



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia

INCERTEZA DE MEDIÇÃO E RISCO DE DECISÕES FALSAS

FBF5833 – Qualidade por Design Analítica
(AQbD) Aplicado às Análises Farmacêuticas

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

INTRODUÇÃO



Resultados analíticos...

- Importância em diversas áreas
- Preocupação com sua qualidade
- Apesar dos esforços

...Incerteza de medição!

CONCEITOS E DEFINIÇÕES



Princípios do GUM...

- Incerteza padrão (u)
- Fator de abrangência (k)
- Incerteza expandida ($U = k \times u$)

...intervalo com 95% de confiança!

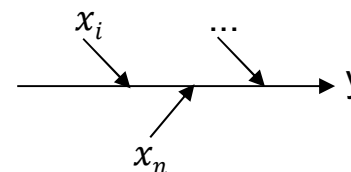
ETAPAS PARA OBTER “MU”



Especificar
mensurando

$$y = f(x_i \dots x_n)$$

Identificar das fontes de
incerteza



Quantificar e padronizar das
incertezas

$$u_{x_i} \dots u_{x_n}$$

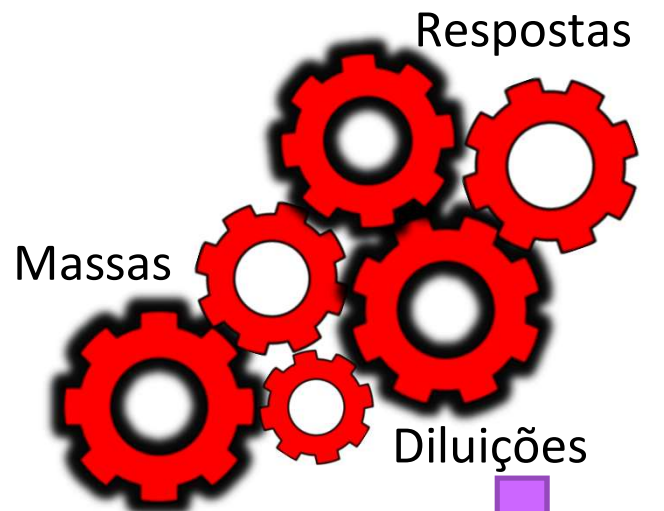
Calcular incertezas combinadas
e expandida

$$U_y = k \times u_y$$

MÉTODOS PARA OBTER “MU”



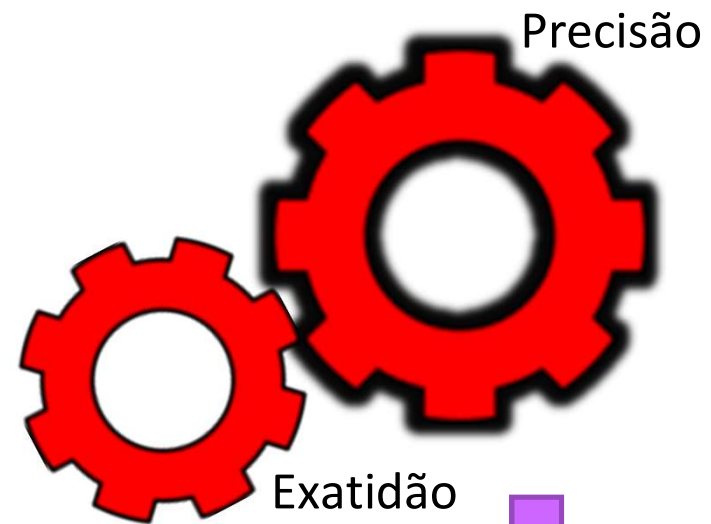
Abordagem *botton-up*...



$$U = k \times u$$

Ellison & William, 2012.

Abordagem *top-down*...



$$U = k \times u$$

LEI DA PROPAGAÇÃO DAS INCERTEZAS



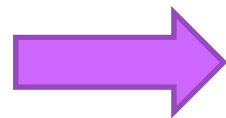
$$y = f(x_1, x_2)$$



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

A purple arrow points from the r_{12} term in the denominator of the square root to a '0' at the end of the line.

Se $r_{12} = 0$



$$u_y = \sqrt{u_{x_1}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + u_{x_2}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2}$$

LEI DA PROPAGAÇÃO DAS INCERTEZAS



Regra da soma / subtração

$$y = x_1 + x_2 - x_3$$



$$u_y = \sqrt{u_{x_1}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + u_{x_2}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 + u_{x_3}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_3}\right)^2}$$

+1 +1 -1

$$u_y = \sqrt{u_{x_1}^2 + u_{x_2}^2 + u_{x_3}^2}$$

LEI DA PROPAGAÇÃO DAS INCERTEZAS



Regra da multiplicação / divisão

$$y = \frac{x_1 \times x_2}{x_3}$$

$$u_y = \sqrt{u_{x_1}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \right)^2 + u_{x_2}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \right)^2 + u_{x_3}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_3} \right)^2}$$

y $\frac{x_2}{x_3}$ $\frac{x_1}{x_3}$ $-\frac{x_1 \times x_2}{x_3^2}$ y

$$u_y = y \sqrt{\left(\frac{u_{x_1}}{x_1} \right)^2 + \left(\frac{u_{x_2}}{x_2} \right)^2 + \left(\frac{u_{x_3}}{x_3} \right)^2}$$

MÉTODO DA PLANILHA DE KRAGTEN



$$y = f(x_1, x_2, x_3)$$

	u_{x_1}	u_{x_2}	u_{x_3}
x_1	$x_1 + u_{x_1}$	x_1	x_1
x_2	x_2	$x_2 + u_{x_2}$	x_2
x_3	x_3	x_3	$x_3 + u_{x_3}$

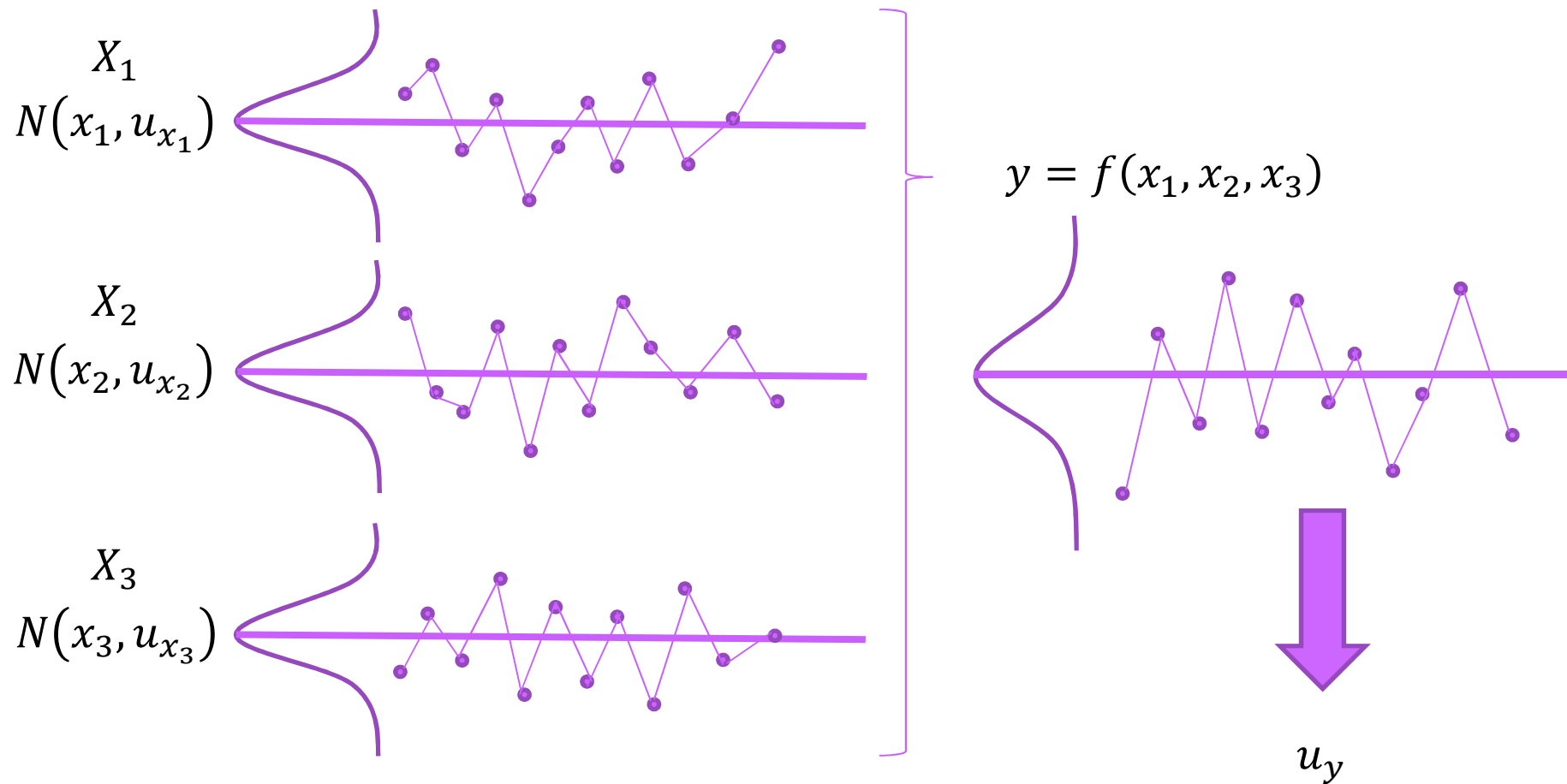
y	y_{x_1}	y_{x_2}	y_{x_3}
-----	-----------	-----------	-----------

$$u_y = \sqrt{\sum (y - y_{x_i})^2}$$

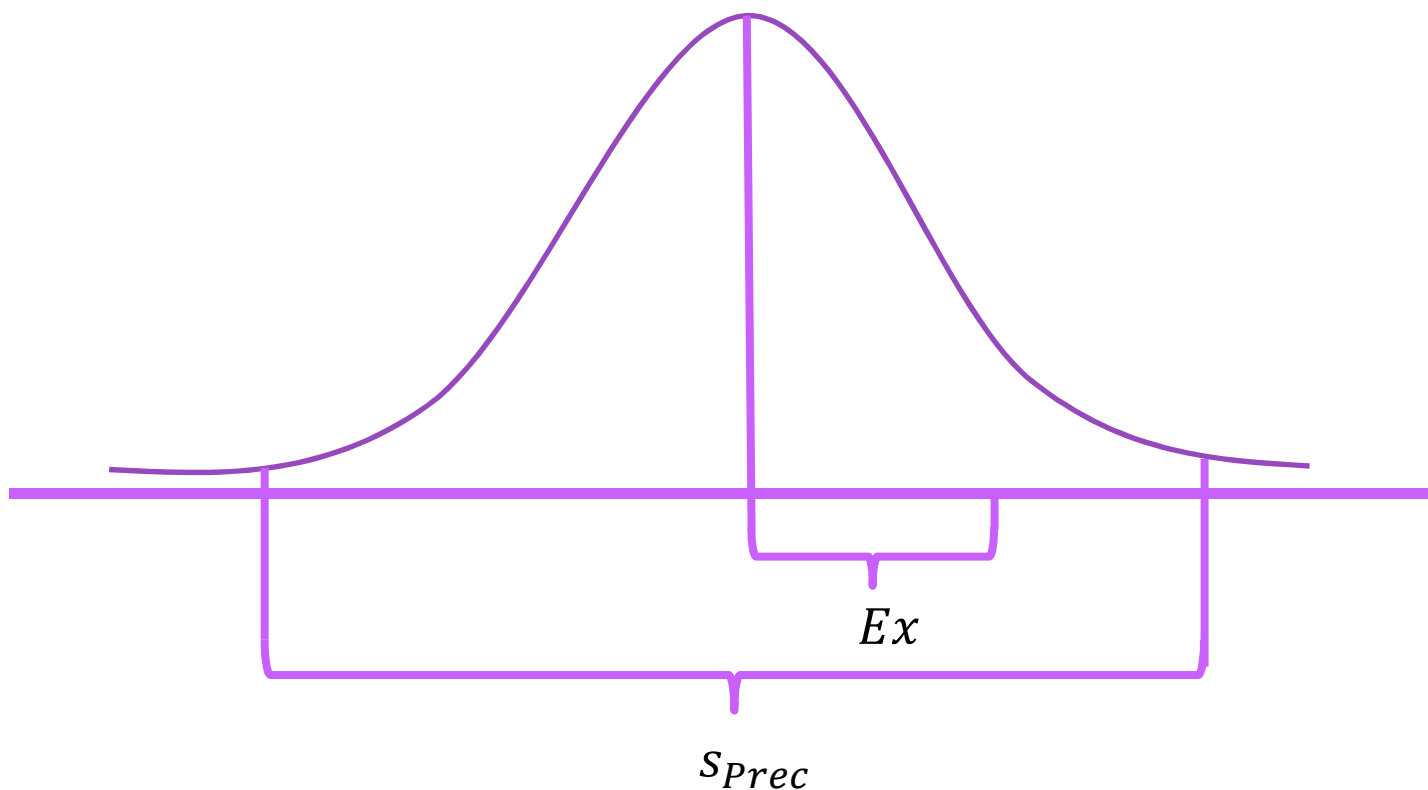
$(y - y_{x_1})^2$	$(y - y_{x_2})^2$	$(y - y_{x_3})^2$
-------------------	-------------------	-------------------

$$u_y = \sqrt{u_{x_1}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 + u_{x_2}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 + u_{x_3}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_3}\right)^2}$$

SIMULAÇÕES DE MONTE CARLO

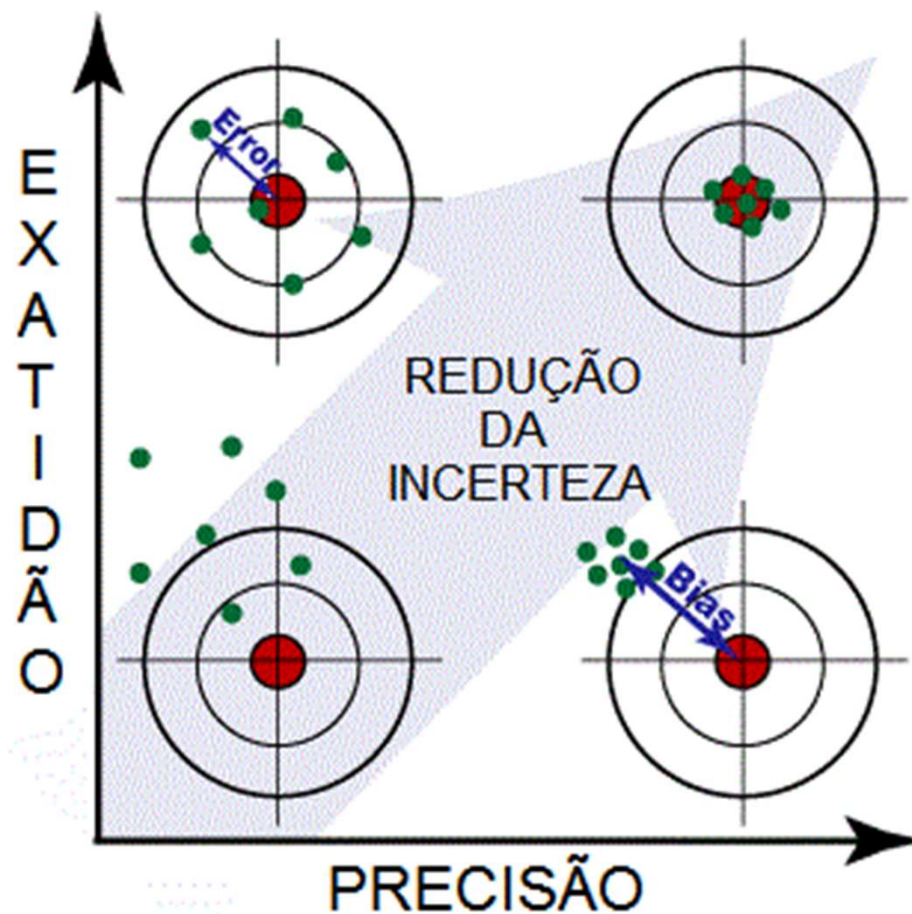


VALIDAÇÃO DE MÉTODOS



$$u = \sqrt{(1 - Ex)^2 + S_{Prec}^2}$$

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS



INCERTEZA DE MEDIÇÃO: ANÁLISES DE MEDICAMENTOS



Ensaio biológicos e microbiológicos...

- Doseamento microbiológico
- Ensaio de LAL para endotoxinas bacterianas

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



Vancomicina (5 x 1)

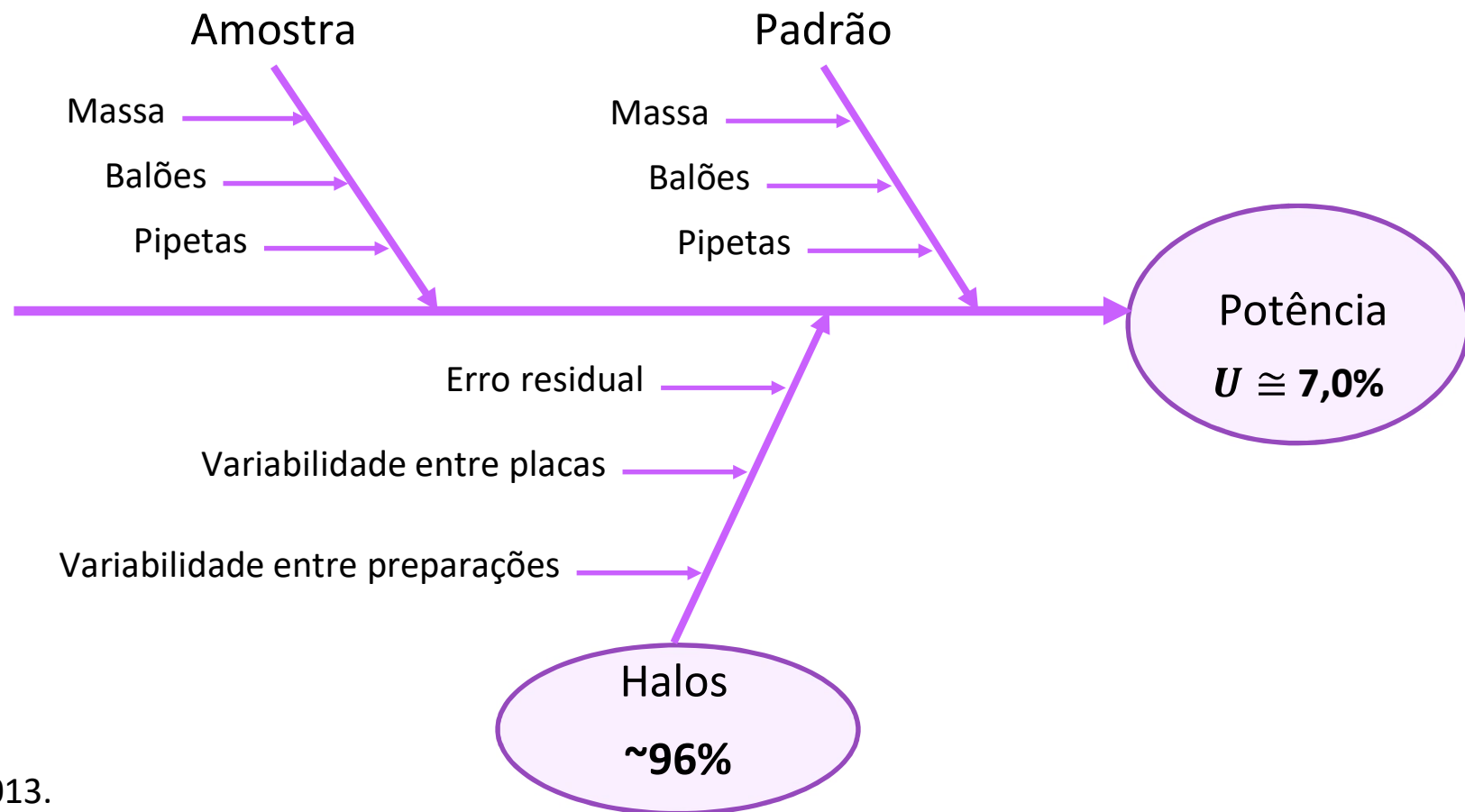
- Exatidão (u_R) contribuiu com 20%
- Precisão (u_{PI}) contribuiu com 80%

...da incerteza final ($U = 4,3\%$)

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



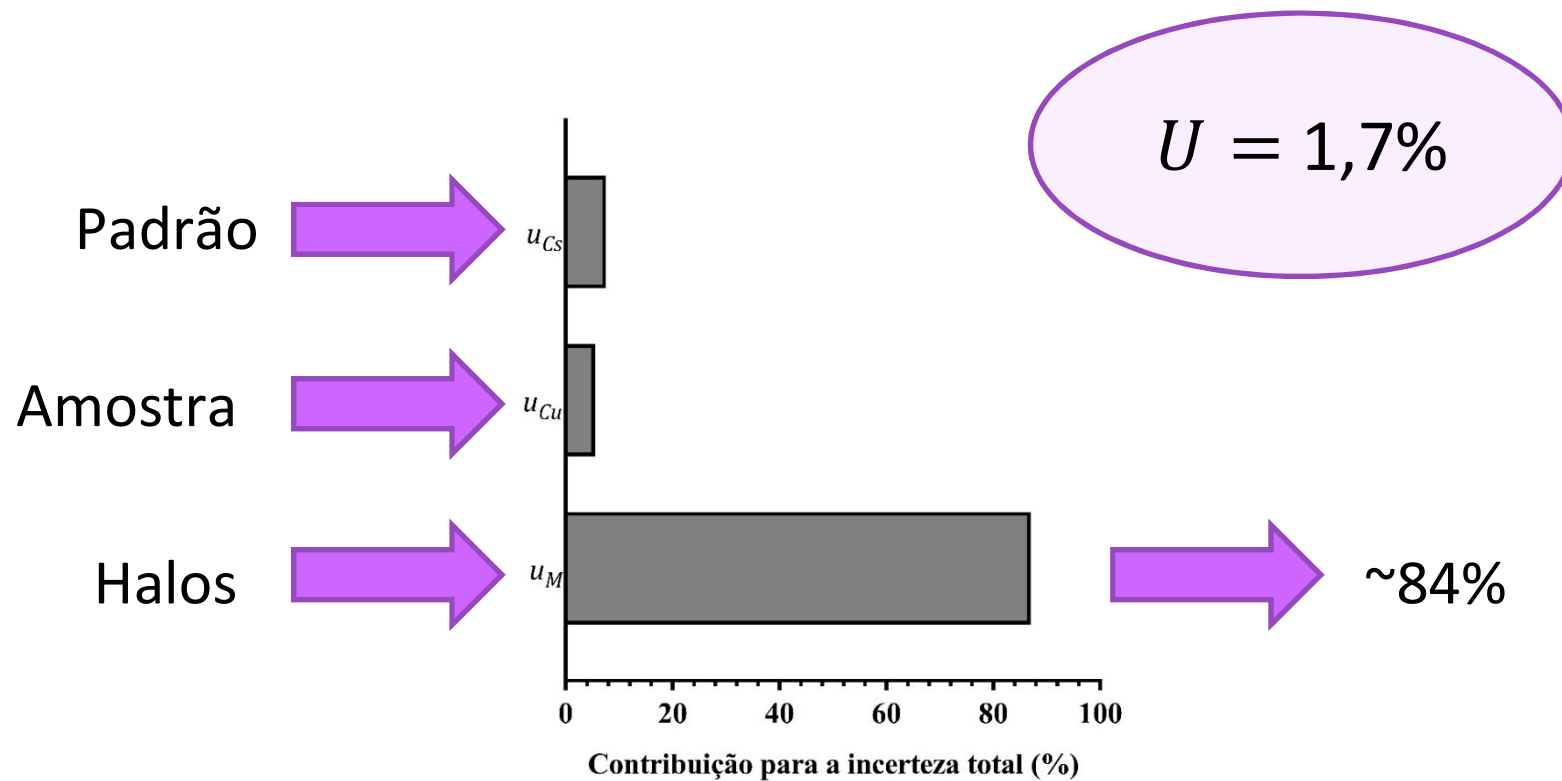
Apramicina (3 x 1)



DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



Caspofungina (3 x 3)

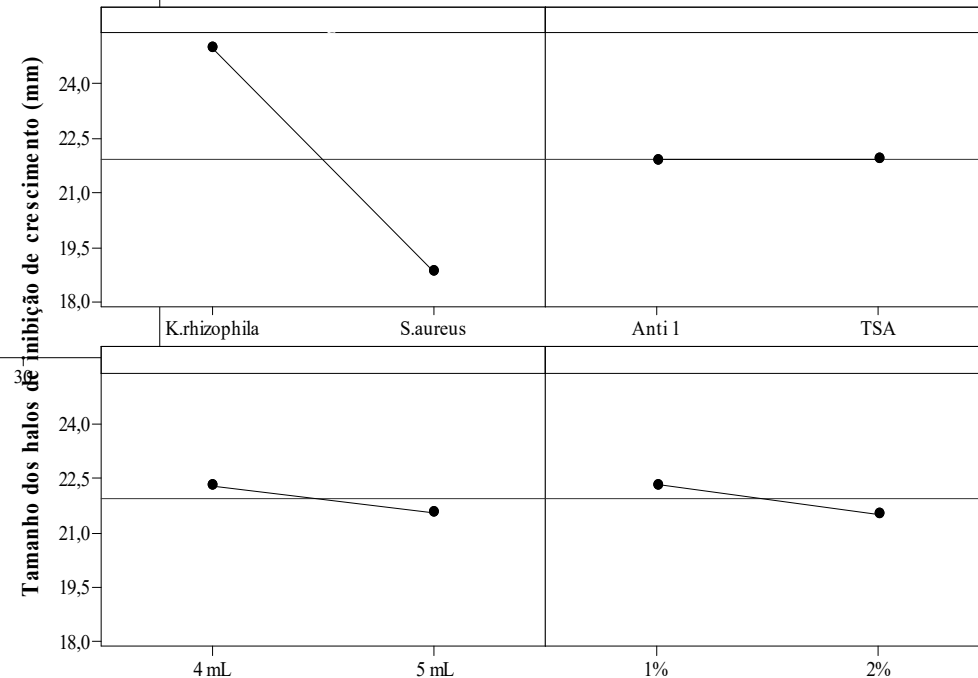
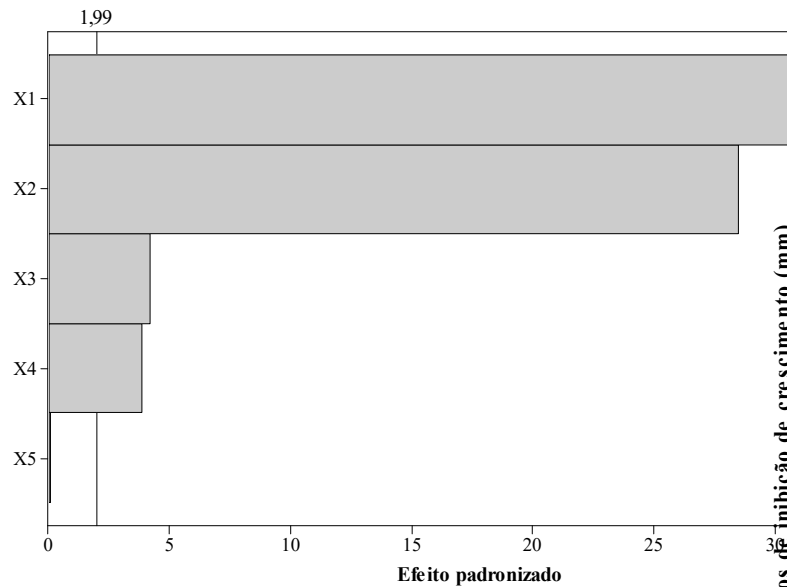


DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO

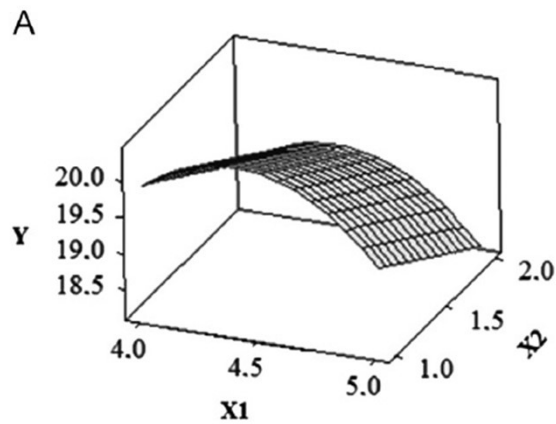


Linezolida (3 x 3)

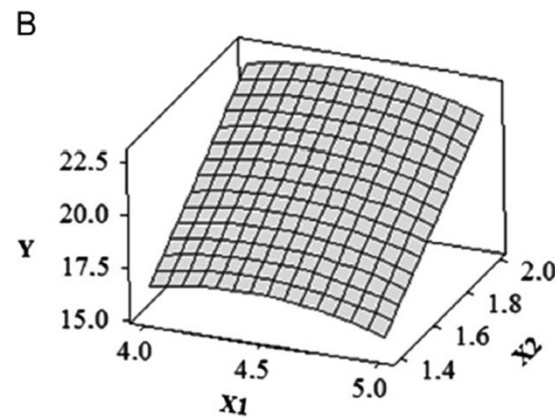
- X1: tipo de microrganismo
- X2: concentração de linezolida
- X3: proporção de inóculo
- X4: volume de meio de cultura
- X5: tipo do meio de cultura



DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO

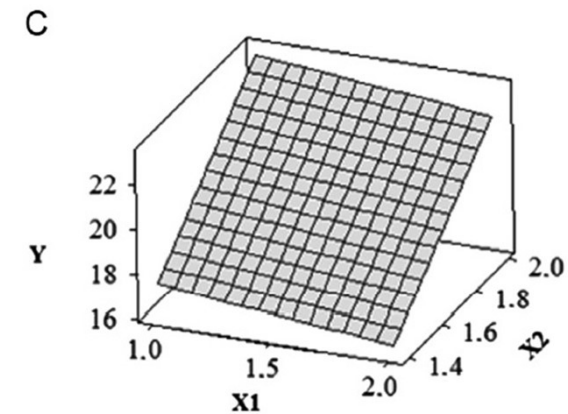


Y: tamanho dos halos
X1: volume de meio de cultura
X2: proporção de inóculo



Y: tamanho dos halos
X1: volume de meio de cultura
X2: concentração de linezolida

$$U = 3,1\%$$



Y: tamanho dos halos
X1: proporção de inóculo
X2: concentração de linezolida

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



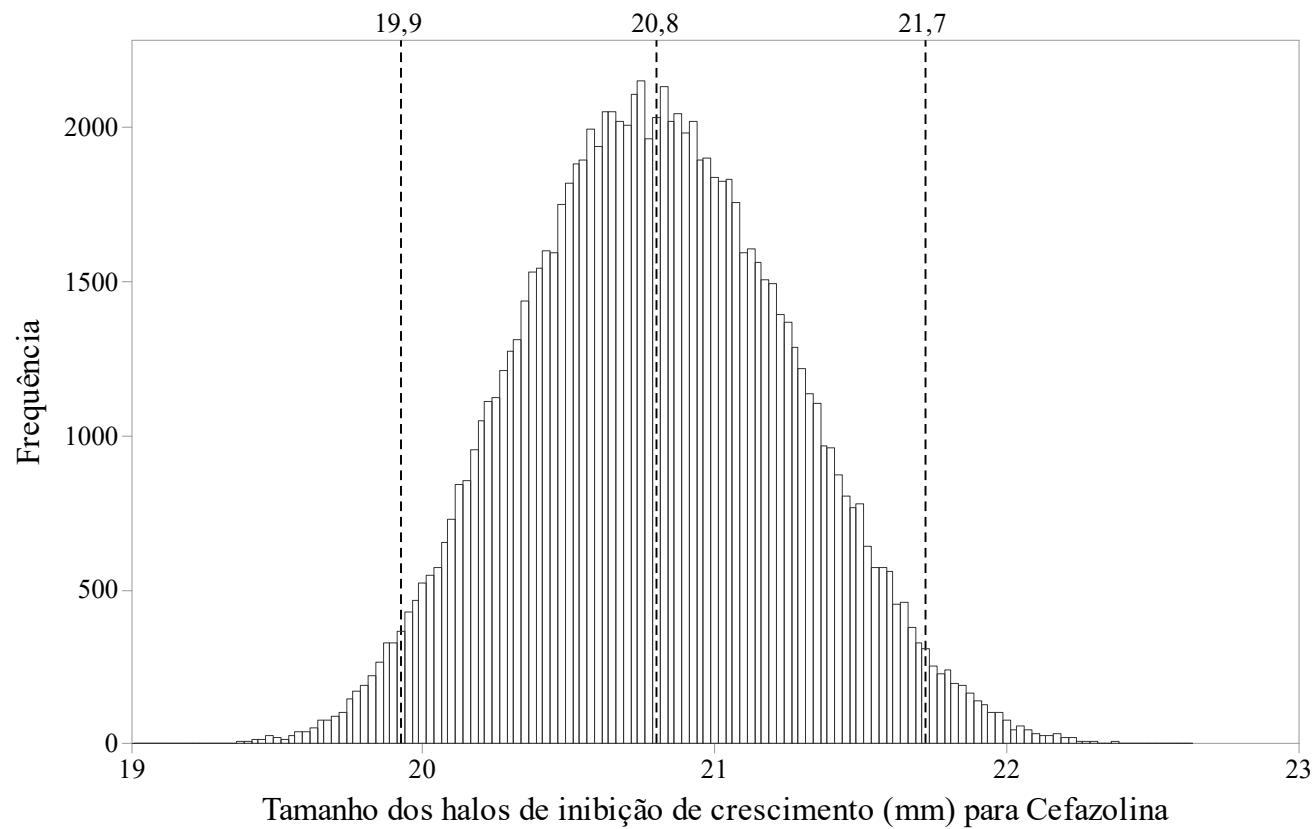
Cefalosporinas

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

Y: tamanho dos halos / X1: amino ácidos / X2: extrato de carne / X3: agar / X4: concentração de antibiótico / X5: proporção de inóculo / X6: pré-incubação.

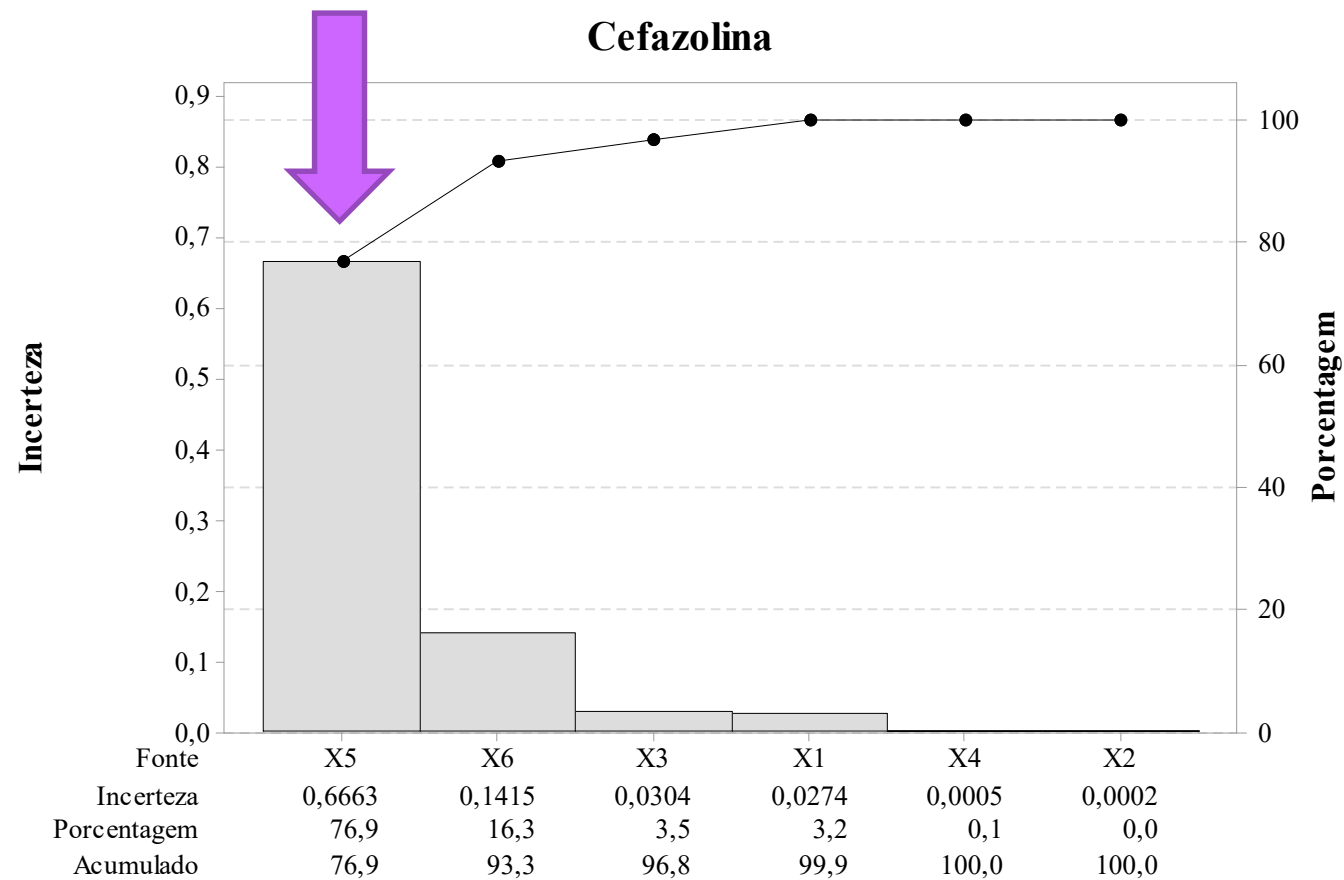
Saviano, & Lourenço (Measurement), 2018.

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



Saviano, & Lourenço (Measurement), 2018.

DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



DOSEAMENTO MICROBIOLÓGICO



Método microbiológico rápido...



...incerteza de medição é afetada?

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS



Ensaio LAL *gel-clot*...

- Passa / não-passa
- Confirmação da sensibilidade do LAL
- Inibição / exacerbação da formação do gel

...Probabilidade de resultado falso

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS



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

$$P_{F+} = \frac{B}{A + B}$$

$$P_{F-} = \frac{C}{C + D}$$

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS




Probabilidade de resultado falso...

$$U = (P_{F+/\lambda}^2 + P_{F-/\lambda}^2 + P_{F+/\nu}^2 + P_{F-/\nu}^2) \times 100$$


Controle
positivo



Controle
negativo



Amostra +
Endotoxina



Amostra
(Teste)



$$U = (0,11^2 + 0,00^2 + 0,00^2 + 0,08^2) \times 100$$

$$\dots U = 1,8\%$$

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS



Fatores que afetam o teste...

- Alterações de pH



$U = 2,0\%$

- Temperatura



$U = 1,0\%$

- Tempo de incubação

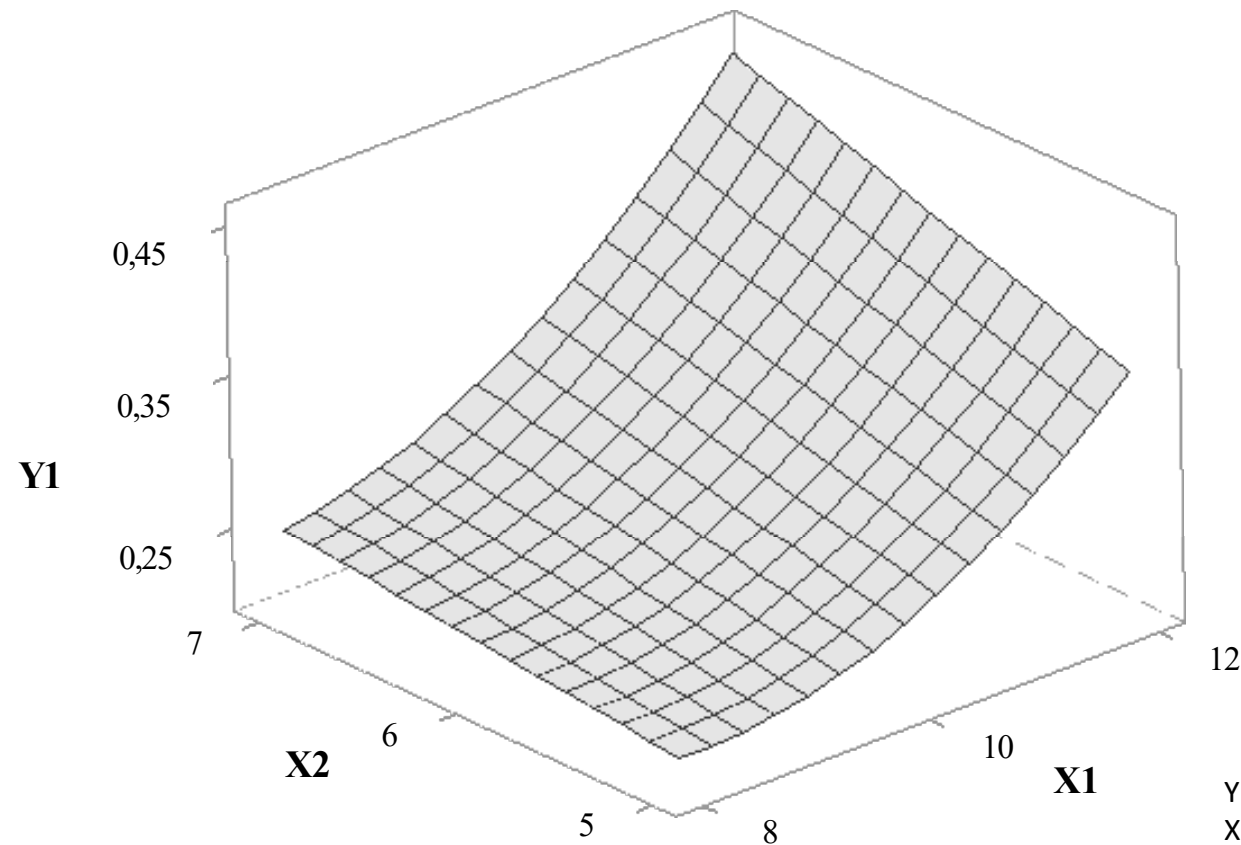


$U = 1,0\%$

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS



Cromogênico ponto final



Monte Carlo



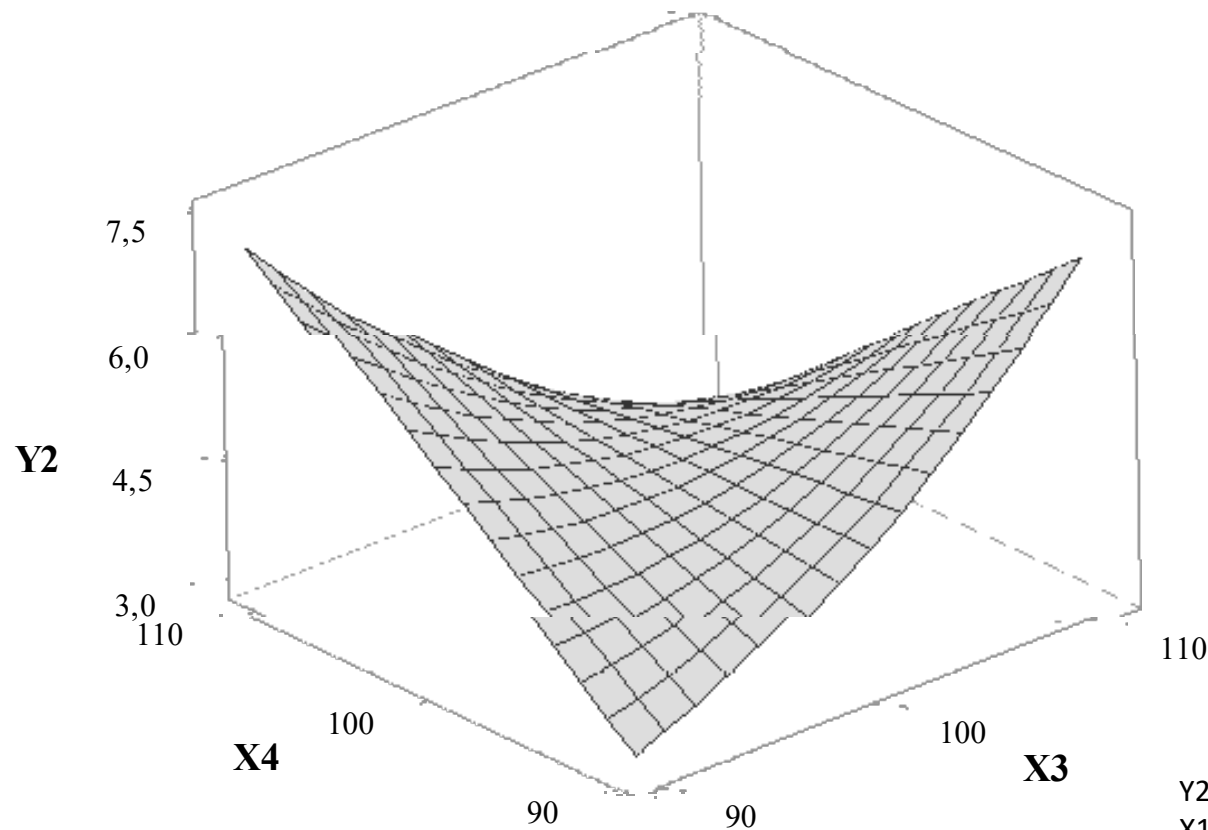
**IC95:
90 a 120%**

Y1: pNA
X1: tempo após adição do LAL
X2: tempo após adição do substrato

ENSAIO DE LAL PARA ENDOTOXINAS



Cromogênico cinético



Monte Carlo



**IC95:
90 a 127%**

Y2: tempo para liberação de pNA
X1: volume de amostra/padrão
X2: volume de reagente LAL

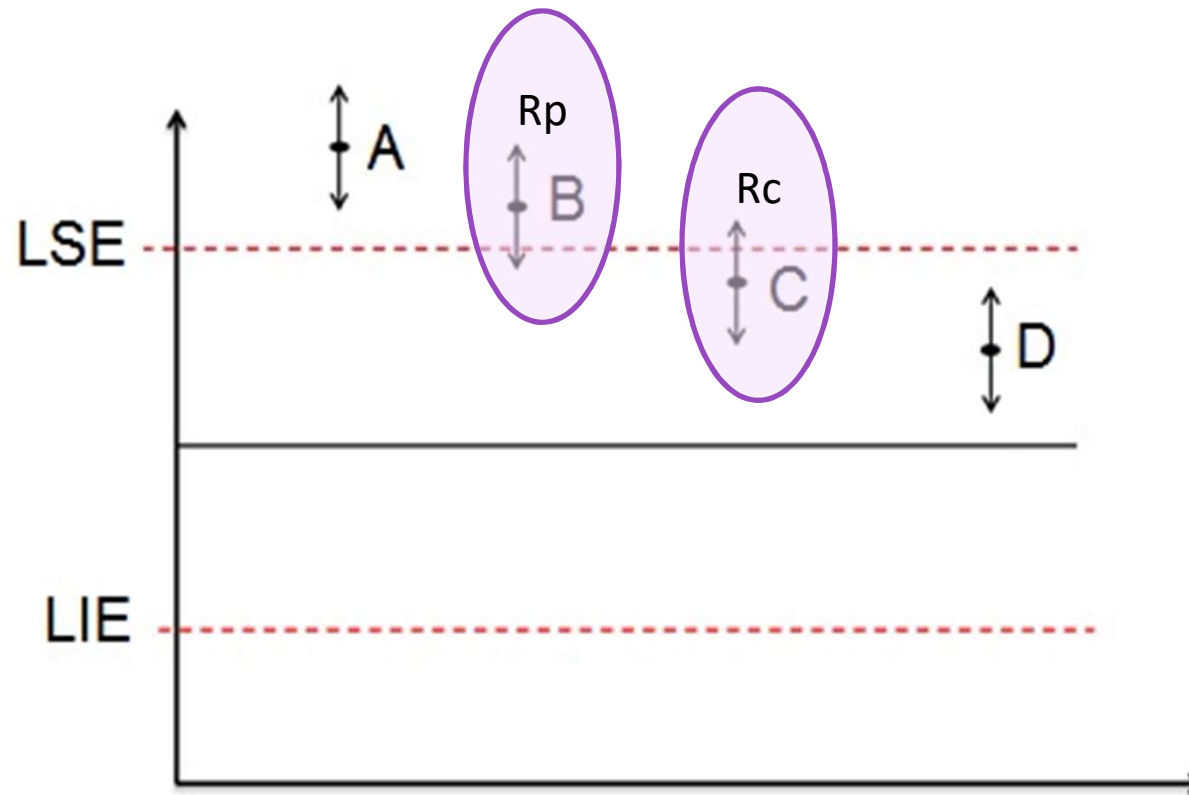
APLICAÇÃO DA INCERTEZA: CONFORMIDADE



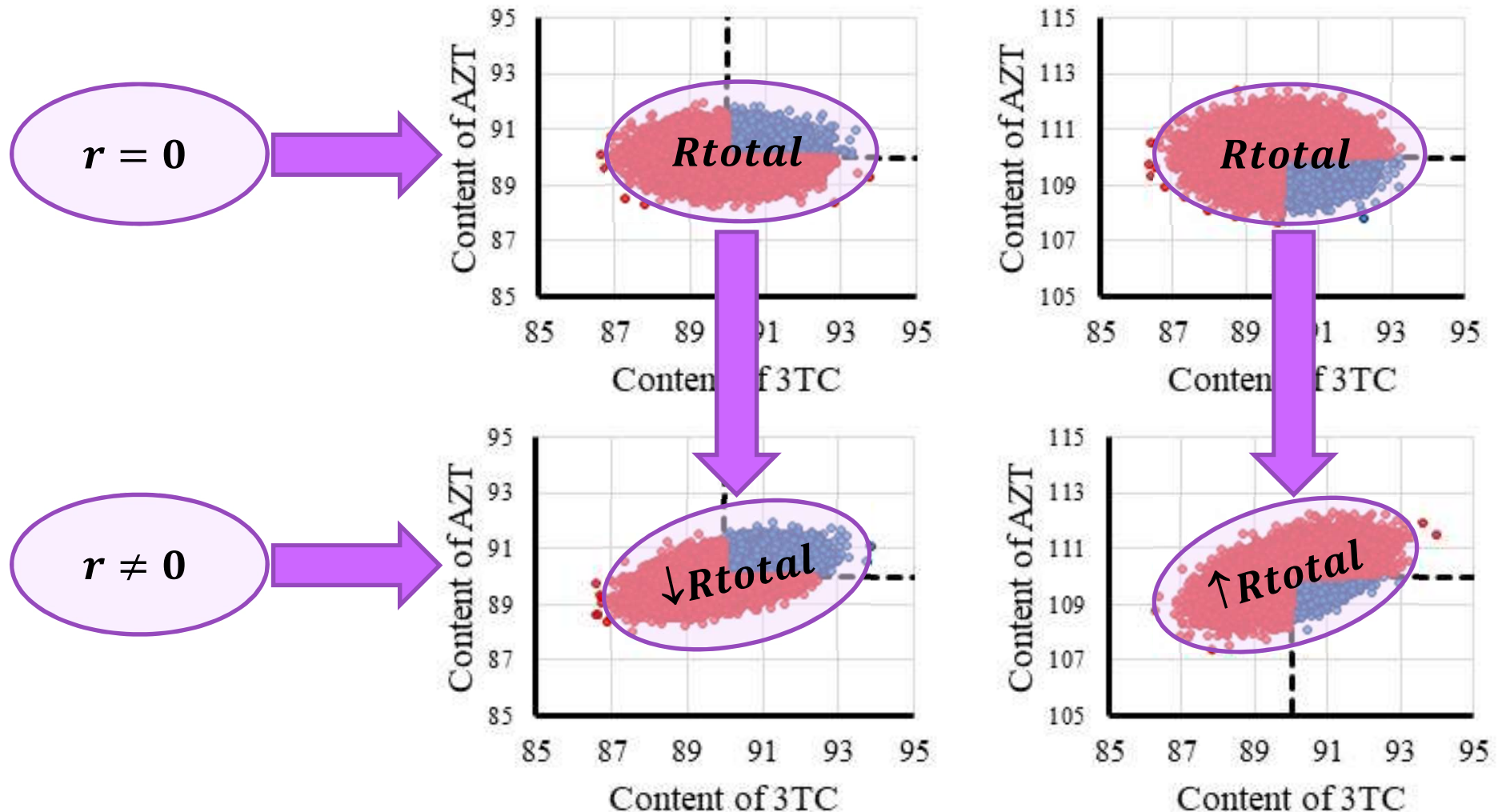
Estimativa dos riscos...

- Produtor x Consumidor
- Particular x Total
- Global x Específico

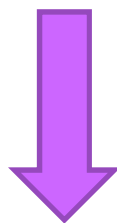
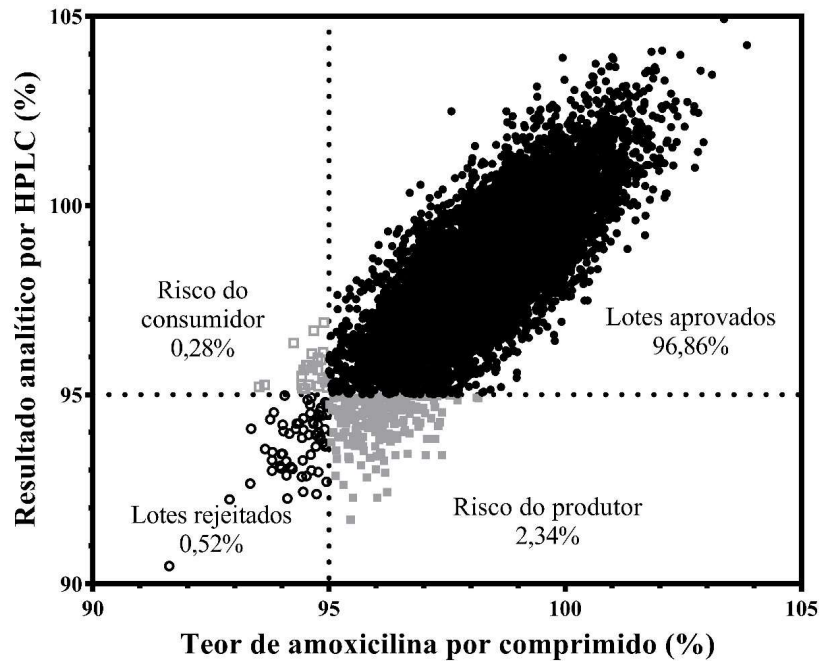
ESTIMATIVA DE RISCOS: PRODUTOR x CONSUMIDOR



ESTIMATIVA DE RISCOS: PARTICULAR x TOTAL

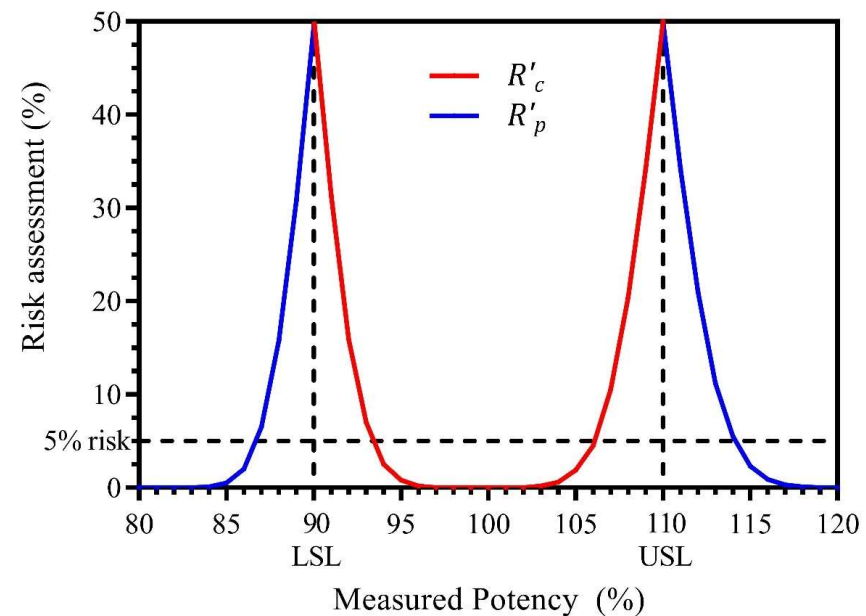


ESTIMATIVA DE RISCOS: GLOBAL x ESPECÍFICO



Risco
Global

Risco
específico



REFERÊNCIAS



- Ellison & Barwick, 2008.
- Ellison & Williams, 2012.
- Gadrich & Bashkansky, 2016.
- Galvão, Saviano & Lourenço, 2016.
- Ghisleni, Okamoto, Amaral, Lourenço & Pinto, 2014.
- ISO/GUM, 2008.
- ISO/GUM – Supplement 1, 2008.
- Kuselman, Pennechi, Silva & Hibbert, 2017.
- Lourenço, 2013.
- Lourenço, Botelho & Pinto, 2012.
- Lourenço, Kaneko & Pinto, 2005.
- Lourenço, Kaneko & Pinto, 2007.
- Mueller, 2002.
- Ostronoff & Lourenço, 2015.
- Saviano & Lourenço, (Talanta) 2018.
- Saviano & Lourenço, (Measurement) 2018.
- Saviano, Francisco & Lourenço, 2014.
- Separovic, Saviano & Lourenço, 2018.
- Traple, Saviano, Francisco & Lourenço, 2014.
- Williams, 1998.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia

OBRIGADO!

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço