas por Biomanguinhos, tais como:

- ❖ Documentar o procedimento de obtenção de material de referência de forma a padronizar a metodologia aqui exposta regularizando os procedimentos de elaboração de material de referência;
- ❖ Produzir outros materiais de referência necessários, não somente ao DEQUA como também para as diversas atividades desenvolvidas que utilizem algum método de controle em Biomanguinhos/FIOCRUZ.
- ❖ Buscar novos parceiros para realização de interlaboratoriais utilizando procedimentos normalizados, principalmente com INCQS;
- ❖ Estreitar a parceria com os Institutos Cubanos, experientes em produção de MR biológicos e ensaios de proficiência a fim realizar estudos comparativos;
- ❖ Buscar parcerias com outras áreas da FIOCRUZ na utilização de técnicas complementares com o objetivo de aumentar a confiabilidade do MR, como foi realizado com Farmanguinhos para este projeto;
- ❖ Integrar as unidades de produção e controle da FIOCRUZ (Biomanguinhos, Farmanguinhos e INCQS) para elaboração de novos MR.
- ❖ Buscar orientação do Inmetro visando uma futura acreditação de Biomanguinhos como produtor de material de referência.

9. Referências bibliográficas

ABNT ISO GUIA 30, **Termos e Definições Relacionados com Materiais de Referência**. 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 31, **Conteúdo de Certificados de Materiais de Referência**. 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 32, **Calibração em química analítica e uso de materiais de referência**. 1ª edição. 2000.

ABNT ISO GUIA 33, **Utilização de materiais de referência certificados**. 1ª edição. 2002.
ABNT INMETRO. **Guia para a Expressão da incerteza de medição**. 3ª edição brasileira. agosto 2003.

ABNT NBR ISO/IEC 9000. **Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário**. 2000.

ANVISA. **Medicamentos - Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Re n°; 29 julho 2005.

ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE n° 899; 29 maio 2003.

Ashwell G. **Colorimetric analysis of sugars**. *Methods Enzymol* 1957; p. 73–105

Assessoria de Comunicação de Biomanguinhos, **BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ nacionaliza a vacina conjugada Hib e passa a produzir mais um imunobiológico 100% brasileiro**. [Consultado em 10/10/2008]. Disponível: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=227> .

Bouskela MA, Grisi S, Escobar AM. **Aspectos epidemiológicos da infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b**. Rev Panam Salud Publica; 2000.7:332–9.

Chen PS et al. **Microdetermination of phosphorus**. Analytical chemistry; 1956;28:1756 - 1758.

Ermer J, Miller JH. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice**. Ed. WILEY-VCH.2005; p.31.

European Pharmacopoeia. 5th edition. January 2005; vol 1; p.662.

EURACHEM/CITAC Guide. **Traceability in Chemical Measurement**. 2003.

Grubbs F. **Procedures for detecting outlying observations in samples**. Ballistic Research Laboratories. Maryland. April 1974.

Guia EURACHEM/CITAC. **Determinando a incerteza na medição analítica**. 2ª edição. QUAM:2002.

Guia EURACHEM/RELACRE 1. **Exemplos de cálculo de incerteza**. GT01; Edição 1. Setembro 2002.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products**. Q5C. 4 version. 30 Nov. 1995.

ILAC. **Guideline for the in-house Production of reference Materials**. LGC/VAM; 1998.

INMETRO. **Expressão da incerteza de medição na calibração**.EA-4/02. 1ª Ed. Brasileira. Revisão 00. Abril/julho 2006.

INMETRO. **Orientações para seleção e uso de materiais de referência**. DOQ-CGCRE-016; 2005.

INMETRO. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Junho 2007.

INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 2ª edição. Brasília; 2000.

ISO 8402. **Quality management and quality assurance – Vocabulary**. 1^a edition.1994.

ISO 5725-6. **Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results**. Part 6:Use in practice of accuracy values; 1994.

ISO GUIA 34, **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**, 1^a edição. 2004.

ISO GUIDE 35, **Certification of reference materials – General and Statistical Principles**, Revision of 2^a edition; 2003.

Jones C, Lemercinier X, Crane DT, Gee CK, Austin S. **Spectroscopic Studies of the structure and stability of glycoconjugate vaccines**. Dev Biol 2000;103:121-36.

Kabat EA, Mayer MM. **Experimental immunology**. Springfield,IL, 1961:530.

King B. **The selection and use of reference materials – A basic guide for laboratories and accreditation bodies**. Accred. Qual. Assur. 2003; 8:429-433.

Kmetzsch C I et all. **Occurrence of *Haemophilus influenzae B* meningitis after the implementation of a mass vaccination program**. Jornal de Pediatria 2003; Vol. 79-6:530-536.

Leite F. **Validação em análise química**. 3^a Edição. Editora Átomo; 1998.

Lemercinier X, Jones C. **An NMR spectroscopic identity test for the control of the capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* type b**, Biologicals 2000; 28:175-183.

Mawas F et al. **Evaluation of the saccharide content and stability of de first WHO International Standard for *Haemophilus influenzae b* capsular polysaccharide**. J.biologicals 2007; 35:235-245

Mawas F, Bolgiano B, Belgrave D, Crane D, Rigsby P, Corbel MJ. **International collaborative study to evaluate a candidate international standard for *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide**. Final Report No.: WHO/BS/05.2018; World Health Organization, Expert Committee on Biological Standardization; Geneva: 24-28 Oct 2005.

Miranzi SSC, Moraes SA, Freitas ICM. **Impact of the *Haemophilus influenzae* type b vaccination program on HIB meningitis in Brazil.** *Saúde Pública* 2007; 23(7):1689-1695.

Montgomery DC, Runger GC. **Applied Statistics and Probability for Engineers.** 3ª Edição. Editora Wiley; 2002. p. 441-442

Morris SK, Moss WJ, Halsey N. Review :***Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness.** [on line] 8 July 2008 [consultado em 05 de outubro de 2008]. Disponível: <http://infection.thelancet.com>

Pharmaceutical inspection convention/PIC/S. **Guide to good manufacturing practice for medicinal products.** PE 009-8 (Part I).15 January 2009.

Ribeiro GS, et al. ***Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil.** *Vaccine* 2007;25:4420–8.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. **Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais.** 3ª edição. Brasília. 2006.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Programa nacional de imunizações - 30 anos.** Brasília, DF. 2003.

Thompson M, Ellison S, Wood R. **The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories.** IUPAC technical report. *Pure Appl. Chem* 2006; 78: 145-196,

Verez-Bencomo V, et al. **A Synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* Type b.** *Science* 2004; 305: 522-525.

Vieira S. **Estatística para a qualidade: como avaliar com precisão a qualidade em produtos e serviços.** 8ª reimpressão. Elsevier;1999.

Wieruszkeski J, Talaga P, Lippens G. **Development of a high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance identity assay of the capsular polysaccharide from**

***Haemophilus influenzae* type b present in cetavlon precipitate.** Analytical Biochemistry 2005; 338:20–5.

World Health Organization. ***Haemophilus influenzae* .Core information for the development of immunization policy.** WHO/V&B/02.28. 2002

World Health Organization. ***Haemophilus influenzae* type b Hib meningitis in the pré-vaccine era: a global review of incidence, age distributions, and case fatality rates.** WHO/V& B/02.18; 2002.

World Health Organization. **Global program for vaccines and immunization (GPV).** Wkly Epidemiol Rec 998. 73:64-7.

World Health Organization. **Recommendations for the production and control of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines.** WHO Technical Report Series; No. 897; 2000.

World Health Organization. **Recomendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards-** 55th meeting of WHO Expert committee on Biological Standardization,15-18 november 2004.

10 -ANEXOS