Universidade Evangélica de Goiás
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Farmacologia & Terapêutica

OSMAR VIEIRA DA SILVA

GUIA DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA: APLICAÇÃO DO *DESING OF EXPERIMENTS* E OS PRINCÍPIOS DE *ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN*

ANÁPOLIS-GO
2024

OSMAR VIEIRA DA SILVA

GUIA DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA: APLICAÇÃO DO *DESING OF EXPERIMENTS* E OS PRINCÍPIOS DE *ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Farmacologia & Terapêutica da Universidade Evangélica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Danilo Dias

Anápolis-GO

2024

S586

Silva, Osmar Vieira da.

Guia de desenvolvimento de metodologia analítica: aplicação do *Design of Experiments* e os princípios de *Analytical Quality by Design* / Osmar Vieira da Silva – Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, 2024.

162p.; il.

Orientadora: Prof. Dr. Lucas Danilo Dias.

Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Farmacologia e Terapêutica – Universidade Evangélica de Goiás - UniEvangélica, 2024.

1. Qualidade por design analítico 2. Desenvolvimento de metodologia analítica 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Planejamento experimental I. Dias, Lucas Danilo II. Título

CDU 615.1

Catalogação na Fonte
Elaborado por Rosilene Monteiro da Silva CRB1/3038

UniEVANGÉLICA
UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS

PPGCF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUIA DE DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: APLICAÇÃO DO DESING OF EXPERIMENTS E OS PRINCÍPIOS DE ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN

Osmar Vieira da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas /PPGCF da Universidade Evangélica de Goiás/UniEVANGÉLICA como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE.

Linha de Pesquisa: Inovação Farmacêutica

Aprovado em 08 de outubro de 2024.

Banca examinadora

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCAS DANILO DIAS
Data: 12/10/2024 15:38:36-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Lucas Danilo Dias
Presidente da Banca

gov.br Documento assinado digitalmente
ANTONIO SERGIO NAKAO DE AGUIAR
Data: 09/10/2024 10:38:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Antônio Sérigio Nakao de Aguiar
Avaliador Interno

gov.br Documento assinado digitalmente
HAMILTON BARBOSA NAPOLITANO
Data: 11/10/2024 21:00:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Hamilton Barbosa Napolitano
Avaliador Interno

gov.br Documento assinado digitalmente
ALESSANDRA RAMOS LIMA
Data: 09/10/2024 13:31:17-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Alessandra Ramos Lima
Avaliador Externo

Este trabalho é dedicado à minha mãe Augusta, ao meu pai Manoel, ao meu filho João Pedro, a minha esposa Graziela, aos meus irmãos, aos meus tios e a todas as pessoas que me deram suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Lucas Danilo Dias pelo suporte, paciência, orientação e pelo exemplo de dedicação, conhecimento e profissionalismo.

Agradeço a minha esposa Graziela e ao meu filho João Pedro pela paciência que tiveram durante os meus dias de aula e de estudo.

Agradeço a Geolab SA, ao Eduardo Lopes e ao Marden dos Santos pelo incentivo e pelas oportunidades que me deram.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.” (Johan Wolfgang Von Goethe)

RESUMO

O desenvolvimento de métodos analíticos para determinar a concentração dos ativos e impurezas nos produtos durante a etapa de desenvolvimento e em toda sua vida útil é uma parte fundamental da proposta de um novo medicamento, garantindo deste modo, a qualidade do produto e segurança aos pacientes. Uma metodologia analítica, deve ser indicativa de estabilidade, ou seja, capaz de detectar, no decorrer do tempo, alterações nas propriedades químicas, físicas ou microbiológicas de uma substância ou produto. Outros atributos importantes descrevem que são metodologias específicas capazes de mensurar com exatidão a dosagem do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência. Com o objetivo de identificar e quantificar diferentes componentes da formulação de um produto são empregadas diferentes técnicas analíticas, dentre elas destaca-se as cromatográficas. Deste modo, a etapa de desenvolvimento de método analítico é crucial para a garantia da qualidade do produto, pois uma metodologia sem otimização pode quantificar erroneamente os analitos de interesse. Assim, uma abordagem sistemática, baseada em conhecimento, estatística e análise de risco é essencial para a obtenção de métodos analíticos confiáveis. O guia ICH Q8(segunda revisão) descreve a Qualidade por *Design* ou *Quality by design* (QbD) como uma forma de abordar o desenvolvimento farmacêutico. Nessa abordagem os objetivos são predefinidos e o foco está no produto, no entendimento e controle de cada etapa baseando sempre em dados científicos, análise e gestão de riscos. Os métodos analíticos são considerados parte do desenvolvimento farmacêutico e por isso a Qualidade por Design Analítico também é recomendada para obter flexibilidade regulatória, maior conhecimento do comportamento analítico do produto, reduzir os resultados fora da especificação, obter métodos analíticos mais econômicos e mais robustos, garantindo uma maior confiabilidade nos resultados. Uma abordagem de desenvolvimento de metodologia analítica utilizando o Planejamento de Experimentos (DOE) e ferramentas estatísticas, ao invés da abordagem tradicional *One Factor at a Time* (OFAT) traz muitas vantagens em diversos aspectos. As abordagens QbD e *Analytical Quality by Design* (AQbD) possibilita a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto farmacêutico e do método analítico, inclusive para reduzir a variabilidade do produto, melhorar o desempenho do processo, melhorar o desempenho analítico, etc. Para o desenvolvimento do presente trabalho, foi utilizado um produto hipotético numa formulação hipotética (comprimido) contendo um princípio ativo com dosagem de 50 mg. O objetivo desta pesquisa é apresentar um guia utilizando os conceitos de DOE e AQbD no desenvolvimento e otimização de uma metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O foco é o processo de desenvolvimento analítico utilizando o AQbD, bem como obtenção e avaliação dos dados, pois trata-se de um trabalho com intenção ilustrativa de como atender os guias ICH e legislação nacional vigente no contexto farmacêutico. Dessa forma, contribuir para a compreensão do processo de desenvolvimento analítico utilizando as ferramentas descritas nos guias Q2 (segunda revisão), Q8, Q9, Q10, Q11, Q12 e Q14 do ICH. Mostraremos um passo a passo de forma hipotética e prática que permitirá ao pesquisador entender a filosofia deste tipo de desenvolvimento analítico. Serão abordados assuntos como: como realizar a pesquisa bibliográfica, a análise de risco, a escolha das condições iniciais de análise, a determinação do *Analytical Target Profile* (ATP), a determinação dos *Critycal Quality Attributes* (CQAs), o fluxo de desenvolvimento analítico, como realizar o DOE e avaliar seus resultados.

Palavras-chaves: Qualidade por Design Analítico, Desenvolvimento de metodologia analítica, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Planejamento Experimental.

ABSTRACT

The development of analytical methods to determine the concentration of active ingredients and impurities in products during the development stage and throughout their shelf life is a fundamental part of the proposal for a new drug, thus ensuring product quality and patient safety. An analytical methodology must be indicative of stability, that is, capable of detecting, over time, changes in the chemical, physical or microbiological properties of a substance or product. Other important attributes describe that they are specific methodologies capable of accurately measuring the dosage of the active pharmaceutical ingredient, degradation products and other components of interest, without interference. In order to identify and quantify different components of a product's formulation, different analytical techniques are used, among which chromatography stands out. Thus, the analytical method development stage is crucial to guarantee product quality, since a methodology without optimization may erroneously quantify the analytes of interest. Therefore, a systematic approach, based on knowledge, statistics and risk analysis is essential to obtain reliable analytical methods. The ICH Q8 (second review) guide describes Quality by Design (QbD) as a way of approaching pharmaceutical development. In this approach, objectives are predefined and the focus is on the product, understanding and controlling each step, always based on scientific data, analysis and risk management. Analytical methods are considered part of pharmaceutical development and therefore Analytical Quality by Design is also recommended to obtain regulatory flexibility, greater knowledge of the analytical behavior of the product, reduce out-of-specification results, obtain more economical and more robust analytical methods, ensuring greater reliability in the results. An analytical methodology development approach using Design of Experiments (DOE) and statistical tools, instead of the traditional One Factor at a Time (OFAT) approach, brings many advantages in several aspects. The QbD and Analytical Quality by Design (AQbD) approaches enable continuous improvement throughout the life cycle of the pharmaceutical product and the analytical method, including to reduce product variability, improve process performance, improve analytical performance, etc. For the development of this work, a hypothetical product was used in a hypothetical formulation (tablet) containing an active ingredient with a dosage of 50 mg. The objective of this research is to present a guide using the concepts of DOE and AQbD in the development and optimization of an analytical methodology of high performance liquid chromatography (HPLC). The focus is on the analytical development process using AQbD, as well as obtaining and evaluating data, as this is a work with the intention of illustrating how to comply with the ICH guidelines and current national legislation in the pharmaceutical context. In this way, it contributes to the understanding of the analytical development process using the tools described in the ICH guides Q2 (second review), Q8, Q9, Q10, Q11, Q12 and Q14. We will show a step-by-step in a hypothetical and practical way that will allow the researcher to understand the philosophy of this type of analytical development. Topics such as how to carry out bibliographic research, risk analysis, choosing the initial analysis conditions, determining the Analytical Target Profile (ATP), determining Critical Quality Attributes (CQAs), the analytical development flow, how to carry out the DOE and evaluate its results will be covered.

Keywords: Quality by Design, analytical method development, High Performance Liquid Chromatography, Design of Experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral de um processo típico de gestão do risco à qualidade. 32
Figura 2. Fluxograma de modelo geral de aplicação de DOE.....41
Figura 3. Representação gráfica de planejamentos fatoriais completos. A- Dois fatores, dois níveis (2^2); B-Três fatores, dois níveis (2^3). 43
Figura 4. Representação gráfica de planejamentos fatoriais fracionados. (A) Planejamento Fatorial Fracionado 2^{3-1}; (B) Planejamento Fatorial Fracionado 3^{3-1}. 43
Figura 5. Gráfico de Pareto representando os efeitos principais (X1, X2 e X3) dos fatores (a) e efeitos principais (X1) e (X2) e efeitos de interação (X1*X2) dos fatores (b). Nesse caso, o efeito principal de X3 (a) é confundido com a interação X1 X2 (b). 44
Figura 6. Gráfico fatorial de efeitos principais (a) e interações (b) dos fatores X1 e X2.....45
Figura 7. Desenho composto central com dois níveis e três variáveis. 47
Figura 8. Exemplo da aplicação de Box-Behnken Design. 48
Figura 9. Interpretação geométrica dos efeitos num planejamento 23. Os efeitos principais são contrastes entre faces opostas (a), e os efeitos de interação são contrastes entre planos diagonais (b). 49
Figura 10. Representação geométrica de diversos tipos de planejamento: (a) fatorial fracionado, (b) Taguchi, (c) Plackett-Burman, (d) Fatorial completo, (e) Composto central, (f) Box-Behnken. 51
Figura 11. Exemplo de gráfico de Pareto. 58
Figura 12. Exemplo de gráfico normal dos efeitos padronizados. 59
Figura 13. Ilustração do MODR ou DS (irregular), DS proposto (regular), espaço de controle (CS ou NOR), e o set point (condição escolhida).....61
Figura 14. Ciclo de vida do procedimento analítico.....62
Figura 15. Fluxograma do racional de desenvolvimento de metodologia analítica por AQbD. 69
Figura 16. Estrutura molecular da nimesulida.....70
Figura 17. Gráfico de pKa da molécula de nimesulida. 70
Figura 18. Ponto isoelétrico da molécula de nimesulida.....70
Figura 19. Caráter lipofílico da molécula de nimesulida. 71
Figura 20. Solubilidade da molécula da molécula hipotética em função do pH do meio. 71
Figura 21. Diagrama de Ishikawa com os possíveis tipos de falhas e suas causas. 76
Figura 22. Pareto para priorização das variáveis.....78

Figura 23. Capacidade de tamponamento (β) do tampão acetato 0,1 mol/L. 80
Figura 24. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico. 97
Figura 25. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico. 97
Figura 26. Gráficos de avaliação dos resíduos para pureza de pico. 98
Figura 27. Gráfico de Contorno de Pureza versus fluxo; pH. 98
Figura 28. Gráfico de contorno de pureza versus temperatura; pH. 99
Figura 29. Gráfico de efeitos principais para pureza de pico. 99
Figura 30. Gráfico normal dos efeitos padronizados para número de pratos teóricos (N). 101
Figura 31. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para número de pratos teóricos (N). 101
Figura 32. Gráfico de contorno de número de pratos versus temperatura; pH. 101
Figura 33. Gráfico de contorno de número de pratos teóricos versus fluxo; pH. 102
Figura 34. Gráficos de resíduos para número de pratos teóricos (N). 102
Figura 35. Gráfico de efeitos principais para número de pratos teóricos. 103
Figura 36. Gráfico normal dos efeitos padronizados para resolução. 104
Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para resolução (R). 104
Figura 38. Gráficos de resíduos para resolução (R). 105
Figura 39. Gráfico de efeitos principais para resolução. 105
Figura 40. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação. 106
Figura 41. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação. 107
Figura 42. Gráficos de resíduo para recuperação. 107
Figura 43. Gráfico dos efeitos principais para recuperação. 107
Figura 44. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico. 112
Figura 45. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico. 112
Figura 46. Gráfico de probabilidade normal para pureza de pico. 113
Figura 47. Gráfico de resíduos versus valor ajustado para pureza de pico. 113
Figura 48. Histograma de frequência dos resíduos para pureza de pico. 114
Figura 49. Gráfico de resíduos versus ordem de injeção para pureza de pico. 114
Figura 50. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação. 116
Figura 51. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação. 117
Figura 52. Gráfico de probabilidade normal para recuperação. 117
Figura 53. Gráfico de resíduos versus valor ajustado para recuperação. 118
Figura 54. Histograma de frequência de resíduos para recuperação. 118
Figura 55. Gráfico de resíduos versus ordem de injeção para recuperação. 118
Figura 56. Gráfico normal dos efeitos padronizados para assimetria. 121

Figura 57. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para assimetria. 121
Figura 58. Gráfico de probabilidade normal para assimetria. 122
Figura 59. Gráfico de resíduos versus valores ajustados para assimetria. 122
Figura 60. Histograma de frequência de resíduos para assimetria. 123
Figura 61. Gráfico de resíduos versus ordem de observação para assimetria. 123
Figura 62. Gráfico normal dos efeitos padronizados para resolução. 126
Figura 63. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para resolução. 126
Figura 64. Gráfico de probabilidade normal para resolução. 127
Figura 65. Gráfico de resíduos versus valor ajustado para resolução. 127
Figura 66. Histograma de frequência de resíduos para resolução. 128
Figura 67. Gráfico de resíduos versus ordem de observação. 128
Figura 68. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pratos teóricos (N). 131
Figura 69. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pratos teóricos (N). 131
Figura 70. Gráfico de probabilidade normal para pratos teóricos (N). 132
Figura 71. Gráfico de resíduos versus valor ajustado para pratos teóricos (N). 132
Figura 72. Histograma de frequência dos resíduos para pratos teóricos (N). 133
Figura 73. Gráfico de resíduos versus frequência de observação para pratos teóricos (N). 133
Figura 74. Gráficos fatoriais para pratos teóricos (N). 134
Figura 75. Gráficos fatoriais comparativos para pratos teóricos (N). 134
Figura 76. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação. 138
Figura 77. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação. 138
Figura 78. Gráfico de probabilidade normal para recuperação. 139
Figura 79. Resíduos versus valor ajustado para recuperação. 139
Figura 80. Histograma de resíduos versus frequência para recuperação. 140
Figura 81. Resíduos versus ordem de observação para recuperação. 140
Figura 82. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico. 142
Figura 83. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico. 143
Figura 84. Gráfico de probabilidade normal para pureza de pico. 143
Figura 85. Gráfico de resíduos versus valor ajustado para pureza de pico. 144
Figura 86. Histograma de resíduos versus frequência para pureza de pico. 144
Figura 87. Resíduos versus ordem de observação para pureza de pico. 145
Figura 88. Gráfico de interação para pureza de pico. 146
Figura 89. Gráfico dos efeitos principais para pureza de pico. 146
Figura 90. Gráfico de efeitos principais para recuperação. 147

Figura 91. Gráfico de interação para recuperação. 147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comparação entre AQbD e OFAT. 29
Quadro 2. Guias ICH que absorvem o conceito de Quality by Design. 31
Quadro 3. Elementos avaliados no ATP. 37
Quadro 4. Variáveis de entrada e saída comumente encontradas em métodos de cromatografia líquida em coluna. 41
Quadro 5. Quando aplicar cada tipo de desenho experimental. 46
Quadro 6. Tipos de DOE mais comuns para otimização. 46
Quadro 7. Softwares, programas e sites que facilitam diversas etapas do AQbD. 65
Quadro 8. Limites de notificação, identificação e qualificação conforme RDC 53 de 2015 .. 66
Quadro 9. Propriedades físico-químicas da molécula de analito. 71
Quadro 10. Características da molécula hipotética. 72
Quadro 11. Pesquisa em compêndios oficiais para IFA e PAs da molécula hipotética. 72
Quadro 12. Resultado de pesquisa bibliográfica. 72
Quadro 13. Formulação do produto Analito 50 mg/comprimido. 73
Quadro 14. Parâmetros a serem considerados na validação analítica. 74
Quadro 15. Parâmetros a serem considerados na validação analítica para método de doseamento. 75
Quadro 16. Parâmetros de performances e CQAs 75
Quadro 17. Exemplo de análise de risco utilizando o FMEA. 77
Quadro 18. Resumo da análise de risco. 78
Quadro 19. Características importantes que influenciam nas condições iniciais. 79
Quadro 20. Comparação do método antigo com a proposta de método inicial para otimização. 85
Quadro 21. Comparação das condições analíticas para DOE 01 com condições ótimas previstas. 86
Quadro 22. Resumo do experimento DOE 01 88
Quadro 23. Gradiente de eluição para DOE 02. 90
Quadro 24. Resumo de experimento DOE 02. 91
Quadro 25. Gradiente 1. 92
Quadro 26. Gradiente 2. 92
Quadro 27. Resumo do experimento DOE 03 94
Quadro 28. Resumo do experimento DOE 01 com resultados obtidos. 95

Quadro 29. Sumário do modelo matemático para pureza de pico. 96
Quadro 30. Sumário do modelo para pratos teóricos. 100
Quadro 31. Sumário do modelo para resolução. 104
Quadro 32. Sumário do modelo matemático para recuperação. 106
Quadro 33. Solução da otimização dos parâmetros e condições. 108
Quadro 34. Ajustes da predição de múltiplas respostas. 109
Quadro 35. Coeficientes codificados. 110
Quadro 36. Sumário do modelo para pureza de pico. 111
Quadro 37. Análise de variância para pureza de pico. 111
Quadro 38. Coeficientes Codificados para recuperação. 115
Quadro 39. Sumário do modelo para recuperação. 115
Quadro 40. Análise de variância para recuperação. 116
Quadro 41. Coeficientes codificados para assimetria. 120
Quadro 42. Sumário do modelo para assimetria. 120
Quadro 43. Análise de Variância para assimetria. 120
Quadro 44. Coeficientes Codificados para resolução. 124
Quadro 45. Sumário do modelo para resolução. 125
Quadro 46. Análise de variância para resolução. 125
Quadro 47. Coeficientes codificados para pratos teóricos. 129
Quadro 48. Sumário do modelo para pratos teóricos. 129
Quadro 49. Análise de variância para pratos teóricos. 130
Quadro 50. Solução da otimização para N, R, Rec e pureza de pico. 135
Quadro 51. Condições de otimização de Múltiplas Respostas para N, R, Rec e pureza de pico. 135
Quadro 52. Predição de múltiplas respostas para N, R, Rec e pureza de pico. 135
Quadro 53. Coeficientes codificados para recuperação versus blocos; comprimento de onda; gradiente. 137
Quadro 54. Sumário do modelo para recuperação. 137
Quadro 55. Análise de variância para recuperação versus blocos; comprimento de onda; gradiente. 137
Quadro 56. Coeficientes codificados para avaliação da pureza de pico. 141
Quadro 57. Sumário do modelo para avaliação da pureza de pico. 141
Quadro 58. Análise de variância para pureza de pico. 142
Quadro 59. Predição do modelo com gradiente 1 e 230 nm para pureza de pico. 145

Quadro 60. Predição do modelo com gradiente 1 e 302 nm para pureza de pico. 145
Quadro 61. Solução da otimização para recuperação e pureza de pico. 148
Quadro 62. Dados do modelo de predição de múltiplas respostas para recuperação e pureza de pico. 148
Quadro 63. Gradiente de eluição. 150
Quadro 64. Resultados de adequabilidade do sistema. 152
Quadro 65. Resultados do teste de recuperação. 153
Quadro 66. Resultados do teste de filtro. 153
Quadro 67. Resultados do teste de estabilidade das soluções analíticas. 154
Quadro 68. Resultados de estudo de degradação forçada. 156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de DOE para cada situação. 42
Tabela 2. Solubilidade de sais em soluções aquosas contendo acetonitrila. 81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila.
AJ	Ajustado
ANOVA	Análise de Variância.
AQbD	Qualidade por Design Analítico.
AR	Avaliação de Risco.
ATD	Administração Total Diária
ATP	*Analytical Target Profile* (Perfil Analítico Alvo).
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BBD	Desenho *Box-Bhenken*.
BP	*British Pharmacopoeia*
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CCD	*Central composite design* ou planejamento composto central
CG	Cromatografia Gasosa
CL ou LC	Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMA	Atributos Críticos de Material.
CMC	*Chemistry Manufaturing Control*
Coef	Coeficiente
CQA	*Critical Qualities Attributes* ou Atributos Críticos da Qualidade
CPP	*Critical Parameters Process* ou Parâmetros Críticos de Processo
CPR	Comprimido
CTD	*Common technical document* (Documento Técnico Comum)
CS	*Control Space* ou região de controle
CV	Coeficiente de Variação.
5W2H	*5 What & 2How* (ferramenta da qualidade, 5 porquês e 2 como)
DAD	*Diode Array Detector* ou Detector de Arranjo de Diodos
DMF	*Drug Master File*
DOE	Design of Experiments (ou planejamento de experimentos)
DP	Desvio Padrão.
DPR	Desvio Padrão Relativo.
DS	*Design Space* (região de operação)

EP	Farmacopeia Europeia (em inglês European Pharmacopeia).
EP	Erro Padrão
F	Teste de *Snedecor/Fisher*
FB	Farmacopeia Brasileia
FJ	Farmacopeia Japonesa
FDA	*Food And Drug Administration.*
FFD	*Full factorial design ou* Planejamento Fatorial Completo.
FMEA	*Failure Mode and Effect Analysis* (Análise do modo e efeito de falha).
FrFD	Fractional Factorial Design ou Desenho Fatorial Fracionado.
GL	Graus de Liberdade.
HCl	Ácido Clorídrico.
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio.
HPLC	*High Performance Liquid Chomatography*
IC	Intervalo de Confiança
ICH	*International Council For Harmonisation*.
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo.
IP	Intervalo de Predição
ISO	*International Standards Organization*
WHO	*World Health Organization*
k´	Fator de Capacidade
LC-MS	*Liquid Cromatography-Mass Spectrometry*
LD	Limite de Detecção.
LOF	*Lack of Fit ou* Falta de Ajuste
LQ	Limite de Quantificação.
MeOH	Metanol
MODR	*Method Operable Design Region* (Região de Operação do Método).
MP	Matéria-prima
MLR	Regressão Linear Múltipla.
MQ	Média dos Quadrados.
MS	*Medium Square* (Quadrado Médio)
N	Número de pratos teóricos
NaOH	Hidróxido de Sódio.

NOR	*Normal Operation Region*
°C	Graus Celcius.
OFAT	*One Factor At Time* (Um fator por vez).
OOS	*Out of Specification* (Fora da Especificação).
OOT	*Out of Tendency* (Fora da Tendência).
PA	Produto acabado
Pad	Padronizado
PAT	*Process Analytical Technology* (Tecnologia de Processo Analítico).
PBD	*Plackett-Burman Design.*
PDCA	*Plan-Do-Check-Act.*
P & D	Pesquisa e Desenvolvimento.
POP	Procedimento Operacional Padrão.
Pred	Predito
PTFE	Politetrafluoretileno.
P-value	Valor de Probabilidade Estatística (p-valor).
PVDF	Polifluoreto de vinilideno.
Q^2	Coeficiente de Previsão.
QbD	*Quality by Design* (Qualidade por Planejamento).
QbT	*Quality-by-Testing.*
QM	Quadrados Médios.
QRM	*Quality Risck Management* (Gerenciamento de Risco da Qualidade)
QTPP	*Quality Target Product Profile* (Perfil de qualidade desejada do produto).
R	Resolução
Rec	Recuperação.
Resíd	Resíduo
R^2	Coeficiente de Correlação.
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada.
RID	*Refractive Index Detector.*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPN	*Risk Priority Number* (Número de Prioridade de Risco).
SPE	*Solid Fase Extraction* (Extração em Fase Sólida).
RSM	*Response Superface Methodoloy.*

SQ	Soma dos Quadrados.
SQR	Substância Química de Referência
SR	Substâncias Relacionadas
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
Tp	Tampão
TR	Tempo de Retenção.
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
USP-NF	*United States Pharmacopeia-National Formulary*
UV	Ultravioleta.
UV-VIS	Ultravioleta - Visível.

LISTA DE SIMBOLOS

α	Nível de significância estatístico
µM	Micromolar.
Abs	Absorção.
HCl	Ácido Clorídrico
Fe^{+3}	Ferro Férrico.
$FeCl_3$	Cloreto Férrico.
$g.mol^{-1}$	Grama Por Mol - Relação Entre Massa Atômica E Massa Molar.
H_2O	Água.
H_2O_2	Peróxido De Hidrogênio.
ʎ	Comprimento de Onda (nm)
L	Litros.
M	Molar ou mol/l
ml	Mililitros
µm	Micras.
mg	Miligramas.
mg/kg	Miligramas por quilo.
mL/min	Mililitros por minuto.
mm	Milímetro.
nm	Nanômetros.
NaOH	Hidróxido de Sódio
®	Representa uma marca registrada ou protegida por direitos autorais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 27

2. OBJETIVOS 30

2.1. Geral 30

2.2. Específicos 30

3. REVISÃO DE LITERATURA 31

3.1. *Quality By Design* **31**

3.2. Elementos do *Analytical Quality By Design* **36**

3.2.1. Perfil Analítico Alvo (*ANALYTICAL TARGET PROFILE* - ATP) 36

3.2.2. Atributos Críticos de Qualidade 38

3.2.3. Avaliação de Risco 38

3.2.4. Gestão do Conhecimento 40

3.2.5. Delineamento Experimental 40

3.2.6. Análise Exploratória ou Triagem 42

3.2.7. Análise de Otimização 46

3.2.8. Blocagem em Planejamentos Fatoriais 51

3.2.9. Resolução de Projeto 52

3.2.10. Randomização 53

3.2.11. Aliases e Confusão 54

3.2.12. Parâmetros de Avaliação de Modelos Matemáticos e Gráficos 54

4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO 68

4.1. Caracterização do Estudo 68

4.2. Pesquisa Bibliográfica- 1° Passo 69

4.2.1. Propriedades Físico-Químicas da Molécula 70

4.2.2. Formulação do Produto Acabado 73

4.3. Definição das Características Desejáveis da Metodologia 73

4.4. Determinação do Objetivo do Método Analítico e Atributos Críticos da Qualidade 74

4.5. Análise de Risco 76
4.5.1. Análise de Risco - 1º Passo, Ishikawa 76
4.5.2. Análise de Risco - 2º Passo, Brainstorm 76
4.5.3. Utilização do FMEA -3° Passo 77
4.5.4. Utilizando o Diagrama de Pareto para Elencar os Riscos -4º Passo 78
4.6. Definição da Condição Inicial 78
4.6.1. Escolhendo a Coluna Inicial e sua Temperatura 79
4.6.2. Escolhendo o pH do Tampão e o Tipo de Sal na Condição Inicial 79
4.6.3. Escolhendo o Diluente Inicial 81
4.6.4. Escolhendo a Concentração de Trabalho Inicial e Volume de Injeção 82
4.6.5. Escolhendo o Comprimento de Onda Inicial 83
4.6.6. Escolhendo o Fluxo Inicial 83
4.6.7. Definindo as Condições Inicias para o Planejamento de Triagem 84
4.6.8. Condições Originais da Metodologia a ser melhorada 84
4.6.9. Metodologia Proposta 85
4.7. Planejamento Experimental (DOE) 86
4.7.1. DOE 01 87
4.7.1.1. Resumos do Experimento DOE 01 88
4.7.2. DOE 02 88
4.7.2.1. Escolha das Condições de Análises 88
4.7.2.2. Preparo da Fase Móvel 89
4.7.2.3. Condições Analíticas do DOE 02. 90
4.7.2.4. Resumos do Experimento DOE 02 - Experimento Fatorial Completo 91
4.7.3. DOE 03 91
4.7.3.1. Escolha das Condições de Análises 91
4.7.3.2. Resumo do Experimento DOE 03 93
5. RESULTADO E DISCUSSÃO 95

5.1. Resultados e Discussão do *Design of Experiments* 01 95

5.1.1. A Análise Visual dos Resultados do *Design of Experiments* 01 95

5.1.2. Avaliação Gráfica e Estatística dos Resultados do *Design of Experiments* 01 96

5.1.3. Avaliação da Pureza de Pico 96

5.1.4. Conclusão da Avaliação da Pureza de Pico para o DOE 01 99

5.1.5. Avaliação do Número de Pratos Teóricos (N) 100

5.1.6. Conclusão da Avaliação do Número de Pratos Teóricos (N) 103

5.1.7. Avaliação da Resolução (R) entre o Pico do Analito e o Pico Mais Próximo 103

5.1.8. Conclusão da Avaliação dos Resultados Obtido para Resolução entre Analito e o Pico Mais Próximo 105

5.1.9. Avaliação dos Resultados de Recuperação do Analito 105

5.1.10. Conclusão da avaliação dos resultados obtidos para recuperação do Analito 108

5.1.11. Avaliação dos Resultados Obtidos para o fator de capacidade (K´) do pico do Analito 108

5.1.12. Otimização das Respostas 108

5.1.13. Conclusão da otimização das variáveis de entrada pH, fluxo e temperatura da coluna para DOE 01 109

5.1.14. Conclusão da análise dos resultados do DOE 01 109

5.2. Resultados e Discussão do DOE 02 109

5.2.1. Resultados obtidos no DOE 02 109

5.2.1.1. Regressão fatorial: pureza de pico *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda 109

5.2.1.2. Conclusão da avaliação da pureza no DOE 02 114

5.2.1.3. Regressão fatorial: recuperação *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda 115

5.2.1.4. Conclusão da avaliação da pureza no DOE 02. 119

5.2.1.5. Regressão fatorial: assimetria *versus* volume injeção; coluna; comprimento de onda 119

5.2.1.6. Conclusão da avalição de assimetria no DOE 02 123

5.2.1.7. Regressão fatorial: resolução *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda 124

5.2.1.8. Conclusão da avaliação dos resultados de resolução 128

5.2.1.9. Regressão fatorial: pratos teóricos *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda 128

5.2.1.10. Conclusão da avaliação de número de pratos teóricos (N) 134

5.2.1.11. Otimização da resposta: pratos teóricos; resolução; recuperação; pureza de pico 134

5.2.1.12. Conclusão da otimização para múltiplas respostas 135

5.2.1.13. Conclusão dos resultados obtidos no DOE 02 136

5.3. Resultados e discussão do DOE 03 136

5.3.1. Resultados obtidos no DOE 03 136

5.3.1.1. Regressão fatorial: recuperação *versus* blocos; comprimento onda; gradiente 136

5.3.1.2. Conclusão da avaliação dos resultados de recuperação no DOE 03 140

5.3.1.3. Regressão fatorial: pureza de pico *versus* blocos; comprimento onda; gradiente 140

5.3.1.4. Otimização da resposta: pureza pico; recuperação 147

5.3.1.5. Discussão dos resultados obtidos no DOE 03 148

5.3.1.6. Conclusão dos resultados obtidos no DOE 03 148

5.3.2. Conclusão geral dos planejamentos experimentais de DOE 01, DOE 02 e DOE 03 149

5.3.3. Metodologia proposta de acordo com os planejamentos experimentais DOE 01, DOE 02 e DOE 03 149

5.3.3.1. Condições Cromatográficas 149

5.3.3.2. Preparação do tampão pH 3,8 150

5.3.3.3. Preparação da fase móvel para linha A 150

5.3.3.4. Preparação da fase móvel para linha B 150

5.3.3.5. Preparação da solução diluente 150

5.3.3.6. Preparação do padrão 151

5.3.3.7. Preparação da amostra 151

5.3.4. Análises complementares ao desenvolvimento de método 151

5.3.4.1. Adequabilidade do sistema (System Suitability) 151

5.3.4.2. Resultados obtidos para adequabilidade do sistema (System Suitability) 151

5.3.4.3. Conclusão dos resultados do teste de adequabilidade do sistema (System Suitability) 152

5.3.5. Recuperação 152

5.3.5.1. Resultados obtidos para recuperação 152

5.3.5.2. Conclusão da avaliação dos resultados do teste de recuperação 153

5.3.6. Teste de filtro 153

5.3.6.1. Resultados do teste de filtro 153

5.3.6.2. Conclusão da avaliação dos resultados do teste filtro 154

5.3.7. Teste de estabilidade das soluções analíticas 154

5.3.7.1. Conclusão da avaliação dos resultados do teste de estabilidade das soluções analíticas 154

5.3.8. Estudo de degradação forçada 154

5.3.8.1. Resumo do estudo de degradação forçada 155

5.3.8.2. Conclusão dos resultados do teste de degradação forçada. 156

5.3.9. Definição do MODR 156

6. CONCLUSÃO 158

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 160

1. INTRODUÇÃO

A abordagem convencional para garantir e manter a qualidade dos produtos farmacêuticos baseia-se no método analítico desenvolvido, variando um fator de cada vez, ou seja, *One Fator At a Time* (OFAT). Esse método não considera possíveis interações entre os fatores, limitando sua capacidade de análise. No entanto, essa abordagem apresenta riscos de resultados inesperados e fora de especificação, devido à compreensão insuficiente dos produtos e processos envolvidos (ANDRADE, 2023).

Para garantir a qualidade do produto, recomenda-se obter um conhecimento prévio e aprofundado sobre todo o processo, bem como sobre o produto. O conceito de *Quality by Design* (QbD), definido pela *International Conference on Harmonization* (ICH), é considerado uma abordagem mais adequada, pois sistematiza o desenvolvimento de produtos, com foco na concepção de processos de fabricação, formulações de produtos e estratégias de controle, desde as etapas iniciais, com embasamento científico e análises estatísticas (ANDRADE, 2023).

O ICH Q8, onde é abordado, entre outros temas, o QbD. Embora se encontre requisitos de qualidade do produto descritos nas diretrizes tripartite do ICH, ou seja, além do ICHs Q8 (desenvolvimento farmacêutico), destacam-se Q9 (avaliação de risco de qualidade), Q10 (sistema farmacêutico de qualidade) e Q14 (métodos analíticos), é nesse primeiro guia, mais especificamente no ICH Q8 (revisão 2), que são estabelecidos os elementos fundamentais do desenvolvimento farmacêutico, como o Perfil de Produto Alvo de Qualidade (QTPPs), Atributos Críticos de Qualidade (CQAs), Parâmetros Críticos de Processo (CPPs), Avaliação de Risco (AR), Delineamento Experimental (DOE), Região Operável do Método (MODR), Estratégia de Controle e Gestão do Ciclo de Vida do Produto (ANDRADE, 2023).

É imprescindível levar em consideração as vantagens e os desafios da implementação do QbD na indústria farmacêutica. Ao transpor esses desafios por meio de abordagens colaborativas, investimento em recursos adequados e adaptação cultural nas organizações, é possível alcançar melhorias significativas na qualidade dos produtos farmacêuticos, proporcionando um produto mais seguro e eficaz aos pacientes (ANDRADE, 2023).

O QbD, conforme definido no guia do ICH Q8 (revisão 2), é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento farmacêutico, começando com objetivos predefinidos, que enfatiza a compreensão do produto e do processo. Trata-se de uma ferramenta com experimentos multivariados, cujo processo de manufatura torna-se flexível e ajustável dentro do espaço do projeto permitindo a melhoria contínua e o gerenciamento do ciclo de vida do produto. O processo de controle utiliza tecnologias analíticas de processo para prever comportamentos em

tempo real. A implementação do conceito de QbD constitui uma ferramenta promissora para a produção farmacêutica, pois permite a produção de medicamentos por meio da previsão de riscos, ampliando a possibilidade de assegurar produtos com eficácia, segurança e qualidade aliado à redução de custos. Até o momento, a indústria tem se concentrado nas atividades de desenvolvimento de produtos com pouca ênfase na definição de ferramentas para o químico analítico. O desenvolvimento de métodos analíticos apropriados é, no entanto, essencial para estabelecer o controle do produto e do processo em uma abordagem de desenvolvimento tradicional ou QbD (DIEGO, 2021).

O guia ICH Q14, foi criado com a finalidade de revisar o guia ICH Q2 (primeira revisão) (Validação de Procedimentos Analíticos) e complementar os guias Q8 (segunda revisão) (Desenvolvimento Farmacêutico), Q9 (Gerenciamento de Riscos), Q10 (Sistema da Qualidade Farmacêutica), Q11 (Desenvolvimento e Fabricação de Substâncias Medicamentosas) e Q12 (Gerenciamento do Ciclo de Vida do Produto Farmacêutico), objetivando acatar os princípios do QbD e aplicar no desenvolvimento e validação de métodos analíticos, denominado *Analytical Quality by Design* (AQbD), ou em português como qualidade pelo design analítico. Esta ferramenta, assim como o QbD, permite a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto e do método analítico, proporcionando o desenvolvimento de metodologias mais robustas. Além disso, sua implementação é focada em reduzir resultados fora da especificação (OOS) e fora da tendência (OOT), melhorar o desempenho dos processos e obter maior flexibilidade regulatória (DIEGO, 2021). Neste trabalho considerou-se o AQbD como uma extensão do QbD, conforme descrito no guia ICH Q14, e pode ser utilizado tanto no desenvolvimento quanto na otimização de metodologias analíticas.

A utilização da clássica aplicação OFAT, ainda é muito presente nos desenvolvimentos de método atuais, e é baseada na execução dos testes variando um fator de cada vez, não considerando as interações entre os fatores. O *Design of Experiments* (DOE), em português: Planejamento de Experimentos, é uma opção superior que permite variar diversos fatores ao mesmo tempo e avaliar as interações entre eles (DIEGO, 2021). Essa é uma das abordagens mais atuais, quando o assunto é desenvolvimento analítico, onde a qualidade não deve ser testada nos produtos e, sim, planejada e construída durante os processos de desenvolvimento e de produção (CHAVES, 2017).

O Quadro 1, mostra a comparação entre AQbD e OFAT.

Quadro 1. Comparação entre AQbD e OFAT.

OFAT	**AQbD**
Inicia com abordagem empírica de tentativa e erro	Inicia com uma abordagem baseada em conhecimento científico e objetivos bem definidos
A performance da metodologia é avaliada durante a validação	A performance da metodologia é avaliada durante o estabelecimento do perfil analítico alvo (ATP)
Há pouco entendimento das variáveis analíticas	Avaliação sistemática das variáveis e suas interações
Qualidade do método baseada na validação	A qualidade é desenhada durante o desenvolvimento pela robustez e reprodutibilidade
Verificação e transferência do método são atividades separadas	Qualificação de desempenho e verificação são atividades contínuas durante o ciclo de vida
Não existe flexibilidade regulatória às mudanças	Alterações dentro da região de operação do método (MODR) não são consideradas mudanças e não exigem submissões pós-registro
Não há espaço para melhorias	Flexibilidade na implantação de melhorias, melhoria contínua durante o ciclo de vida

Fonte: Chaves, 2017.

Para o desenvolvimento deste projeto, utilizou-se um produto hipotético na concentração de 50mg/comprimido. A proposta aqui é mostrar as etapas para a utilização de DOE e AQbD no desenvolvimento e/ou otimização uma metodologia analítica. O fundamental, é o processo de desenvolvimento analítico utilizando o AQbD, bem como obtenção e avaliação dos dados obtidos. Trata-se de um trabalho com intenção ilustrativa de como atender os guias ICH e legislação nacional vigente no contexto farmacêutico, uma vez que, atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) faz parte deste órgão harmonizador e está internalizando todos os guias na legislação nacional com alteração ou criação de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) (ABREU, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar e aplicar os conceitos de Qualidade por *Design Analítico* (AQbD) no desenvolvimento, otimização e validação de método analítico utilizando a ferramenta *Design of Experiments* (DOE).

2.2. Específicos

- Identificar às condições analíticas (tipo de coluna, composição da fase móvel, pH, proporção, vazão, etc) que mais afetam os parâmetros avaliados no método (retenção do pico, assimetria, resolução, e pratos teóricos, área, relação sinal ruído etc).
- Demonstrar como é definido o *Method Operable Design Region* (MODR), ou região de operação do método analítico, identificar os parâmetros de *System Suitability* relevantes e defini-los.
- Demonstrar como realizar a análise de risco para promover o controle e melhoria contínua da metodologia.
- Apresentar os elementos da Qualidade Analítica por Concepção.
- Construir um fluxograma para o desenvolvimento analítico de métodos baseado no conceito de AQbD;
- Estabelecer modelos matemáticos que estabelecem como as respostas cromatográficas são explicadas pelas condições analíticas relevantes e mostrar como é definida a região de operação do método analítico MODR;
- Demonstrar como avaliar os modelos matemáticos e gráficos gerados;
- Definir o *Analytical Target Profile* (ATP) ou perfil analítico alvo, identificar os atributos críticos da qualidade (CQAs), os atributos críticos dos materiais e os parâmetros críticos que afetam diretamente a qualidade da metodologia analítica;
- Demonstrar, como elaborar uma análise de risco baseada no Diagrama de Ishikawa, Modo de Falha e Análise de Efeito (FMEA), Gráfico de Pareto e Brainstorm com a definição de estratégias para o controle de risco;
- Demonstrar como realizar a pesquisa bibliográfica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Quality By Design*

Ao desenvolver um produto farmacêutico, várias abordagens podem ser escolhidas, entre elas o *Quality by Testing* (QbT), *Quality by Design* (QbD) e, também, uma abordagem híbrida. A abordagem QbD, em português: qualidade baseada no projeto, tem ganhado muito espaço no Brasil e no mundo, principalmente devido a criação dos Guias ICH Q8, Q9, Q10, Q11, Q12 e Q14. No Brasil essa abordagem tem crescido especialmente devido ao fato da ANVISA ter sido aceita como membro do ICH em 2016 (MINETO, 2021).

O Quadro 2, mostra os Guias ICH que absorvem o conceito de *Quality by Design*.

Quadro 2. Guias ICH que absorvem o conceito de *Quality by Design*.

Guia	**Assunto**
ICH Q14/2022	Desenvolvimento de procedimento analítico
ICH Q2R2/2022	Validação de procedimentos analíticos
ICH Q12/2019	Ciclo de vida do produto
ICH Q11/2014	Desenvolvimento e fabricação IFA
ICH Q10/2007	Sistema da qualidade farmacêutica
ICH Q9/2005	Análise e gerenciamento de risco
ICH Q8/2004	Desenvolvimento farmacêutico

Fonte: Elaboração própria.

O termo QbD, foi introduzido pelo engenheiro Joseph Moses Juran, tendo como fundamento a premissa de que qualidade não deve ser testada, e sim, planejada e construída. De acordo com ele, os problemas relacionados a qualidade de um produto eram originados durante o seu desenvolvimento. Logo, o QbD permite compreender que, para um processo ou um método ser considerado robusto, confiável e viável, precisa ser concebido de forma racional. A ferramenta QbD confere um maior controle das variáveis sistemáticas envolvidas no processo, permitindo maximizar a probabilidade do produto final possuir a qualidade desejada (DIEGO, 2021).

Conforme o guia do ICH Q8 (segunda revisão), o QbD é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento farmacêutico, apresentando logo no início objetivos predefinidos, que enfatizam o conhecimento do produto e do processo. É uma ferramenta com experimentos multivariados cujo processo de manufatura torna-se flexível e ajustável dentro do espaço do projeto permitindo a melhoria contínua e o gerenciamento do ciclo de vida do produto. O

processo de controle utiliza tecnologias analíticas de processo para prever comportamentos em tempo real (ICH Q8 (segunda revisão), 2022).

A implementação do conceito de QbD é um instrumento promissor para a produção farmacêutica, pois permite a obtenção de medicamentos por meio da previsão de riscos, ampliando a possibilidade de assegurar produtos com eficácia, segurança e qualidade com diminuição de custos (DIEGO, 2021).

O guia ICH Q9 descreve a gestão do risco à qualidade como um processo sistemático para avaliação, controle, comunicação e análise do risco à qualidade do medicamento em todo o ciclo de vida do produto. A Figura 1, mostra um modelo sugerido por esse guia para a análise e gestão de risco à qualidade (ICH Q9, 2023).

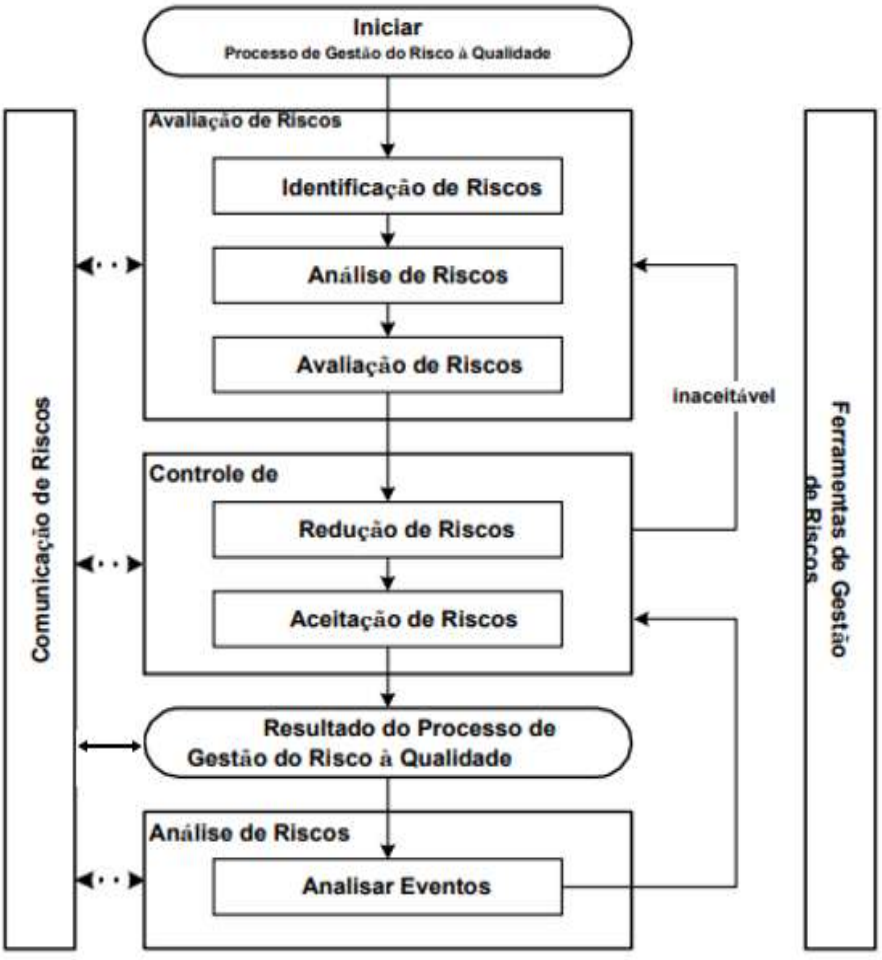

Figura 1. Visão geral de um processo típico de gestão do risco à qualidade.

Fonte: ICH Q9, 2015 (adaptado).

O destaque em cada componente da estrutura pode diferir de caso para caso, mas um processo forte abrangerá a consideração de todos os elementos em um nível de detalhe

proporcional ao risco específico. Os nós de decisão não são mostrados no diagrama acima, porque as decisões podem ocorrer em qualquer ponto do processo. Essas decisões podem ser: retornar à etapa anterior e buscar mais informações, ajustar os modelos de risco ou até finalizar o processo de gestão de riscos com base nas informações que sustentam tal decisão (ICH Q9, 2023).

A gestão do risco à qualidade é, geralmente, mas nem sempre, realizada por equipes interdisciplinares. Quando as equipes são formadas, elas devem incluir especialistas das áreas apropriadas, além de indivíduos com conhecimento sobre o processo de gestão do risco à qualidade (ICH Q9, 2023).

O guia ICH Q10 descreve um modelo abrangente para um sistema de qualidade farmacêutica eficaz, baseado nos conceitos de qualidade da Organização Internacional de Padrões (*International Standards Organization* – ISO), incluindo regulamentações aplicáveis de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e complementa o guia Q8 do ICH "Desenvolvimento Farmacêutico" e o guia Q9 do ICH "Gestão de Riscos à Qualidade ". O guia Q10 do ICH é um modelo para um sistema de qualidade farmacêutica que pode ser implementado nos diferentes estágios do ciclo de vida do produto. Atualmente, grande parte do conteúdo deste guia, aplicável aos locais de fabricação é especificado pelas exigências regionais de BPF. O guia Q10 do ICH não se destina a criar novas expectativas além das exigências regulatórias atuais. Consequentemente, o seu conteúdo, adicional às exigências regionais atuais de BPF, é opcional. O guia Q10 do ICH demonstra o apoio da indústria e das autoridades reguladoras de um sistema de qualidade farmacêutica eficaz para melhorar a qualidade e a disponibilidade de medicamentos em todo o mundo, no interesse da saúde pública. A sua implementação em todo o ciclo de vida útil do produto deve facilitar a inovação e o aperfeiçoamento contínuo, fortalecendo o vínculo entre desenvolvimento farmacêutico e atividades de fabricação (ICH Q10, 2015).

O Guia ICH Q11 descreve as abordagens para desenvolver e entender o processo de fabricação da substância medicamentosa e também fornece orientações sobre quais informações devem ser fornecidas no Documento Técnico Comum (CTD) que devem ser enviados às agências reguladoras. Aborda os aspectos do desenvolvimento e da fabricação que pertencem à substância medicamentosa, incluindo a presença de etapas projetadas para reduzir impurezas. Além disso, este guia fornece esclarecimento adicional sobre os princípios e conceitos descritos no Guia do ICH sobre Desenvolvimento Farmacêutico, Gestão do Risco à Qualidade e Sistema de Qualidade Farmacêutica, uma vez que pertencem ao desenvolvimento e produção da substância medicamentosa (ICH Q11, 2012).

O Guia ICH Q12 fornece uma estrutura para facilitar o gerenciamento de alterações do *Chemistry Manufaturing Control* (CMC) pós-aprovação em uma forma mais previsível e eficiente. Uma abordagem harmonizada em matéria técnica e regulamentar considerações para o gerenciamento do ciclo de vida beneficiarão os pacientes, a indústria e as autoridades regulatórias ao promover a inovação e a melhoria contínua no setor farmacêutico, fortalecendo a qualidade garantia e melhoria do fornecimento de medicamentos (ICH Q12, 2019).

Os conceitos descritos nas Diretrizes de Qualidade anteriores da ICH (ICH Q8 (segunda revisão), Q9, Q10 e Q11) fornecem oportunidades para abordagens baseadas na ciência e no risco para uso no desenvolvimento de medicamentos e na regulamentação decisões. Estas diretrizes são valiosas na avaliação de Química, Fabricação e Controles (CMC) muda ao longo do ciclo de vida do produto. As diretrizes Q8 (segunda revisão) e Q11 do ICH concentram-se principalmente em aspectos de estágio do ciclo de vida do produto (ou seja, desenvolvimento, registro e lançamento do produto). Esse a diretriz aborda a fase comercial do ciclo de vida do produto (conforme descrito no ICH Q10); e isso complementa e acrescenta às abordagens regulatórias flexíveis para mudanças pós-aprovação do CMC descrito no ICH Q8 (segunda revisão) e Q10 Anexo 1.

O Guia ICH Q12, também pretende demonstrar como o aumento do conhecimento do produto e do processo pode contribuir para uma compreensão mais precisa e exata de quais alterações pós-aprovação exigem uma submissão regulatória, bem como a definição do nível de categorias de relatórios para tais mudanças (ou seja, uma melhor compreensão do risco para a qualidade do produto). Maior conhecimento e eficácia a implementação das ferramentas e facilitadores descritos nesta diretriz deverá aumentar a capacidade da indústria gerenciar muitas mudanças do CMC de forma eficaz no Sistema de Qualidade Farmacêutica da empresa com menos necessidade de supervisão regulatória extensiva antes da implementação. Esta abordagem pode incentivar a melhoria contínua, proporcionando uma oportunidade para maior flexibilidade na realização de alterações pós-aprovação. Também poderia resultar em menos envios pós-aprovação associados ao *Marketing*, menos pedidos de autorização, e menor carga regulatória associada. A extensão desta operação e a flexibilidade regulamentar e a sua implementação adequada estão sujeitas ao quadro regulamentar em lugar, bem como compreensão do produto e processo, aplicação de risco de qualidade princípios de gestão e um sistema de qualidade farmacêutica eficaz (ICH Q12, 2019).

O Guia ICH Q2 (segunda revisão) apresenta elementos para consideração durante a validação de procedimentos analíticos incluídos como parte de solicitações de registro. A validação de procedimentos analíticos faz parte do ciclo de vida do procedimento analítico. Este

Guia fornece orientação sobre a seleção e avaliação dos vários testes de validação para procedimentos analíticos. Esta diretriz inclui uma coleção de termos e suas definições, que visam aproximar as diferenças que frequentemente existem entre vários compêndios e documentos das autoridades reguladoras membros do ICH. Esta diretriz se aplica a procedimentos analíticos usados para testes de liberação e estabilidade de substâncias e produtos comerciais, doravante denominados "produtos". A diretriz também pode ser aplicada a outros procedimentos analíticos usados como parte da estratégia de controle (ICH Q10 *Pharmaceutical Quality System*) seguindo uma abordagem baseada em risco. Os princípios científicos descritos nesta diretriz podem ser aplicados de uma maneira apropriada à fase para procedimentos analíticos usados durante o desenvolvimento clínico. A diretriz é direcionada a usos comuns de procedimentos analíticos, como ensaio, potência, pureza, impureza (teste quantitativo ou limite), identidade ou outras medições quantitativas ou qualitativas. Este guia indica os dados que devem ser apresentados em uma submissão regulatória. Abordagens diferentes das estabelecidas nesta diretriz podem ser aplicáveis e aceitáveis com justificativa científica apropriada. O requerente é responsável por projetar os estudos de validação e o protocolo mais adequado para seu produto (ICH Q2 (segunda revisão), 2023).

Na prática, o trabalho experimental pode ser projetado, de modo que as características de desempenho apropriadas sejam consideradas simultaneamente para fornecer conhecimento geral e sólido do desempenho do procedimento analítico por exemplo: especificidade/seletividade, exatidão e precisão sobre o intervalo reportado. Conforme descrito no ICH Q14, o teste de adequação do sistema é parte integrante dos procedimentos analíticos e é geralmente estabelecido durante o desenvolvimento como uma verificação regular do desempenho. A robustez é, normalmente avaliada como parte do desenvolvimento antes da execução do estudo de validação do procedimento analítico (ICH Q14). Finalmente, a estratégia de validação do procedimento analítico é desenvolvida com base no conhecimento do procedimento analítico e da finalidade pretendida. Isso inclui o desempenho do procedimento analítico necessário para garantir a qualidade do resultado medido (ICH Q14). Se executada com sucesso, a estratégia de validação do procedimento analítico demonstrará que o procedimento analítico é adequado para a finalidade pretendida. Mudanças podem ser necessárias durante o ciclo de vida de um procedimento analítico validado. Em tais casos, pode ser necessária uma revalidação parcial ou completa. Princípios científicos e baseados em risco podem ser usados para justificar se há ou não uma determinada característica de desempenho precisa de revalidação. A extensão da revalidação depende das características de desempenho impactadas pela mudança. A transferência de um procedimento analítico validado deve ser

considerada no contexto de mudanças no ciclo de vida analítico de acordo com o ICH Q14. Ao transferir procedimentos analíticos para um laboratório diferente, uma revalidação parcial ou completa das características de desempenho do procedimento analítico e/ou análise comparativa de amostras representativas deve ser realizada. A justificativa para não realizar experimentos de transferência adicionais deve ser fornecida, se apropriado (ICH Q2 (segunda revisão), 2023).

O Guia ICH Q14 tem o propósito de revisar o guia Q2 e complementar os guias Q8 a Q12, objetivando adotar os princípios do QbD no desenvolvimento e validação de métodos analíticos, denominado *Analytical Quality by Design* (AQbD). A utilização desse guia, permite a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto e do método analítico, proporcionando métodos analíticos mais robustos. Reduzindo os resultados fora da especificação e fora da tendência (OOT), melhorando a qualidade dos processos e obtendo maior flexibilidade regulatória (DIEGO, 2021).

O QbD concebe todo o desenvolvimento farmacêutico, o que permite a compreensão completa do produto e do seu processo de fabricação, assegurando sua segurança e eficácia. Os métodos analíticos são considerados parte integrante do desenvolvimento farmacêutico. Desta forma, justifica-se a aplicação da abordagem QbD no desenvolvimento de tais procedimentos (MOREIRA, 2019).

3.2. Elementos do *Analytical Quality By Design*

Nesta seção, foram discutidos os principais elementos que compõem o QbD conforme os guias citados no item 3.1 deste trabalho. Neste ponto, foram discutidos os elementos necessários do *Analytical Quality by Design* (AQbD), que são:

3.2.1. Perfil Analítico Alvo (*ANALYTICAL TARGET PROFILE* - ATP)

O *Analytical Target Profile* (ATP) trata-se do escopo do método. É a etapa mais importante no desenvolvimento de um método analítico, inicia com a definição da finalidade da metodologia que, estará sendo baseada no conhecimento prévio das propriedades e características da molécula que será quantificada como. Por exemplo, seus mecanismos de degradação, impurezas de processos ou síntese e produtos de degradação, suas interações com os excipientes do produto final, a faixa de concentração e as características de desempenho desejadas, as especificações e os limites de aceitação. Para isto, a pesquisa bibliográfica, é parte

necessária do ATP e definirá aspectos do método como a seleção das fases, do instrumento, a preparação das soluções para análises, etapas do desenvolvimento, etc como mostrado no Quadro 3.

O Quadro 3, ilustra a aplicação alvo do ATP para IFA (Insumo Farmacêutico ativo) ou Produto acabado.

Quadro 3. Elementos avaliados no ATP.

Elementos do ATP	Alvo	Justificativa
Amostra	IFA ou PA	Desenvolver um método analítico para Quantificação de determinada molécula no IFA ou medicamento, podendo ser o princípio ativo ou outros componentes
Aplicação do método	Doseamento de IFA ou PA	Método será desenvolvido para determinação de teor, uniformidade, produto de degradação, entre outros.
Características da amostra (Forma farmacêutica)	Sólido, Líquido e Supositório	A técnica de extração da amostra deve ser avaliada, se há necessidade de sonicação, agitação mecânica, centrifugação ou filtração
Instrumento	CLAE, CG, Potenciometria	Baseado na presença de grupamento cromóforos, volatilidade e outras características estruturais e moleculares
Preparação do padrão e amostras	Diluente	Justificado com base na solubilidade e pKa do IFA
Tipo de Método	Fase reversa ou fase normal	Baseado na polaridade da molécula que influencia o alvo do método

Fonte: Diego, 2021 (Modificada)

Os critérios definidos no ATP referem-se aos atributos de dados de qualidade do resultado relatável, isto é, precisão e incerteza de medição, que incluem todas as fontes de variabilidade. Identificar o resultado do método como o resultado relatável fornece um alvo para o desenvolvimento e ajuda a assegurar que o procedimento é desenvolvido para requisitos de desempenho predeterminados que estão diretamente ligados à qualidade dos dados. A utilização do ATP introduz atributos de desempenho e altera a forma como atualmente definimos e avaliamos as características de desempenho analítico. O ATP serve como ponto de referência para avaliar a aptidão de um procedimento analítico não apenas na fase de desenvolvimento, mas também durante todas as mudanças dentro do ciclo de vida analítico (PAIXÃO, 2017).

É a primeira etapa do processo de desenvolvimento do método analítico, que além das premissas de desempenho relacionadas à especificidade, limites de detecção, precisão, exatidão, linearidade e robustez, apresenta também a descrição do objetivo do método analítico,

dos parâmetros críticos do processo e dos atributos críticos da qualidade (CQA) (MARANHO, 2017).

3.2.2. Atributos Críticos de Qualidade

O CQA constitui-se nas características ou propriedades físicas, químicas e microbiológicas atreladas a uma especificação que garanta a devida segurança e eficácia farmacêutica, podendo pertencer a uma matéria-prima, produto intermediário ou produto acabado. Exemplos destas características são: aspectos organolépticos, peso médio, desintegração, friabilidade, teor, dissolução, uniformidade de conteúdo, perfil cromatográfico e limites microbiológicos. O CQA é um critério de qualidade do produto e está correlacionado ao ATP, podem ser medidos (SUGIMOTO, 2020).

No caso dos procedimentos analíticos, os CQAs ou atributos críticos da qualidade (*Critic Quality Atributs*), são os critérios de aceitações que o método analítico deverá cumprir (MARANHO, 2017). Exemplos de CQAs são simetria de picos, resolução entre eles, pureza de pico, tempo de retenção relativos, teor, número de pratos teóricos, etc. O Guia ICH Q8 define CQA para produtos, já o Guia ICH Q14 já traz esse termo adaptado à metodologia analítica linkada ao ATP (*Analytical Target Profile*), ou seja, são os critérios de aceitação dos testes realizados utilizando a metodologia analítica.

3.2.3. Avaliação de Risco

O uso da avaliação de risco e gerenciamento de risco de qualidade é incentivado para ajudar no desenvolvimento de um sistema robusto de procedimento analítico para reduzir o risco de mau desempenho e relato de resultados incorretos. A avaliação de risco é normalmente realizada no início do processo de desenvolvimento analítico e é atualizada a medida que mais informações ficam disponíveis. A avaliação de riscos pode ser formal ou informal e pode ser apoiada por conhecimento prévio (ICH Q9, 2015).

As ferramentas de avaliação de risco descritas no ICH Q9 podem ser usadas para:

- Identificar parâmetros de procedimentos analíticos (fatores e etapas operacionais) com impacto potencial sobre seu desempenho, por exemplo, diagrama de Ishikawa;
- Avaliar o impacto potencial dos parâmetros do procedimento analítico no desempenho do mesmo;

- Identificar e priorizar parâmetros de procedimentos analíticos a serem investigados experimentalmente;
- Informar a necessidade e a extensão do monitoramento contínuo como parte da análise de riscos.

A comunicação de riscos deve ser usada para apoiar a melhoria contínua do desempenho do procedimento analítico durante todo o seu ciclo de vida. O resultado da gestão do risco de qualidade deve ser documentado nas partes relevantes do sistema de qualidade farmacêutica do requerente (ICH Q14, 2023).

A análise do risco é a estimativa do risco associado aos perigos identificados. É o processo qualitativo ou quantitativo de vincular a probabilidade de ocorrência e a gravidade dos danos. Em algumas ferramentas de gerenciamento de riscos, a capacidade de detectar o dano (detectabilidade) também influencia a estimativa do risco (ANVISA, 2023).

A avaliação de risco é uma das etapas mais importantes do AQbD que, além de avaliar os possíveis riscos de falhas também permite avaliar e escolher os CQAs. O ICH Q9 recomenda diversas ferramentas de análise e gerenciamento de risco (ICH Q9, 2015). Conforme segue:

- Métodos básicos de facilitação da gestão de riscos (fluxogramas, fichas de controle etc.);
- Análise dos Efeitos dos Modos de Falha (FMEA);
- Análise do Nível Crítico, Efeitos e Modos de Falha;
- Análise da Árvore de Falha;
- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle;
- Análise da Operabilidade de Perigos;
- Análise Preliminar de Perigos;
- Classificação e Filtragem de Riscos;
- Ferramentas Estatísticas de Suporte.

Outras ferramentas podem ser utilizadas na análise de risco, por exemplo o *Brainstorm*, Diagrama de Ishikawa e Diagrama de Pareto que são bastante descritos na literatura para essa finalidade.

O *Brainstorm* no AQbD é comumente utilizado para provocar as discussões que levam a escolha dos parâmetros que serão considerados os mais importantes durante o processo de desenvolvimento de métodos. Por exemplo, a equipe pode se reunir e fazer um *Brainstorm* para decidir os dados que serão colocados no Diagrama de Ishikawa para serem avaliados. O Diagrama de Ishikawa é recomendado no Guia ICH Q14 (ICH Q14, 2023).

No AQbD o Diagrama de Ishikawa é comumente utilizado para a escolha dos itens que serão abordados no *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA).

FMEA. Já os resultados obtidos no FMEA podem ser elencados no Diagrama de Pareto para uma melhor avaliação visual.

Os métodos de gestão do risco à qualidade e as ferramentas estatísticas de suporte podem ser usados em combinação (por exemplo, Avaliação Probabilística de Riscos). O uso combinado fornece flexibilidade, o que pode facilitar a aplicação dos princípios de gestão do risco à qualidade (ICH Q9, 2015).

3.2.4. Gestão do Conhecimento

Tal como acontece com o desenvolvimento de produtos e processos de fabricação, a gestão do conhecimento desempenha um papel importante. Papel crítico no desenvolvimento do procedimento analítico e durante o ciclo de vida do procedimento analítico (ICH Q10, 2015).

O conhecimento prévio é usado explícita ou implicitamente para informar decisões durante o procedimento analítico, desenvolvimento e gerenciamento do ciclo de vida. O conhecimento prévio pode ser interno da empresa, desenvolvimento próprio, experiência analítica, conhecimento externo, como referência a estudos científicos e publicações técnicas ou princípios científicos estabelecidos (ICH Q14, 2023).

O conhecimento prévio do produto desempenha um papel importante na identificação de técnicas analíticas adequadas. O conhecimento das melhores práticas, das tecnologias de ponta e das expectativas regulatórias contribuem para a seleção da tecnologia mais adequada para um determinado fim. Análise de plataforma existente, procedimentos (por exemplo, medição do conteúdo de proteína por espectroscopia no ultravioleta) podem ser aproveitados para avaliar os atributos de um produto específico sem conduzir o desenvolvimento de procedimentos adicionais. À medida que informações adicionais são obtidas, o conhecimento relacionado aos procedimentos analíticos deve ser ativamente gerenciado durante todo o ciclo de vida do produto (ICH Q14, 2023).

3.2.5. Delineamento Experimental

O delineamento experimental (DOE) é uma abordagem sistemática multivariada baseada em dados científicos e estatísticos que permitem a compreensão das interações entre as variáveis de entrada e suas relações com as variáveis de saída. Essa abordagem leva a uma

variação nos fatores discretos ou contínuos controlados, obtendo assim um efeito nas respostas, como se observa no fluxograma da Figura 2 (SOBRAL, 2020).

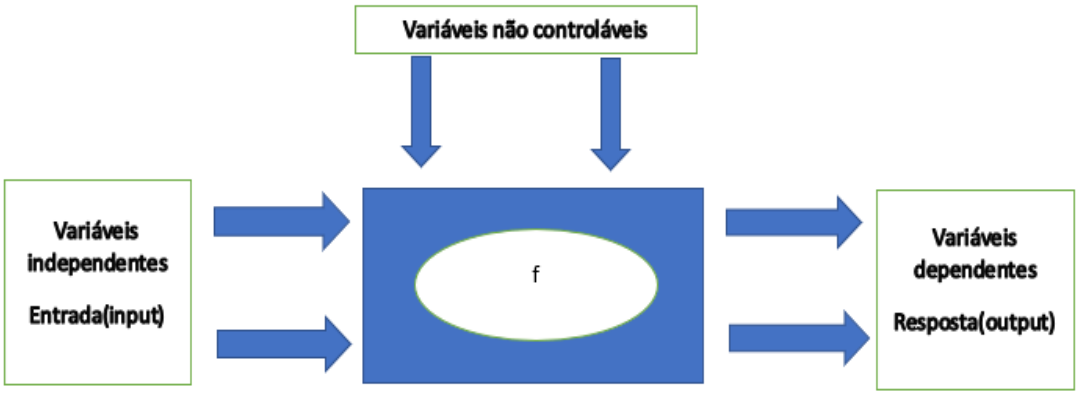

Figura 2. Fluxograma de modelo geral de aplicação de DOE.

Fonte: Sobral,2020 (adaptado).

Assim, pode-se determinar quais são as variáveis dependentes com maior influência e, garantir que os resultados das variáveis independentes estão inseridos no intervalo de especificação, assegurando assim uma variabilidade mínima (SOBRAL, 2020).

O Quadro 4, mostra uma lista de variáveis de entrada e saída comumente encontradas em métodos de cromatografia líquida em coluna.

Quadro 4. Variáveis de entrada e saída comumente encontradas em métodos de cromatografia líquida em coluna.

Técnica	**Variáveis de entrada**	**Variáveis de saída**
HPLC/UPLC/ LC-MS	Proporção da fase móvel, modificador orgânico, pH da fase móvel, força do tampão, fluxo da fase móvel, volume de injeção, tipo de coluna, dimensão da coluna, tempo de sonicação, composição do diluente, temperatura da coluna.	Área de pico, tempo de retenção, número de pratos teóricos, fator de assimetria, fator de capacidade, resolução de pico, tempo de retenção relativo, teor.

Fonte: BEG *et al.*, 2021 (adaptado).

O DOE também tem como objetivo avaliar as interações entre os fatores, parâmetros que não são possíveis de avaliar em análise uni variada, desenvolvimentos em que só se varia um fator de cada vez mantendo os outros constantes (BENTO, 2019).

Para realização de um DOE consideram-se os seguintes passos (BENTO, 2019):

- Reconhecimento do problema para um melhor entendimento da experiência em estudo e da solução final do problema, essa etapa inclui, por exemplo pesquisa bibliográfica em farmacopeias, *Drug Master File* (DMF), dados sobre a molécula como

características físicas e químicas em bancos de dados, dados sobre as características físicas e químicas sobre a formulação, pesquisa sobre as possíveis técnicas analíticas a serem utilizadas, finalidade e alcance da metodologia a ser desenvolvida etc;

- Seleção das variáveis de resposta com base no conhecimento do item anterior;
- Seleção de fatores e as gamas nas quais esses fatores serão variados, com base em análise de risco;
- Seleção do tipo de experimento, ou seja, se é de análise exploratória ou de otimização;
- Realização dos experimentos de forma aleatória, para garantir a existência de dados independentes, e deve ser realizada a replicação de uma amostra, para avaliação do erro experimental;
- Modelação dos dados e avaliação do modelo;
- Interpretação do modelo (definir os fatores que influenciam as respostas e a combinação de fatores que identificam a zona ótima).

3.2.6. Análise Exploratória ou Triagem

O propósito desta etapa é realizar um número pequeno de experiências com um grande número de fatores para que seja possível conhecer os que causam maior impacto e suas faixas experimentais a serem utilizados na fase de otimização (BENTO, 2020).

Os delineamentos de triagem são muito usados na primeira etapa do DOE para selecionar quais os fatores mais relevantes e descartar os insignificantes. Para esse objetivo, os gráficos de Pareto são ferramentas úteis que permitem colocar os fatores e suas interações em ordem de importância. (MOREIRA, 2019).

Os delineamentos de triagem mais utilizadas são: Fatorial Fracionado, Fatorial Completo (2 níveis) e Plackett-Burman, que devem ser escolhidos de acordo com o número de variáveis envolvidas na investigação, conforme os critérios da Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de DOE para cada situação.

Delineamento	Tipo de fatores	Número	Resolução	Nº de experimentos
Fatorial completo (2 níveis)	Numérico Texto	$2 \leq k \leq 5$	-	2^k
Fatorial fracionado (2 níveis)	Numérico Texto	> 4	III ou >	2^{k-p}
Plackett-Burman	Numérico Texto	N-1	III	N (múltiplo de 4)

k = número de fatores; p =número do fracionamento; Res = resolução.

Fonte: Moreira, 2019 (adaptado).

Os delineamentos fatoriais completos de dois níveis são as ferramentas de triagem mais poderosas, pois permitem estimar os efeitos principais dos fatores e a interação destes sobre as respostas. Sua maior desvantagem é o grande número de experimentos necessário, quando comparados com delineamentos fatoriais fracionados ou Plackett-Burman (MOREIRA, 2019). A Figura 3, mostra a representação gráfica de planejamentos fatoriais completos.

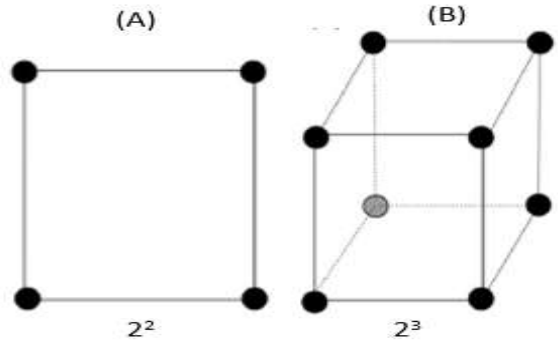

Figura 3. Representação gráfica de planejamentos fatoriais completos. A- Dois fatores, dois níveis (2^2); B-Três fatores, dois níveis (2^3).
Fonte: Sobral, 2020 (adaptado).

Os delineamentos fatoriais fracionados são os mais amplamente utilizados para triagem, pois permitem a avaliação de um grande número de fatores com um número reduzido de experimentos (MOREIRA, 2019). A Figura 4 mostra a representação gráfica de planejamentos fatoriais fracionados.

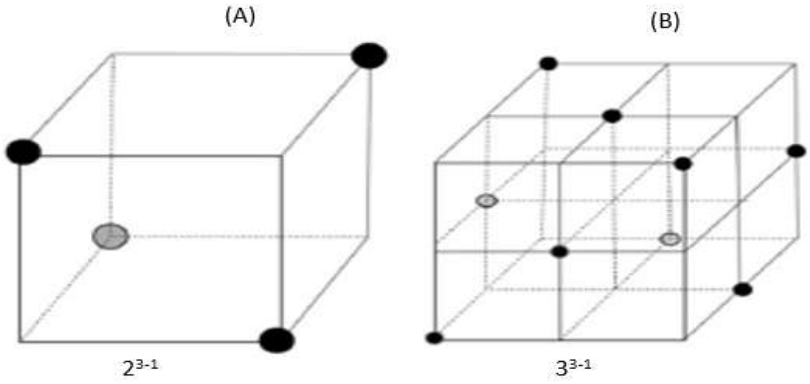

Figura 4. Representação gráfica de planejamentos fatoriais fracionados. (A) Planejamento Fatorial Fracionado 2^{3-1}; (B) Planejamento Fatorial Fracionado 3^{3-1}.
Fonte: Sobral, 2020.

Se o número de fatores for > 4, os delineamentos fatoriais fracionados são mais indicados, mas alguns efeitos podem ser confundidos, então, é preciso atenção especial a esse ponto. Os delineamentos fatoriais fracionados com resolução V podem apresentar os efeitos

principais confundidos com interações de 4ª ordem e interações de 2ª ordem com interações de 3ª ordem. Em delineamentos fatorais fracionados com resolução IV, os efeitos principais podem ser confundidos com interações de 3ª ordem e interações de 2ª ordem podem ser confundidas com interações de 3ª ordem. Já em delineamentos fatoriais fracionados com resolução III, os efeitos principais podem ser confundidos com interações de 2ª ordem. Como pode ser exemplificado na Figura 5, em que X3 é confundido com a interação entre X1 e X2 (MOREIRA, 2019).

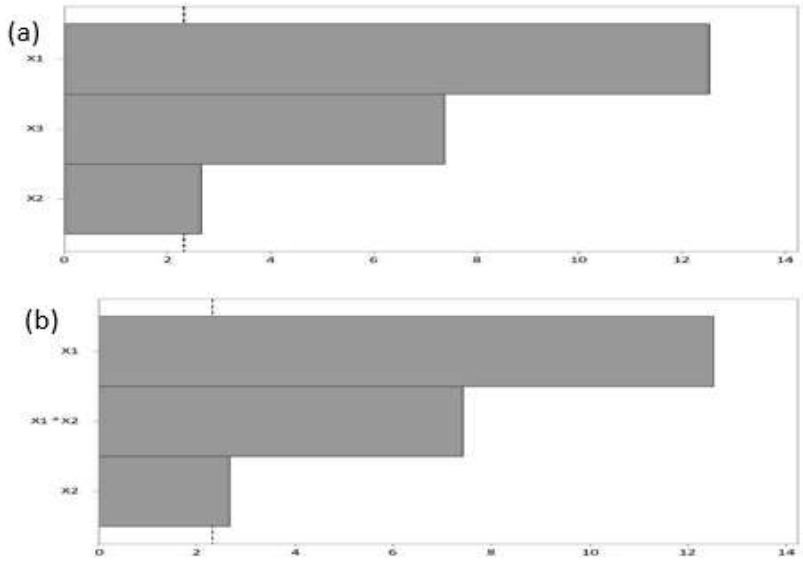

Figura 5. Gráfico de Pareto representando os efeitos principais (X1, X2 e X3) dos fatores (a) e efeitos principais (X1) e (X2) e efeitos de interação (X1*X2) dos fatores (b). Nesse caso, o efeito principal de X3 (a) é confundido com a interação X1 X2 (b).
Fonte: Moreira, 2019.

Assim, dados sobre como as variáveis de saída são afetadas pela mudança do nível do fator não são mostradas pelos gráficos de Pareto. Os gráficos fatoriais de efeitos principais e interação podem ser usados para esse fim, conforme mostra a Figura 5. Nesse exemplo, a variável de saída cresce alterando o fator X1 de baixo para alto (Figura 5a). Além do mais, a resposta aumenta significativamente alterando o fator X1 de baixo para alto com o fator X2 fixo no nível baixo (linha preta), enquanto a resposta fica quase fixa variando o fator X1 de baixo para alto com o fator X2 fixo no nível alto (linha cinza) (Figura 5b). Assim, os gráficos fatoriais de efeitos de interação também são importantes para detectar sinergismo ou antagonismo entre fatores e respostas. A Figura 6, também mostra esse tipo de interação (MOREIRA, 2019).

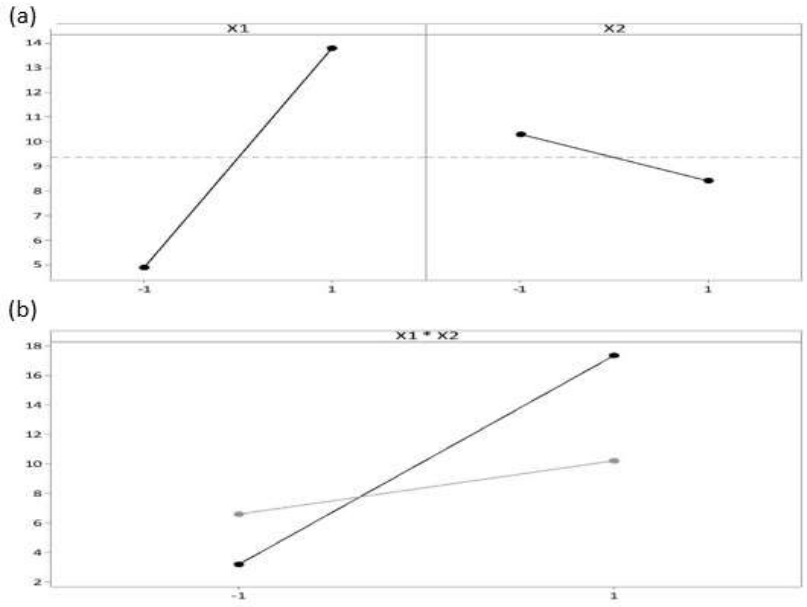

Figura 6. Gráfico fatorial de efeitos principais (a) e interações (b) dos fatores X1 e X2.
Fonte: Moreira, 2019.

Os planejamentos de experimentos de Plackett-Burman (PBD) são tipos especiais de delineamentos fatoriais fracionados de 2 níveis e resolução III, que permitem avaliar até n-1 fatores com n experimentos, onde n precisa ser múltiplo de 4 e possibilita avaliar um grande número de fatores com um pequeno número de experimentos (MOREIRA, 2019).

O Plackett-Burman (PBD) é uma opção ao experimento fatorial completo ou delineamento fracionário com baixa resolução. Este tipo de planejamento possui resolução III e exibe um alto grau de aliases (interação entre as variáveis). Porém, é uma abordagem útil quando o interesse está apenas no efeito principal dos fatores. Por isso não deve ser usado para avaliar o efeito das interações entre os fatores. Já no caso dos projetos fatoriais, o PBD também possui dois níveis para cada fator. Neste tipo de delineamento, o número de experimentos n é igual ao 1º múltiplo de 4 maior que k. Então, n experimentos podem ser usados para um número diferente de fatores, até n – 1, por exemplo, até 7 fatores podem ser estudados com 8 experimentos, até 11 fatores com 12 experimentos e assim por diante. A construção da matriz experimental para um PBD baseia-se na permutação cíclica da primeira linha. A próxima linha será formada pelo deslocamento cíclico da linha anterior para a direita. O processo continuará até várias linhas iguais ao número de experimentos a serem realizados menos 1, são gerados. Finalmente, o último passo é adicionar uma linha de nível baixo para todos os fatores do design. Assim, cada fator é igualmente investigado nos níveis baixos e altos (BREITKREITZ *et al.*, 2023). O Quadro 5, mostra quando aplicar cada tipo de planejamento experimental.

Quadro 5. Quando aplicar cada tipo de desenho experimental.

DOE		Tipo de planejamento	Benefícios do planejamento	Desvantagens do planejamento	Nº de variáveis e/ou fundamento para uso
1		Fatorial completo	Identificação de efeito principal e interação efeito sem alias.	Maior número de experimentos	2 a 5 variáveis, triagem/ otimização de variáveis
2		Fatorial fracionado/ Método de Tagushi	Requer número menor de Experimentos.	Confusão na resolução dos efeitos das interações.	Triagem ou otimização
3		Box-Behnken	Os pontos do experimento caem dentro da região de planejamento.	Dois fatores projeto não são avaliados	Para utilização para três níveis de cada fator (-1, 0, +1)
4		Plackett-Burman	Requer menos variáveis.	Não mostra *insights* sobre as interações dos efeitos	Triagem/ou identificação de poucos fatores críticos em um grande número de variáveis

Fonte: BEG *et al.*, 2021 (adaptado).

3.2.7. Análise de Otimização

Depois de realizados os experimentos de triagem, o desenvolvimento segue para a etapa de otimização. Nessa etapa o objetivo é otimizar os experimentos com base nos resultados até então obtidos. O Quadro 6, mostra os principais tipos de planejamento experimental utilizados em AQbD para a etapa de otimização.

Quadro 6. Tipos de DOE mais comuns para otimização.

Delineamento	Tipo de fatores	Níveis	Número de experimentos
Central composto (CCD)	Numérico Texto	5	$2^k + 2k + Cp$
Box-Behnken (BBD)	Numérico Texto	3	$2k(k-1) + Cp$
Fatorial completo (3 níveis)	Numérico Texto	3	3^k
Fatorial completo (4 níveis)	Numérico Texto	4	3^4

Onde, k = número de fatores Cp: ponto central

Fonte: Moreira, 2019 (adaptado).

No processo de otimização, diferentes abordagens são empregadas para a derivação de uma relação matemática, ou seja, modelo. O número total de variáveis de entrada, informações

sobre parâmetros controlados e uma compreensão da ligação entre variável e resultado são consideradas ao selecionar uma ferramenta DOE. A interpretação da interação e contribuição das variáveis em respostas baseia-se em conhecimentos sólidos de estatística. Isto permite ainda uma seleção das variáveis em seus níveis ótimos. Exemplos incluem seleção da ferramenta Plackett-Burman no caso de estudar um grande número de entradas. Planejamento fatorial fracionário ou outros desenhos são empregados para menor número de ensaios ou execuções experimentais em comparação com experimentos fatoriais completos. Contudo, a resolução das interações confundidas também é de grande importância. Essas ferramentas e o a justificativa da seleção está descrita no Quadro 5 (BEG et al., 2021).

Os delineamentos fatoriais completos de 3 níveis, delineamento composto central e delineamento Box-Behnken (BBD) são os delineamentos de otimização mais usados, pois permitem modelar superfícies respostas complexas. Uma das limitações mais importantes dos delineamentos de triagem é que eles permitem somente modelar a superfície resposta linear (1ª ordem), pois consideram apenas dois níveis para cada fator. Já os delineamentos de otimização usam de 3 a 5 níveis para cada fator, o que possibilita a modelagem da superfície resposta de 2ª ordem (quadrática) (MOREIRA, 2019).

No entanto, devido ao aumento do número de experimentos necessários, eles geralmente são usados para estudar um número reduzido de fatores, como pode ser visto no Quadro 6.

Utiliza-se o Desenho Composto Central (CCD) para respostas não lineares que necessitam de modelos de segunda ordem. O CCD contém embutido um Desenho Fatorial Completo 2^k (FFD) ou um Desenho Fatorial Fracionado 2^{k-r} (FrFD), aumentado com um grupo de pontos estrela (2k) e um ponto central (Cp). O número total de combinações de fatores em um CCD é dado por 2k + 2k + Cp (Figura 7) (BENTO, 2019).

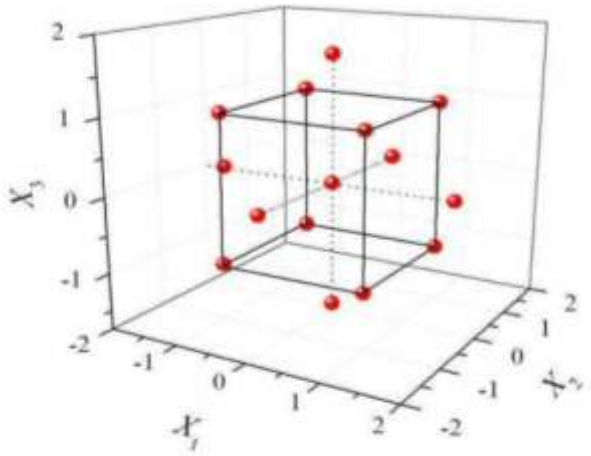

Figura 7. Desenho composto central com dois níveis e três variáveis.
Fonte. Almeida, 2017.

O Desenho Box-Behnken (BBD) requer apenas três níveis para cada fator, ou seja, 3^k. É uma alternativa econômica ao CCD. Além disso, o BBD não contém pontos nos vértices da região cúbica, isso pode ser vantajoso quando esses pontos representam níveis dos fatores que são impossíveis de serem testados. A Figura 8, mostra Desenho Box-Behnken com três fatores.

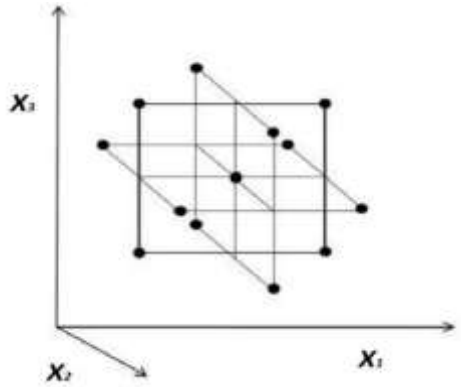

Figura 8. Exemplo da aplicação de Box-Behnken Design.
Fonte: Sobral, 2020.

O BBD é caracterizado por apreciáveis propriedades estatísticas. Na verdade, é rotativo e definido como quase ortogonal: a covariância entre os coeficientes é zero para a maioria dos termos e muito próxima de zero para os outros. Este design é mais eficiente do que seus designs 3^k correspondentes e também é ligeiramente mais eficiente que o CCD (BREITKREITZ *et al.*, 2023).

No BBD, no mínimo três fatores são explorados em três níveis (-1, 0, +1) e a matriz experimental é facilmente construída. Por exemplo, a matriz para um fator de três design (12 pontos mais o ponto central) é composta por três blocos de quatro experimentos, nos quais uma variável é fixada no nível 0 e as demais têm a característica de alternância de sinais de um experimento fatorial completo de dois níveis e dois fatores. Os pontos experimentais estão localizados em uma hiper esfera equidistante do ponto central (BREITKREITZ *et al.*, 2023).

O BBD tem sido amplamente aplicado, entretanto, sua aplicação ainda é muito menor em comparação ao CCD. Outra vantagem do BBD é que ele não contém nenhuma execução para a qual todos os fatores estão simultaneamente em seus níveis mais altos ou mais baixos. Portanto, é um design adequado quando resultados insatisfatórios podem ocorrer nos pontos extremos do domínio do experimento. No entanto, deve-se ter cautela se o ótimo teórico cair naquelas regiões que o modelo obtido pode não o represente adequadamente (BREITKREITZ *et al.*, 2023).

Em um planejamento fatorial completo 2^3, cada efeito é uma combinação linear de oito valores, com coeficientes ±1/4. Os efeitos são calculados num fatorial 2^3 e também podem ser interpretados como contrastes geométricos. Com três fatores em vez de dois, a figura básica será um cubo, e não mais um quadrado como no desenho fatorial completo 2^2 utilizado para triagem. Os oito ensaios da matriz de planejamento correspondem aos vértices do cubo (Figura 9). Os efeitos principais e as interações de dois fatores são contrastes entre dois planos. Os outros ensaios estão na face oposta, que corresponde ao nível superior. O efeito principal do fator 1 é, portanto, o contraste entre essas duas faces do cubo, como mostra a Figura 9(a). Os outros dois efeitos principais também são contrastes entre faces opostas e perpendiculares ao eixo da variável correspondente. As interações de dois fatores, por sua vez, são contrastes entre dois planos diagonais, perpendiculares a um terceiro plano definido pelos eixos das duas variáveis envolvidas na interação, como mostra a Figura 9 (b) (NETO *et al.*, 2010).

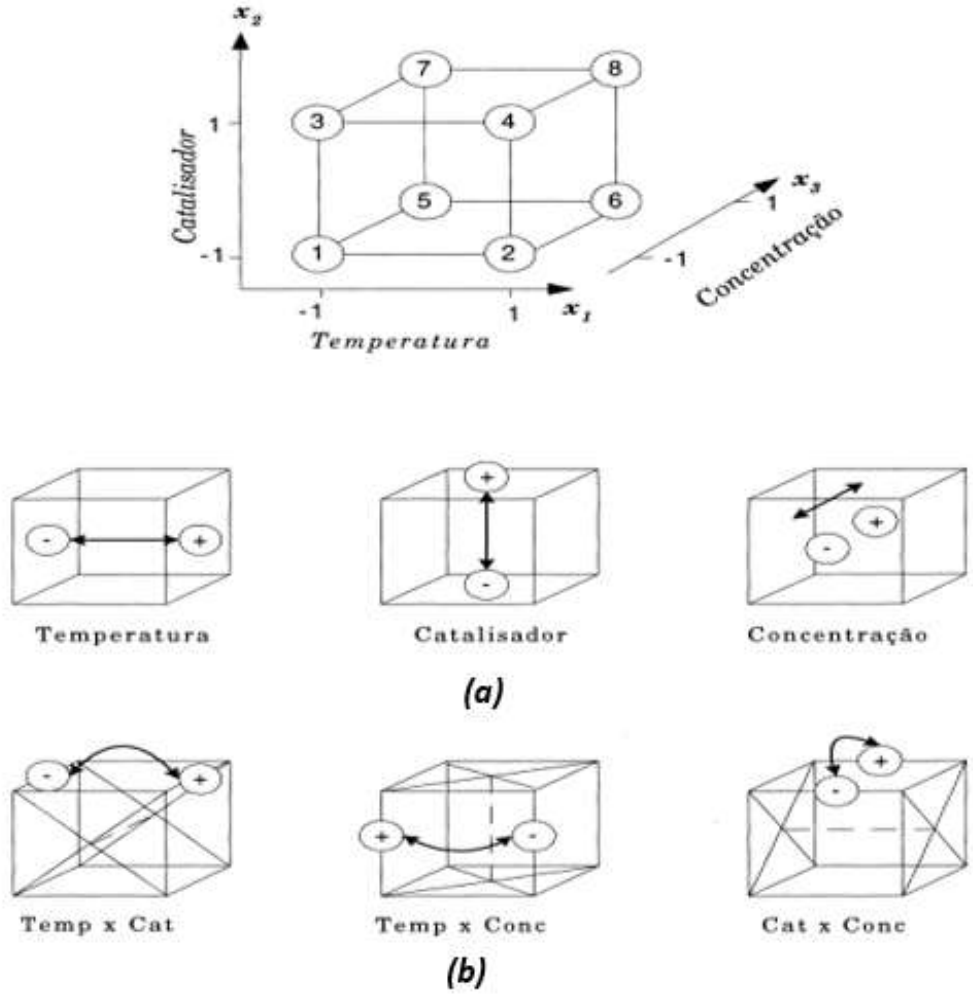

Figura 9. Interpretação geométrica dos efeitos num planejamento 23. Os efeitos principais são contrastes entre faces opostas (a), e os efeitos de interação são contrastes entre planos diagonais (b).

Fonte: Neto *et al.*, 2010.

No desenho fatorial completo de 4 níveis, ou seja, o número total de ensaios sobe para 16. Os resultados obtidos nos experimentos, podem ser obtidos sem repetições. Com eles podemos calcular, além da média global, quinze efeitos: quatro efeitos principais, seis interações de dois fatores, quatro interações de três fatores e uma interação de quatro fatores. Se os experimentos não forem feitos com repetições haverá a desvantagem de não poder estimar o erro experimental da forma que geralmente é feito.

A medida que o número de fatores aumenta, o modelo matemático também aumenta, incluindo cada vez mais termos. Com dois fatores, há apenas dois efeitos principais e uma interação. Com três, o modelo inclui uma interação de três fatores. Agora, com quatro fatores, o modelo precisa de dezesseis termos, sendo o último deles a interação de quatro fatores. Com k fatores, o modelo completo teria de continuar até a interação de todos os k fatores, como a expansão de uma função numa série de potências.

Vamos imaginar agora que a superfície de resposta, isto é, a relação entre a resposta e os fatores na região que estamos investigando, seja suave o bastante para que pequenas variações nos fatores não causem variações abruptas na resposta. Sendo assim, podemos esperar que os coeficientes do modelo obedeçam a uma certa hierarquia, com os termos de ordem mais baixa mostrando-se mais importantes que os de ordem mais alta. Esperamos que os efeitos principais sejam mais importantes na formulação do modelo do que, digamos, a interação de quatro fatores.

Em geral, podemos esperar que a importância de uma interação para um modelo decresça com o número de fatores envolvidos na sua definição. Não poderemos obter um modelo satisfatório da nossa superfície de resposta com um número finito de termos (NETO *et al.*, 2010). A Figura 10, mostra a representação geométrica dos tipos de desenhos experimentais mais utilizados para experimentos de triagem e/ou otimização.

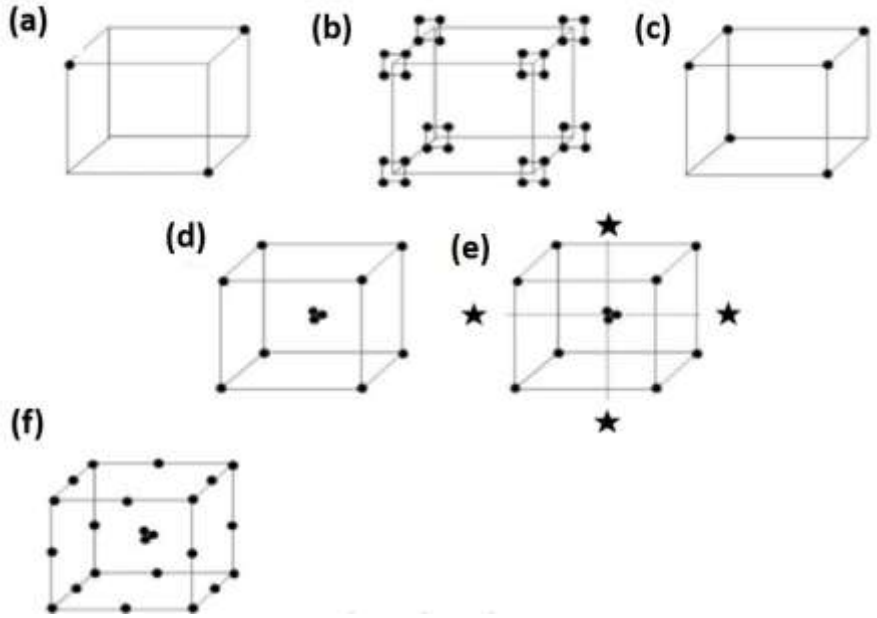

Figura 10. Representação geométrica de diversos tipos de planejamento: (a) fatorial fracionado, (b) Taguchi, (c) Plackett-Burman, (d) Fatorial completo, (e) Composto central, (f) Box-Behnken.
Fonte: BEG *et al.,* 2021.

3.2.8. Blocagem em Planejamentos Fatoriais

O termo bloco refere-se a uma unidade experimental relativamente homogênea, e o bloco representa uma restrição à randomização completa porque as combinações de tratamento são randomizadas apenas dentro do bloco (MONTGOMERY, 2010).

A blocagem é um dos princípios fundamentais da boa técnica experimental. Usando a blocagem, fazemos o fator de interesse variar apenas dentro de blocos, e com isso excluímos o efeito do outro fator nas nossas considerações. A blocagem pode ser empregada em planejamentos fatoriais. Imagine que decidimos realizar um planejamento fatorial 2^3, mas não temos matéria prima bastante para fazer todos os 8 ensaios. Para completar o planejamento, precisamos adquirir um novo lote de material, talvez até de um fornecedor diferente. Isto, é claro, introduz mais um possível fator de variação, que precisa ser levado em conta para que as conclusões da nossa investigação não saiam distorcidas. Usando a blocagem, fazemos o fator de interesse variar apenas dentro de blocos, e com isso excluímos o efeito do outro fator nas nossas considerações. Essa técnica pode também ser usada para evitar confusão. Na blocagem, sabe-se desde o início que os fatores podem influenciar o resultado, só que pode não haver interesse no efeito deles, e isso é levado em conta na hora de definir o planejamento, de forma a evitar ou minimizar confusão (NETO *et al.,* 2010).

A blocagem pode ser usada para minimizar as chances de resultados experimentais serem influenciados por variações de turno para turno, de dia para dia, de analista para analista, de lote para lote, de fabricante para fabricante etc. Dividindo suas execuções experimentais em blocos homogêneos e depois calculando aritmeticamente removendo a diferença, você aumenta a sensibilidade do seu experimento. Não bloqueie qualquer coisa que você queira estudar. Por exemplo, se você quiser medir a diferença na qualidade dos materiais fornecidos por três fornecedores, então você tem que incluir 'fornecedor' como um fator em seu experimento. A blocagem deve sempre ser usada quando ocorrer a possibilidade de que uma ou mais interações sejam confundidas; no entanto, uma boa escolha de bloqueio deve garantir que seja uma interação de ordem superior (uma que seria difícil de interpretar ou que não se espera que seja importante) isto é, que causa confusão (JIJU, 2023).

Como exemplo ilustrativo, imagine que um metalúrgico deseja melhorar a resistência de um determinado componente de aço. Quatro fatores em 2 níveis cada um foi considerado para o experimento. Um experimento de oito tentativas foi escolhido, mas foi possível realizar apenas quatro ensaios experimentais por dia. Portanto, cada dia foi tratado como um bloco separado, com o objetivo de reduzir a variação dia-a-dia. É importante que os ensaios experimentais dentro do bloco sejam tão homogéneos quanto possível (JIJU, 2023).

3.2.9. Resolução de Projeto

A resolução de projeto (R), é uma característica resumida de padrões de alias ou confusão. O grau em que os efeitos principais são confundidos com os efeitos de interação (dois fatores ou superior) é representado pela resolução do dimensionamento correspondente. Obviamente, não preferimos que os efeitos principais sejam confundidos com outros efeitos principais. O projeto tem resolução R se nenhum efeito do fator p for confundido com outro efeito contendo menos que (R - p) fatores. Para experimentos planejados, projetos de resolução III, IV e V são particularmente importantes. A resolução do projeto identifica para um projeto específico a ordem de confusão dos principais efeitos e suas interações. É uma ferramenta fundamental para determinar quais valores fracionários o planejamento fatorial será a melhor escolha para um determinado problema (JIJU, 2023).

Projetos de Resolução III: São desenhos nos quais nenhum efeito principal é confundido com qualquer outro efeito principal, mas os efeitos principais são confundidos com interações de dois fatores e interações de dois fatores podem ser confundidas entre si. Por exemplo, estudando três fatores ou parâmetros de processo em 2 níveis em quatro testes ou

execuções é um projeto de resolução III. Neste caso, cada efeito principal é confundido com interações de dois fatores ou de segunda ordem (JIJU, 2023).

Projetos da Resolução IV: São projetos nos quais nenhum efeito principal é confundido com qualquer outro efeito principal ou com quaisquer efeitos de interação de dois fatores, mas interação de dois fatores e dois efeitos são confundidos entre si. Por exemplo, estudar quatro fatores ou parâmetros em 2 níveis em oito tentativas ou execuções é um projeto de resolução IV. Neste caso, cada interação de dois fatores é confundida com outras interações de dois fatores (JIJU, 2023).

Projetos de Resolução V: São projetos nos quais os efeitos principais não são confundidos com outros efeitos principais, interações de dois fatores ou interações de três fatores, mas interações são confundidas com interações de três fatores. Por exemplo, estudando 5 fatores ou parâmetros de processo em 2 níveis em 16 testes ou execuções é um projeto de resolução V. Nesse caso, cada interação de dois fatores é confundida com interações de três fatores ou de terceira ordem (JIJU, 2023).

3.2.10. Randomização

O objetivo da randomização é evitar que preconceitos sistemáticos e pessoais sejam introduzidos no experimento pelo experimentador. Uma atribuição aleatória de assuntos ou material experimental para tratamentos antes do início do experimento garante que as observações que são favorecidas ou adversamente afetadas por fontes desconhecidas de variação são observações “selecionadas na sorte do sorteio” e não sistematicamente selecionado (DEAN *et al.*, 2015).

A falta de uma atribuição aleatória deixa o procedimento aberto ao preconceito experimental. Por exemplo, um horticultor pode atribuir a sua variedade favorita de colheita experimental para as partes do campo que parecem mais férteis, ou um médico pode atribuir seu medicamento preferido aos pacientes com maior probabilidade de responder bem. A variedade preferida ou os medicamentos podem então parecer dar melhores resultados, não importa quão bons ou ruins sejam. Um delineamento completamente randomizado é o nome dado a um delineamento no qual o experimentador atribui a unidades experimentais aos tratamentos de forma completamente aleatória, sujeito apenas ao número de observações a serem tomadas em cada tratamento (DEAN *et al.*, 2017).

3.2.11. Aliases e Confusão

Ao escolher um modelo a priori para um experimento, você assume implicitamente que este modelo é adequado para descrever o sistema que você está estudando. Contudo, é impossível para saber com certeza que isso é verdade. Por exemplo, em muitos experimentos de triagem os investigadores desejam manter o número de execuções próximo ao mínimo para se ajustar a um modelo de efeitos principais. Para fazer isso, eles assumem que as interações de dois fatores são insignificantes. Contudo, pode acontecer que uma ou mais interações de dois fatores sejam tão grandes quanto os efeitos principais. Se este for o caso, e as grandes interações de dois fatores não estiverem incluídas no modelo, então sua existência no sistema físico pode distorcer as estimativas dos principais efeitos (GOOS *et al.*, 2011).

O termo confusão refere-se à combinação de influências de dois ou mais efeitos de fator em um efeito medido. Em outras palavras, não se pode estimar efeitos de fator e seus efeitos de interação de forma independente. Efeitos que são confundidos são chamados de aliases. Uma lista de confusões que ocorrem em um o projeto experimental é chamada de estrutura de alias ou padrão de confusão (JIJU, 2023).

3.2.12. Parâmetros de Avaliação de Modelos Matemáticos e Gráficos

Existem diferentes autores com diferentes perspectivas sobre a avaliação de modelos quimiométricos, aqui será mostrado os principais parâmetros de avaliação descritos na literatura, e mais comuns na rotina de planejamento de experimentos.

Coeficiente de Correlação - O coeficiente de correlação (R^2) indica a percentagem da variação da resposta; é uma medida de ajuste que avalia quão bem o modelo se ajusta aos dados. O valor de R^2 varia entre 0 e 1, obtendo-se o valor 1 quando o modelo se ajusta perfeitamente aos dados (BENTO, 2019).

O R^2 representa a porcentagem de variação na resposta que é explicada pelo modelo. É calculado como 1 menos a razão da soma dos quadrados dos erros (variação não é explicada pelo modelo) para a soma total dos quadrados (variação total no modelo). O R^2 aumenta quando você adiciona mais preditores a um modelo (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Coeficiente de Correlação Ajustado - O coeficiente de correlação ajustado (R^2Aj) representa a porcentagem de variação na resposta que é explicada pelo modelo, ajustada para o número de preditores do modelo em relação ao número de observações. O R^2 ajustado é

calculado como 1 menos a razão entre o quadrado médio do erro em relação ao quadrado médio total (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Coeficiente de Previsão - Coeficiente de previsão (Q^2) indica a capacidade de previsão do modelo, ou seja, é uma medida que informa quão bem o modelo prevê novos dados. O valor de Q^2 deve ser maior que 0,5 para apresentar um bom modelo; a diferença entre o R^2 e o Q^2 deve ser menor que 0,3 (BENTO, 2019).

Valor-P - O valor-p é uma probabilidade que mede a evidência contra a hipótese nula. Valores baixos de valor-p fornecem evidências mais fortes contra a hipótese nula. Para determinar se o modelo explica a variação em uma variável de saída, compare o valor-p do modelo com o seu alfa para avaliar a hipótese nula. A hipótese nula para o modelo é que o modelo não explica nenhuma mudança na resposta. Um nível de significância (α ou alfa) de 0,05 funciona bem. Um nível de significância de 0,05 aponta um risco de 5% de concluir que o modelo explica a alteração na resposta quando isso não acontece (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Nos casos de avaliação dos modelos, um valor-p ≤ α: o modelo explica a variação na resposta. Se valor-p > α: não há evidências suficientes para concluir que o modelo explica a variação na resposta (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Na avaliação dos coeficientes de uma equação de regressão, o raciocínio é o mesmo, se valor-p ≤ α na tabela de coeficientes para uma variável de entrada, ao avaliar uma variável de saída, então a alteração desta variável de entrada apresenta alteração estatisticamente significante na variável de saída (resposta). Numa avaliação de coeficientes dos modelos matemáticos de regressão por exemplo, cada vez que os fatores ficam menores que alfa, mais poder de predição terá a equação de regressão (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Na análise de variância também o raciocínio é o mesmo, para saber quais as variáveis de entrada alteram a variável de saída, basta verificar na tabela de ANOVA as variáveis de entrada com valor-p ≤ α (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Nas análises de DOE pode-se afirmar que se valor-p ≤ α, diferentes condições alteram a resposta. Se valor-p > α, não há evidências suficientes para concluir que as diferentes condições alteram a resposta (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Valor-F - O valor-F, pode ser usado para calcular o valor-p, que pode ser usado para a tomada de uma decisão sobre a significância estatística do teste. As probabilidades inferiores fornecem evidências mais fortes contra a hipótese nula. Um valor-F suficientemente grande indica significância estatística. Para usar o valor-F para determinar se deve rejeitar a hipótese nula, é preciso comparar o valor-F com o seu valor crítico (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Graus de Liberdade - Graus de liberdade (GL ou DF). O total de graus de liberdade corresponde a quantidade de informações em seus dados. A análise usa essas informações para estimar os valores dos parâmetros da população desconhecidos. Os DF totais são determinados pelo número de observações em sua amostra. Os DF de um termo mostram quanta informação aquele termo usa. Aumentar o tamanho amostral fornece mais informações sobre a população, o que aumenta os DF totais. Aumentar o número de termos em seu modelo usa mais informações, o que diminui os DF disponíveis para estimar a variabilidade das estimativas de parâmetros (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Validade do Modelo - O *plof*, é o valor de p do teste de *lack-of-fit* e o valor 0,57647 é selecionado de modo que *plof* ≥ 0,05 dê uma validade do modelo ≥ 0,25. Um valor de validade do modelo menor que 0,25 indica problemas de falta de ajuste do modelo estatisticamente significativos (o erro do modelo é maior que o erro puro). Um valor de 1 representa um modelo perfeito (BENTO, 2019).

A validade do modelo é calculada como,

$$Validade\ do\ modelo = 1 + 0{,}57647 log10(plof) \qquad \text{Equação 1}$$

Reprodutibilidade - A reprodutibilidade representa a variação da resposta sob as mesmas condições (erro puro), muitas vezes, a partir dos pontos centrais (replicados 3 vezes), em comparação com a variação total das respostas. O valor da reprodutibilidade deve ser superior a 0,5 (BENTO, 2019).

Teste de Significância da Regressão Linear - O teste de significância da regressão linear - o teste satisfaz, isto é, o modelo é eficaz, quando o valor de probabilidade (p) é inferior a 0,05 (BENTO, 2019).

Teste de Lack of Fit - O Teste de *lack of fit* (LOF), compara o erro do modelo com o erro puro (através de réplicas) e satisfaz quando p ≥ 0,05 (BENTO, 2019). Uma análise de variância (ANOVA) é frequentemente acompanhada por uma estatística de validação de modelo chamada teste de falta de ajuste (LOF). Um teste de LOF estatisticamente significativo frequentemente preocupa os experimentadores porque indica que o modelo não se ajusta bem aos dados (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

A fórmula LOF é:

$$\mathrm{L}OF(Lack\ of\ Fit\ F-test) = \frac{Lack\ os\ FIT\ MS}{Pure\ Error\ MS} \qquad \text{Equação 2}$$

onde, MS = Quadrado Médio. O numerador (“Falta de ajuste”) nesta equação é a variação entre as medições reais e os valores previstos pelo modelo. O denominador (“Erro Puro”) é a variação entre quaisquer réplicas. A variação entre as réplicas deve ser uma estimativa da variação normal do processo do sistema. Falta significativa de ajuste mostra que a variação dos pontos de projeto sobre seus valores previstos é muito maior do que a variação das réplicas sobre seus valores médios. Ou o modelo não prevê bem, ou as execuções replicam tão bem que sua variância é pequena, ou alguma combinação dos dois (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Coeficiente de Correlação Predito - O coeficiente de correlação predito (R^2(pred)), é calculado com uma fórmula que é equivalente à remoção sistemática de cada observação do conjunto de dados, estimando a equação de regressão e determinando se o modelo faz (ou não) uma boa predição da observação removida. O valor do R^2 predito varia entre 0% e 100%. Use R^2 predito para determinar o quão bem seu modelo prediz as respostas para novas observações. Modelos que têm valores de R^2 predito mais elevado têm melhor capacidade preditiva.

Um R^2 predito que é substancialmente menor que o R^2 pode indicar que o modelo está com excesso de ajuste. Um modelo com excesso de ajuste ocorre quando você adiciona termos para efeitos que não são importantes na população. O modelo se adapta aos dados de amostra e, por conseguinte, pode não ser útil para fazer predições em relação à população. O R^2 previsto também pode ser mais útil do que o R^2 ajustado para a comparação de modelos, porque ele é calculado com as observações que não estão incluídas no cálculo do modelo. Por exemplo, um analista de uma empresa de consultoria financeira desenvolve um modelo para prever as condições futuras do mercado. O modelo parece promissor porque tem um R^2 de 87%. No entanto, o R^2 previsto é apenas 52%, o que indica que o modelo pode ser um sobre ajuste (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Intervalo de Confiança para a Resposta - Os intervalos de confiança (IC) são faixas de valores que tendem a conter a resposta do desvio padrão da população que tem os valores observados dos preditores ou fatores no modelo. O nível de confiança do intervalo, é a porcentagem destes intervalos de confiança que contém o parâmetro (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

O Intervalo de Predição - O intervalo de predição (IP) de 95% no Minitab indica que há 95% de confiança de que uma resposta única estará dentro do intervalo, dadas as definições dos preditores especificados.

Gráfico de Pareto - O gráfico de Pareto mostra os valores absolutos dos efeitos padronizados do maior até o menor efeito, e também traça uma linha de referência para indicar

os efeitos que são significativos estatisticamente. Esta linha depende de alfa. Quando a quantidade de termos no modelo for a mesma que o número de ensaios, os efeitos padronizados não podem ser calculados (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Por ser usado por exemplo, para determinar a magnitude e a importância dos efeitos. Neste tipo de gráfico, as barras que cruzam a linha de referência são estatisticamente significativas. Como exemplo, na Figura 11, as barras que representam os fatores AB e A cruzam a linha a linha citada, que está em 2,57. Assim, os fatores A e AB têm significância estatística ao nível 0,05 com os termos do modelo atual (SUPORTE AO MINITAB®, 2024). A Figura 11, mostra um exemplo de gráfico de Pareto.

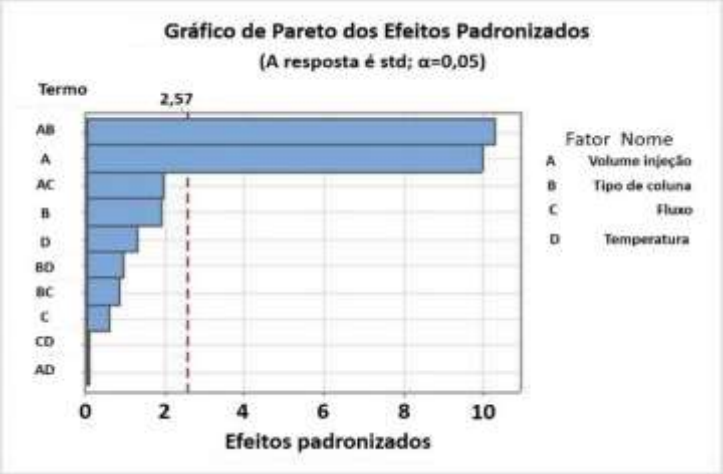

Figura 11. Exemplo de gráfico de Pareto.
Fonte: Suporte ao Minitab®, 2024.

Este tipo de gráfico mostra o valor absoluto dos efeitos, portanto, é possível determinar quais efeitos são grandes, mas não é possível determinar quais deles aumentam ou diminuem a resposta (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Gráfico Normal de Efeitos - O gráfico de probabilidade normal dos efeitos apresenta os efeitos padronizados em relação a uma linha de ajuste de distribuição, no caso em que todos os efeitos são 0. Os efeitos padronizados são estatísticas t que testam a hipótese nula de que o efeito é 0. Os efeitos positivos elevam a resposta quando as definições alteram do valor baixo do efeito principal para o alto. Os efeitos negativos diminuem a variável de saída quando as configurações mudam do valor baixo de um efeito principal para o alto. Efeitos mais afastados de 0 que estão no eixo x têm maior magnitude. Efeitos mais afastados de 0 são estatisticamente mais significativos. Em experimentos de 2 níveis, em que o número de termos no modelo é igual ao número de ensaios, os efeitos padronizados não podem ser calculados. Este tipo de

gráfico, também indica a direção dos efeitos (SUPORTE AO MINITAB®, 2024). A Figura 12 mostra um exemplo de gráfico normal dos efeitos padronizados.

Figura 12. Exemplo de gráfico normal dos efeitos padronizados.
Fonte: Suporte ao Minitab®, 2024.

Histograma de Resíduos - O histograma dos resíduos mostra a distribuição dos resíduos padronizados para todas as observações. Um histograma é mais eficaz quando você tem aproximadamente 20 ou mais pontos de dados. Em amostras muito pequenas, cada barra no histograma não contém número de dados suficientes para, com confiança, mostrar assimetria ou *outliers* (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Resíduos *Versus* Ajustes - O gráfico de resíduos *versus* ajustes representa os resíduos no eixo Y e os valores ajustados no eixo X. Este tipo de gráfico é usado para verificar a pressuposição de que os resíduos são distribuídos de forma aleatória e têm variância constante. Idealmente, os pontos devem cair de maneira aleatória em ambos os lados de 0, sem padrões reconhecíveis (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Resíduos X Ordem - Este tipo de gráfico mostra os resíduos na ordem em que os dados foram coletados. É usado para verificar se os resíduos são independentes um do outro. Resíduos independentes não mostram tendências nem padrões em função do tempo. Os padrões podem indicar que os resíduos próximos uns dos outros podem ter correlação e, portanto, não são independentes. Idealmente, os resíduos no gráfico devem cair aleatoriamente ao redor da linha central (SUPORTE AO MINITAB®, 2024).

Modelagem Matemática - No planejamento fatorial, os modelos matemáticos para estabelecer a relação fator-resposta incluem apenas os modelos lineares de primeira ordem. Aqui, um modelo matemático envolve a estimativa dos efeitos da interação linear e de dois

fatores. Os efeitos da curvatura são difíceis de estimar no planejamento fatorial devido à presença de apenas dois níveis. No entanto, o uso de pontos centrais em um planejamento fatorial completo pode sugerir potencialmente a possibilidade de curvatura. Quando a curvatura é significativa, o experimento fatorial precisa ser aumentado para um experimento de superfície de resposta. Uma equação de modelo linear com interações de dois fatores é dada na Equação 3 (BEG *et al*., 2021).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_2 X_3 + \beta_6 X_1 X_3 \qquad \text{Equação 3}$$

Onde β_0 representa o intercepto, β_1, β_2 e β_3 representam os coeficientes dos termos do modelo linear, β_4, β_5 *e* β_6 representam os coeficientes dos termos do modelo quadrático, X_1, X_2 e X_3 representam os fatores.

No projeto Placket-Burman, as técnicas de modelagem matemática para estabelecer a relação fator-resposta inclui modelos lineares de primeira ordem. A equação para o modelo matemático linear empregado no projeto Placket-Burman é mostrada na Equação 4 (BEG et al., 2021).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \ldots + \beta_n X_n \qquad \text{Equação 4}$$

Onde, β_0 representa o intercepto da equação do modelo linear, β_1 a β_n representam os coeficientes dos termos do modelo.

Um CCD pode ser particionado em dois subconjuntos de pontos, onde o primeiro subconjunto estima efeitos de interação linear e de dois fatores, enquanto o segundo subconjunto determina efeitos de curvatura. O segundo subconjunto não precisa ser executado quando a análise dos dados dos primeiros pontos do subconjunto indica a ausência de efeitos de curvatura significativos. O polinômio de segunda ordem, geralmente utilizado para projetos compostos, é dado na Equação 5 (BEG *et al*., 2021).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ij} X^2{}_i + \sum_{i<j} \sum_{j} \beta_{ij} X_i X_j \qquad \text{Equação 5}$$

Os valores de β_i, β_{ij} e β_{ii} representam os coeficientes de efeito principal, interação, e termos de segunda ordem, respectivamente. Os projetos compostos normalmente envolvem investigações de X em 5 níveis, ou seja, um ponto central (nível 0), 2 pontos fatoriais (±1 nível) e 2 pontos estrela axiais (±α níveis).

Região de Design Operável do Método (MODR) - Região de *Design* Operável do Método (MODR) do inglês, *Method Operable Design Region*, também conhecida como DS, do inglês, *Design Space*, é um componente do desenvolvimento analítico no qual designa a combinação multidimensional e interação de variáveis de entrada e parâmetros do processo analítico que proporcionam a garantia do resultado analítico, ou seja, é um teste de probabilidade onde o método é delineado em uma área onde são delimitadas as zonas de robustez (atributos críticos do método) por meios estatísticos. Para esta fase do desenvolvimento, todo o conhecimento obtido através da pesquisa bibliográfica e do planejamento do estudo são computadas para a realização dos experimentos (DA SILVA, 2021).

A MODR pode ser estabelecida no desenvolvimento do método e é usada para o estabelecimento de um espaço multidimensional correlacionando a interação dos fatores e configurações analíticas do método. A MODR pode fornecer um desempenho de método adequado uma vez que a área trabalhada é robusta e atende completamente os objetivos traçados na etapa de ATP. A MODR estabelece controles de método significativos e permite obter uma maior flexibilidade regulatória, uma vez que operar dentro dessa região não configura uma alteração de método, e, portanto, não há necessidade de validá-lo novamente. Dentro dessa região também é possível definir a robustez do método utilizando o DOE, para isso nenhum parâmetro avaliado deve ser considerado relevante para a resposta e a variação deve estar contida na MODR (DIEGO, 2021). A Figura 13, mostra uma ilustração do MODR.

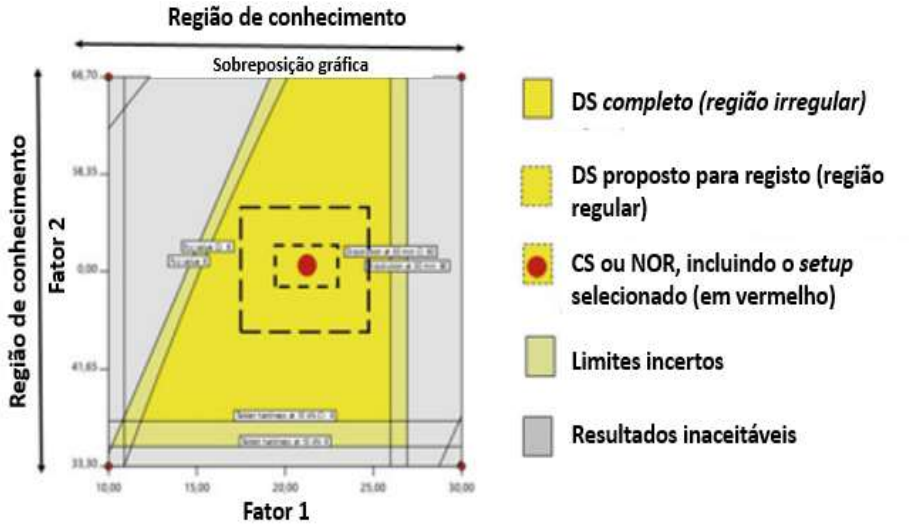

Figura 13. Ilustração do MODR ou DS (irregular), DS proposto (regular), espaço de controle (CS ou NOR), e o set point (condição escolhida).

Fonte: Breitkreitz *et al*., 2023 (adaptado).

O Ciclo de Vida do Procedimento Analítico - O desenvolvimento de procedimentos analíticos e as abordagens de gerenciamento de mudanças são descritos nesta diretriz enquanto a validação do procedimento analítico é descrita no ICH Q2. Dependendo da finalidade pretendida o procedimento analítico e a abordagem de desenvolvimento adotada, a ordem e a extensão de cada elemento pode variar e vários elementos podem ocorrer simultaneamente (ICH Q14, 2022). A Figura 14 retrata elementos do ciclo de vida do procedimento analítico relacionados ao ciclo de vida do produto.

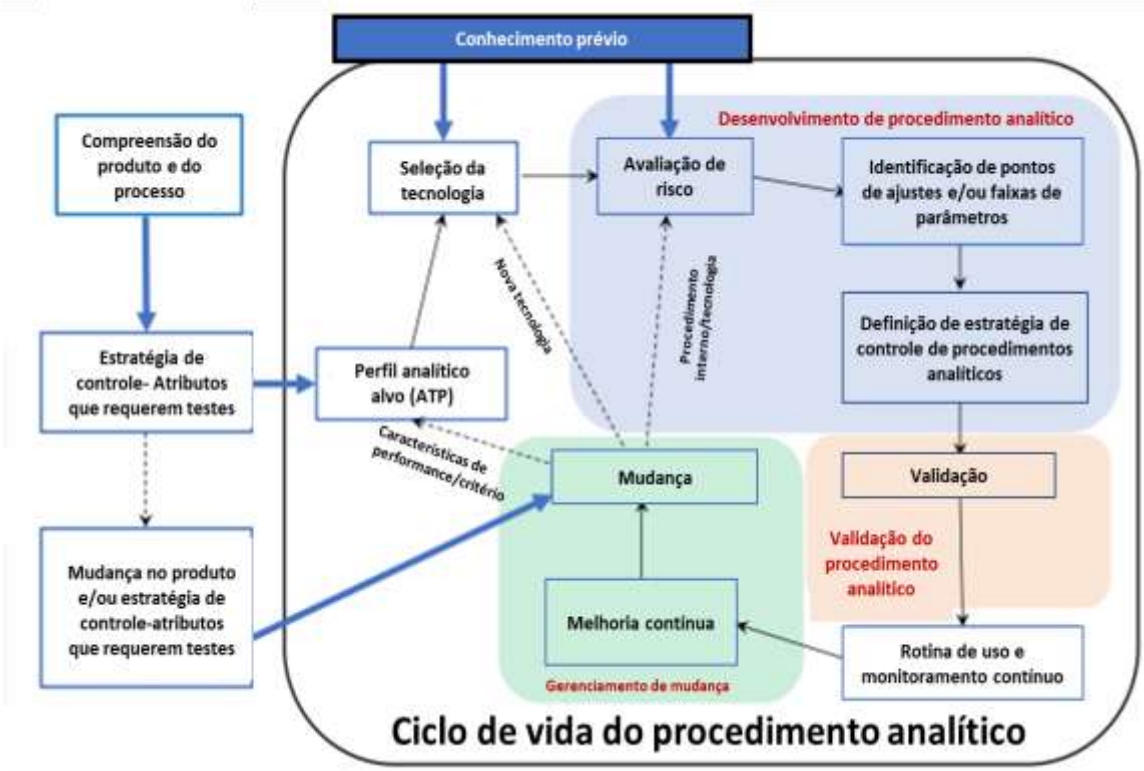

Figura 14. Ciclo de vida do procedimento analítico.
Fonte: ICH Q14, 2023.

AQbD no Gerenciamento do Ciclo de Vida do Produto - O AQbD é praticamente aplicável em todo o ciclo de vida de um produto para facilitar a flexibilidade regulatória no método analítico. Implica tratabilidade ou liberdade para alterar os parâmetros do método dentro do MODR de um método analítico. Integrando todos os elementos do AQbD, o gerenciamento analítico do ciclo de vida começa com a definição do ATP e continua até a aplicabilidade do método no desenvolvimento do produto e além, durante a avaliação do controle de qualidade para testes de liberação de lote. A confirmação resultante em relação ao ATP é o foco principal para qualificação de desempenho, por exemplo, estudo de precisão no local de uso rotineiro.

A verificação contínua envolve atividades que garantem que o método esteja sob controle durante todo o seu ciclo de vida. Uma vez estabelecido um método para uso rotineiro, o desempenho do método é monitorado ao longo do tempo para garantir a conformidade com a estrutura ATP. Gráficos de controle ou outras ferramentas podem ser usadas para rastrear dados de adequação do sistema, investigações relacionadas a métodos, etc. O monitoramento contínuo permite a identificação e resolução proativamente de qualquer desempenho fora da tendência (BEG *et al.*, 2021).

Pontos de Vista Regulatórios sobre Qualidade Analítica desde a Concepção - Os princípios do QbD giram em torno da compreensão completa de um processo, produto ou objetivo, definido antes do seu início. Os guias Q8, Q9, Q10 e Q14 do ICH, forneceram requisitos rigorosos para atender aos padrões de qualidade de um medicamento. O ICH Q8 (segunda revisão) não cobre essencialmente a perspectiva de desenvolvimento de métodos analíticos no contexto do espaço de design, ainda assim é estendida ao MODR com o propósito de melhoria contínua na robustez do método para melhor compreensão analítica (ICH Q14, 2024).

A adoção do AQbD durante o processo de fabricação como estratégia de controle garantirá, portanto, o desempenho do processo e a qualidade do produto. Prevê-se que a implementação do AQbD fortaleça a noção de "análises corretas no momento certo" com potencial significativo no desenvolvimento de medicamentos. A forte dependência do desenvolvimento e fabricação farmacêutica em dados analíticos robustos atesta o valor do desenvolvimento de métodos analíticos orientados pelo QbD como o atual domínio de foco e execução. Para garantir o desempenho contínuo de um sistema analítico e métodos associados, o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *United States Pharmacopeia National Formulary* (USP-NF) exigem obrigatoriamente que testes de adequação do sistema sejam estabelecidos para um método analítico. No entanto, as atualizações recentes da USP-NF e da Farmacopeia Europeia permitiram flexibilidade para a alteração dos métodos analíticos sem qualquer necessidade de revalidação, desde que a abordagem AQbD tenha sido implementada (BEG *et al.*, 2021).

Os atributos críticos do método possuem impacto definitivo nos parâmetros de saída devido ao elevado grau de variabilidade. Através do desenvolvimento de métodos, seria necessária uma compreensão de quais atributos do método analítico impactam o ATP. Os procedimentos operacionais padrão de validação de método analítico de uma empresa normalmente definirão os critérios de exatidão, linearidade, precisão, etc., assumindo que tais critérios sejam consistentes para todos os procedimentos de teste quantitativos. Uso de

paradigmas QbD, nesse sentido, o uso de *Quality Risck Management* (QRM), DOE e técnicas multivariadas no desenvolvimento de métodos analíticos fornece uma estrutura baseada na ciência e no risco para a compreensão crítica da variabilidade da causa raiz, melhorando assim a robustez e desempenho do método (BEG *et al.,* 2021).

O nível de detalhe nas submissões regulatórias em relação ao DOE, deve ser proporcional à importância do resultado do DOE para a seleção do design do produto, processo de fabricação comercial e estratégia de controle. As informações fornecidas nesses casos devem incluir estatísticas detalhadas sobre os modelos. Por outro lado, este nível de detalhe não é esperado para o projeto de triagem em uma fase inicial da etapa do desenvolvimento, por exemplo. A verificação do espaço de projeto em escala comercial não está necessariamente completa no momento da apresentação do pedido, mas deve ocorrem ao longo do ciclo de vida do produto e do processo. Verificação inicial do espaço de projeto em a escala comercial geralmente ocorre apenas nas faixas operacionais alvo ou perto delas (BREITKREITZ *et al., 2*023).

Estratégia de Controle - A estratégia de controle é um conjunto planejado de controles derivados do entendimento atual do produto e do processo que garante desempenho do processo e qualidade do produto. Os controles podem incluir parâmetros e atributos relacionados a substâncias medicamentosas, materiais e componentes de produtos medicamentosos, condições de operação das instalações e equipamentos, controles em processo, especificações do produto acabado e os métodos associados e frequência de monitoramento e controle. A estratégia de controle é derivada do DOE e aplicada ao MODR. Representa controles em processo para cada etapa da fabricação processo, testes de produtos acabados e quaisquer outras especificações que controlem qualidade e consistência do produto (BREITKREITZ *et al.,* 2023).

Softwares Utilizados - Embora todo o desenvolvimento e validação de metodologia possa ser realizado utilizando apenas um programa simples como o *excel*, sem gastos com softwares pagos. O planejamento de experimentos com essa abordagem pode ser trabalhoso. Atualmente existem diversos *softwares* e programas de computador que facilitam muito o desenvolvimento de métodos analíticos por AQbD. O Quadro 7, mostra alguns *softwares*, programas e sites que facilitam diversas etapas do AQbD. Neste trabalho será usado o software Minitab®.

Quadro 7. Softwares, programas e sites que facilitam diversas etapas do AQbD.

Programa/*Software*/*DugBank*	**Gratuito ou pago**
Action Stat (software)	Pago
Minitatb (software)	Pago
Chromsword	Pago
Stat Easy (software)	Pago
Fusion QbD (software)	Pago
ChromsWord	Pago
Chemspider (programa)	Gratuito
Chemikalize (programa)	Gratuito
ChemicalBook (site)	Gratuito
DrugBank (site)	Gratuito

Validação de Metodologia Analítica Anvisa e ICH Q2 - No segundo semestre de 2019, a ANVISA se tornou membro do comitê gestor do ICH. Assim há uma tendência dos Guias ICH serem incorporados na legislação brasileira através dos guias e RDCs da ANVISA.

No que se refere a validação de metodologia analítica, o Guia ICH Q2 (primeira revisão) já é bem absorvido pela legislação brasileira atual. O mesmo acontece com outros guias relacionados a registro de medicamentos, BPF, gerenciamento e controle de risco etc. ANVISA 166 de 24 de julho de 2017. Com a criação do Guia ICH Q2 (segunda revisão), algumas mudanças no processo de validação foram introduzidas de modo que o mesmo é facilmente linkado ao Guia ICH Q14. No curto prazo, esses dois guias provocarão grandes mudanças no cenário do desenvolvimento e validação de métodos analíticos no Brasil e no mundo, trazendo uma mudança de paradigma que provavelmente ocasionará grandes melhorias na qualidade e confiabilidade das metodologias interferindo positivamente na qualidade e segurança dos medicamentos.

Entre as mudanças ocorridas no Guia Q2, as mais importantes foram a inclusão de: análises multivariadas, novas técnicas analíticas como RMN, mudança no modo de execução da robustez e incentivo ao uso de *design of experiments* (DOE) (ICH Q2 (segunda revisão), 2023).

No caso da robustez, por exemplo, pode ser realizada durante o desenvolvimento da metodologia analítica e não necessariamente na validação. Nesse caso se realizada conforme ICH Q14, é importante o uso de DOE. O MODR facilitará o conhecimento das regiões robustas do método desenvolvido, de modo a flexibilizar o uso e melhoria contínua do método analítico durante seu ciclo de vida. Sempre que uma mudança de método dentro do MODR for realizada para melhorar a metodologia, será necessário, uma nova validação, porém, o órgão regulador

não considerará como alteração pós registro, ou seja haverá flexibilidade regulatória com o objetivo de melhoria contínua. Essas melhorias poderão ocorrer em todo o ciclo de vida do produto (ICH Q14, 2023).

A ANVISA não obriga as empresas brasileiras a desenvolver e validar seus métodos analíticos dentro dos princípios do AQbD, más recomenda neste sentido. A idéia de produtos desenvolvidos parcialmente dentro da filosofia QbD é aceita, por exemplo a empresa pode adotar o AQbD, más não aplicar os princípios de QBD no processo produtivo ou vice-versa.

Estudo de Degradação Forçada - No Brasil o estudo de degradação forçada de medicamentos começou a ser exigido pela ANVISA em 2013 com a aprovação da RDC 58 de 20 de dezembro de 2013, com a finalidade de regulamentação da notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Em 2015 foi aprovada a RDC 53 ANVISA de 4 de dezembro de 2015. Atualmente a legislação nacional está bem alinhada com o Guia ICH Q3B (segunda revisão) e com o documento técnico 929 do *World Health Organization* (WHO), no que concerne à estudo de degradação forçada e regulamentação da notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.

O Quadro 8 mostra os limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.

Quadro 8. Limites de notificação, identificação e qualificação conforme RDC 53 de 2015.

Limites	**Dose Máxima Diária [1]**	**Limites [2]**
Limites de Notificação	≤1g	0,1%
	>1 g	0,05%
Limites de Identificação	<1 mg	1,0% ou 5µg ATD, o que for menor
	1 mg-10 mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	>10 mg-2 g	0,2% ou 2mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,10%
Limites de Qualificação	<10 mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10 mg-100 mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100 mg – 2 g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2 g	0,15%

Fonte: RDC 53/2015, ANVISA.

Onde:

1. Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2. Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

Esse quadro consta também na RDC 53 de 2015 e Guia ICH Q3B (segunda revisão) (ANVISA RDC 53, 2015) (ICH Q3B (segunda revisão), 2006). O Documento Técnico 929 do WHO aborda o estudo de degradação mais focado na maneira de execução sugerindo faixas de degradação (10 a 30%) e as condições de degradação (WHO, 2005). A partir de 2013 a ANVISA vem incorporando o Guia ICH Q3B (segunda revisão) (além de outros guias ICH) e o Documento Técnico 929 em sua legislação referente a impurezas e estudo de degradação forçada, sendo assim a legislação brasileira trabalha consonante com esses guias.

4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

4.1. Caracterização do Estudo

Neste trabalho será usada uma situação hipotética de necessidade de melhoria de um método analítico existente. O método apresenta baixa recuperação do ativo, alta variabilidade nas áreas de uma mesma preparação de amostra, falta de recuperação do ativo, pureza de pico abaixo de 900, presença do fenômeno *carryover* nas injeções do diluente, pico do ativo com simetria maior que 1,8 ou quebrando e com nº de pratos teóricos abaixo de 2000. A tratativa para a solução deste problema será feita com a mesma abordagem de desenvolvimento de um método novo, de modo a atender aos dois casos. A idéia é criar um guia de desenvolvimento analítico por AQbD, de modo que qualquer analista possa seguir o passo a passo e realizar essa tarefa. O mesmo raciocínio também serve de base para o desenvolvimento de metodologias utilizando outras técnicas. Também será discutido como interpretar dados gráficos e estatísticos.

O desenvolvimento analítico por AQbD é realizado com base em conhecimento prévio sobre o princípio ativo, produto acabado (quando for o caso), técnica analítica utilizada, finalidade da metodologia a ser desenvolvida e análise de risco. Cada etapa precisa ser planejada, fugindo de empirismo a achismos. Abordaremos toda a parte de pesquisa bibliográfica, seleção das condições iniciais referentes a reagentes, concentração de trabalho, testes estatísticos, análises de risco, ferramentas da qualidade etc. A Figura 15, mostra um fluxograma racional de AQbD, porém aqui o objetivo é mostrar o passo a passo da parte referente a aplicação de DOE. A validação da metodologia e o monitoramento do método não será aplicado nesta etapa. A validação deverá ser realizada conforme a legislação vigente assim como o monitoramento durante o ciclo de vida do produto e da metodologia.

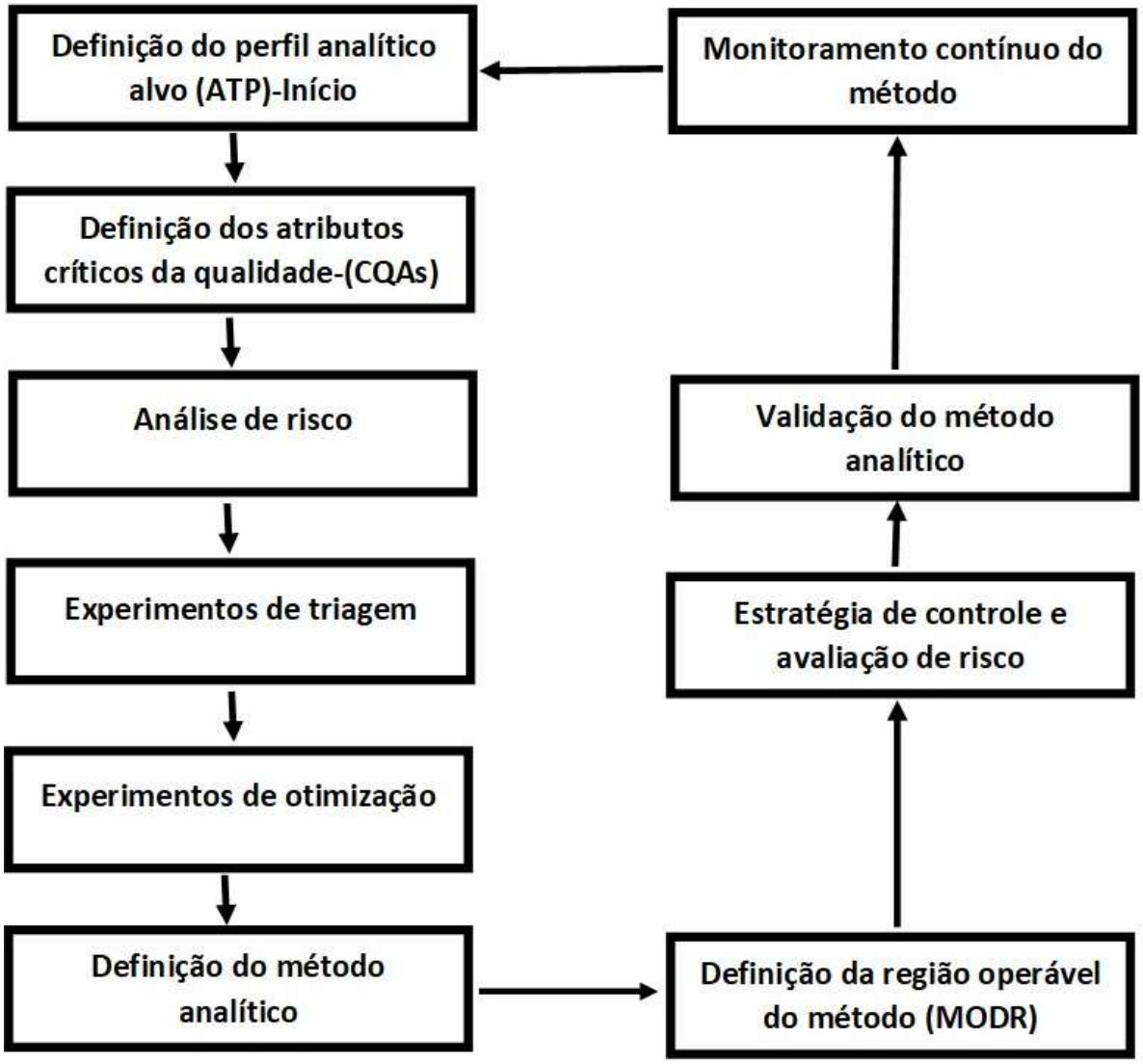

Figura 15. Fluxograma do racional de desenvolvimento de metodologia analítica por AQbD.
Fonte: Elaboração própria.

4.2. Pesquisa Bibliográfica- 1° Passo

A pesquisa bibliográfica pode ser subdividida em grupos de informações que levem ao conhecimento sobre a formulação (no caso de produtos), características físicas e químicas do insumo farmacêutico ativo (IFA), genotoxidade, carcinotoxidade, toxidade, metodologias descritas em compêndios, artigos etc.

Há sites baseados em bancos de dados que fornecem informações confiáveis e de forma gratuita sobre a maioria dos fármacos conhecidos. Numa pesquisa bibliográfica inicial sobre uma molécula, os sites *Chemspider* e *Chemikalize* são bem uteis pela facilidade da pesquisa e

o fato de as informações serem expostas de forma simples e prática. Porém existem outras bases de informações que também podem ser utilizadas como fonte de informação.

4.2.1. Propriedades Físico-Químicas da Molécula

As Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 mostram dados referentes a molécula, como estrutura, pKa, ponto isoelétrico, solubilidade e lipofilicidade.

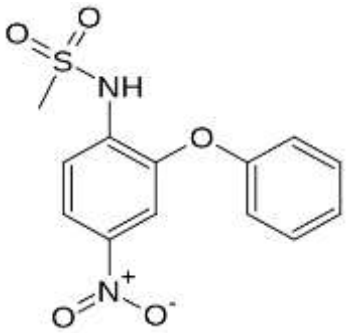

Figura 16. Estrutura molecular da nimesulida.
Fonte: Elaboração própria.

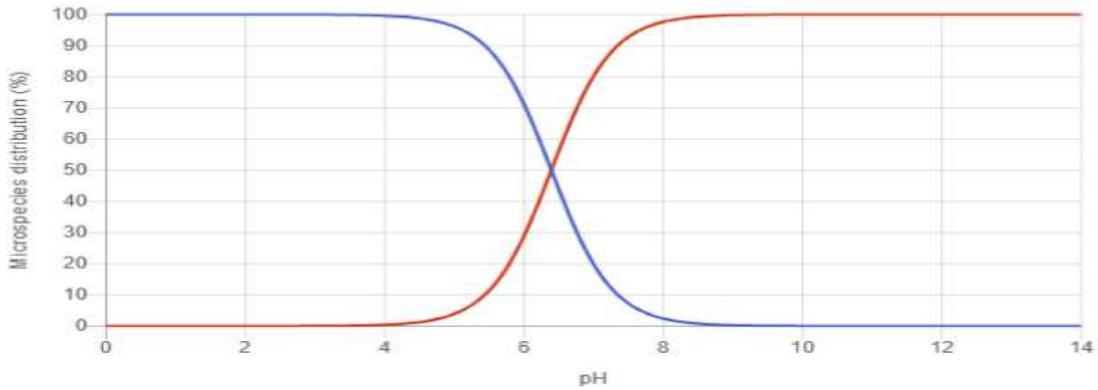

Figura 17. Gráfico de pKa da molécula de nimesulida.
Fonte: Chemicalize, 2024.

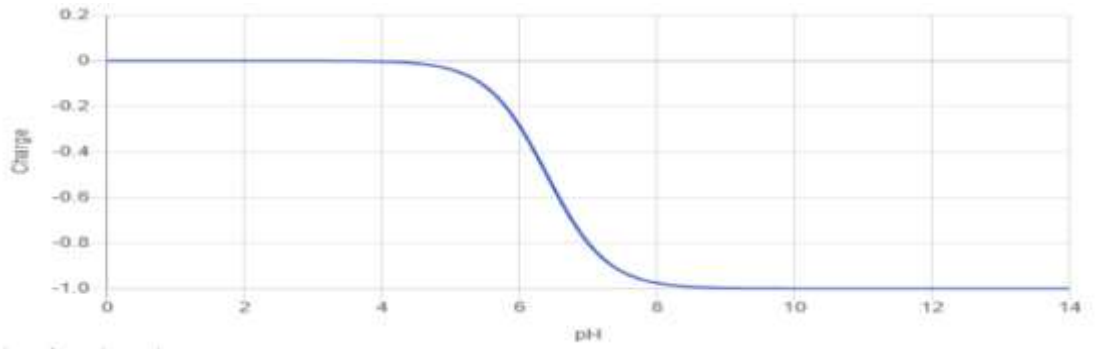

Figura 18. Ponto isoelétrico da molécula de nimesulida.
Fonte: Chemicalize, 2024.

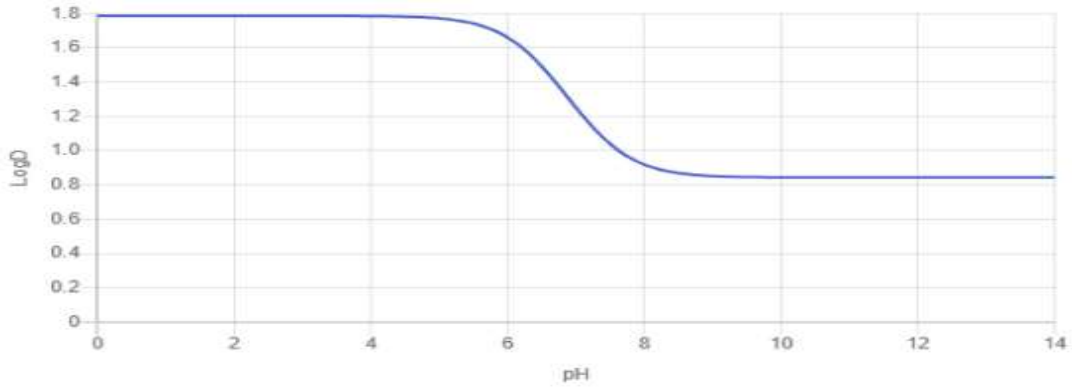

Figura 19. Caráter lipofílico da molécula de nimesulida.
Fonte: Chemicalize, 2024.

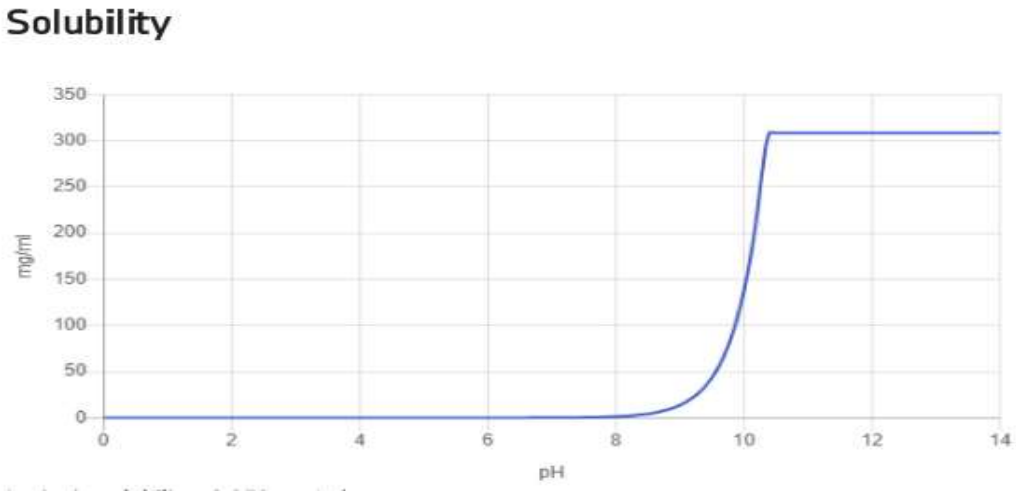

Figura 20. Solubilidade da molécula da molécula hipotética em função do pH do meio.
Fonte: Chemicalize, 2024.

Os Quadros 9 e 10 mostram as principais propriedades da molécula hipotética.

Quadro 9. Propriedades físico-químicas da molécula de analito.

Propriedade físico-químicas	**Valores**
Log P	1,80
Polarizabilidade	31.61 $Å^3$
Fórmula molecular	$C_{13}H_{12}N_2O_5S$
Solubilidade em água	baixa solubilidade em água (≅ 9 µg/mL)
Classificação Biofarmacêutica	Classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade)
pKa	6,4
Ponto de fusão	160°C
Ponto de ebulição	270°C
Massa molar	308,31 g/Mol

Quadro 10. Características da molécula hipotética.

Característica	Resposta
Apresenta genotoxidade ou carcinogenicidade	Não
Possui polimorfismo	Não
É sensível a luz	Não
É higroscópica	Não
Em quais condições de pH é mais estável	básico
É altamente termosensível?	Não
É fotossensível?	Sim
Como a matéria-prima deve ser manuseada?	Utilizando luvas, óculos e máscara de pó
Como a matéria-prima deve ser armazenada?	Entre 5 a 20C°, protegido da luz, calor e da umidade.
Qual é a dose letal	220 mg/kg para humanos

O Quadro 11, mostra um exemplo hipotético de exposição de resultados obtidos em pesquisa bibliográfica nos principais compêndios oficiais e no DMF do IFA.

Quadro 11. Pesquisa em compêndios oficiais para IFA e PAs da molécula hipotética.

Nome do teste	Tipo de produto	DMF*	BP/BP*	USP*	FB*	FJ*
SR por HPLC	MP	sim	sim	não	não	não
SR por HPLC	PA solução oral	não	não	não	não	não
SR por HPLC	PA comprimidos	não	não	não	não	não
Doseamento	MP	sim	sim	não	sim	não
Doseamento	PA solução oral	não	não	não	não	não
Doseamento	PA comprimidos	não	não	não	sim	não
Dissolução	PA comprimidos	não	não	não	sim	não

*Fontes hipotéticas apenas como exemplo.

O Quadro 12, traz outro exemplo, de pesquisa bibliográfica, mas agora sobre condições cromatográficas.

Quadro 12. Resultado de pesquisa bibliográfica.

Fonte	Análise	Fase móvel	Coluna
Artigo 1	Teor	Me: Tp Fosf. pH 4,0 (40:60)	A ODS C18 200x4,6mm 5µm
Artigo 2	Dissolução	Tp fosf.amônio pH 7,0:ACN (65:35)	B C8 RP18 125 x 4 mm 5 µm, 40°C
Farmacopeia 1	Teor	Tp fosf.amônio pH 7,0:ACN (65:35)	C RP18 125x4,0mm 5µm, 30°C
Artigo 3	Teor	ACN: Tp fosf.sódio pH 6,0 (55:45)	D RP-18 125 x 4 mm 5µm, 25°C
Artigo 4	SR	ACN:TEA:Água, pH5,2 (45:05:54,5)	E C18 150x4,6mm 5µm, 40°C
Artigo 5	Teor e SR	ACN: Tp acet. pH4,0 (55:45)	F 100x4,6mm 3,5µm, 37°C

*Fontes hipotéticas apenas como objetivo de exemplo.

Nessa etapa também pode ser levado em conta o diluente e a fase móvel utilizada além das micragens de recheios de colunas e tamanho de poro.

É muito importante lembrar que a pesquisa bibliográfica pode também incluir moléculas similares ao fármaco ou moléculas que possuam semelhanças químicas, físicas ou estruturais.

4.2.2. Formulação do Produto Acabado

O Quadro 13, mostra um exemplo de formulação hipotético de formulação.

Quadro 13. Formulação do produto Analito 50 mg/comprimido.

Insumo*	**Quantidade (mg)***	**%***
IFA	50	10,42
Carbonato de cálcio	180	37,50
Celulose microcristalina	110	22,92
Poliplasdone XL	10	2,08
Hidróxido de magnésio L	120	25,00
Estearato de magnésio	5	1,04
Aerosil	5	1,04
Peso por comprimido	480	100,0%

*Hipotéticos.

Depois dessa etapa, é recomendável realizar pesquisa na literatura ou in sílico com o objetivo de avaliar a possibilidade de interação fármaco-excipiente e fármaco-fármaco para o produto. Esse dado pode já estar disponível na empresa.

4.3. Definição das Características Desejáveis da Metodologia

O perfil desejado para o método analítico (ATP) a ser desenvolvido deve apresentar algumas características principais, que são: cumprir os requerimentos de desempenho, utilizar tecnologias modernas, economizar recursos e tempo.

O Quadro 14, que consta como anexo da RDC 166 ANVISA trata dos aspectos necessários à validação de uma metodologia. Pergunta nº 01-Qual a finalidade da metodologia analítica a ser desenvolvida?

Com base na resposta desta pergunta deverá ser avaliado quais os parâmetros de validação que a metodologia a ser desenvolvida deverá atender. O Quadro 14 mostra os principais testes a serem realizados em uma metodologia para que esta seja considerada validada, conforme RDC 166/2017 ANVISA.

Quadro 14. Parâmetros a serem considerados na validação analítica.

Parâmetro Avaliado	**Identificação**	**Teste de Impurezas**		**Doseamento** -Dissolução (quantificação) -Uniformidade de conteúdo - Potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	não	sim	não	Sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	Sim
Precisão Intermediária	não	sim [1]	não	sim [1]
Seletividade [2]	sim	sim	sim	sim
Limite de Detecção	não	não [3]	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não [3]
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

[1]Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.
[2]Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação.
[3]Pode ser necessário em alguns casos.

Este método deve apresentar as características abaixo:

- Capacidade de separação entre o pico de ativo e suas impurezas compendiais, produtos de degradação e excipientes oriundos da formulação.
- Cumprir com todas as características de desempenho relacionadas a especificidade, exatidão, precisão, faixa de linearidade e robustez descritos pela legislação vigente.
- Utilizar tecnologias modernas como cromatografia líquida de alta eficiência no UV-DAD.
- Utilizar os reagentes, equipamentos e insumos de forma a trazer economia para a empresa, economia de tempo para o Controle de Qualidade e que seja toxicologicamente menos agressivo para a natureza e para os analistas durante as análises.

4.4. Determinação do Objetivo do Método Analítico e Atributos Críticos da Qualidade

Na primeira parte do desenvolvimento do método analítico foi realizada a definição do *Analytical Target Profile* (ATP), ou seja, o perfil analítico desejado, que trata dos aspectos relacionados ao desempenho do método na especificidade, exatidão, precisão, robustez e linearidade. Contêm também a descrição do propósito do método analítico, e dos atributos críticos de qualidade (CQA), que compõem os critérios de aceitação que a metodologia deve

atender. Neste caso, assimetria, resolução entre os picos (R), pureza e fator de capacidade (k') são exemplos de CQAs.

Também deve ser descrito a tecnologia usada e a técnica de separação de forma clara e completa, já que são as bases, que por sua vez balizam os CQAs.

O Quadro 15, mostra os parâmetros a serem considerados na validação analítica para método de doseamento.

Quadro 15. Parâmetros a serem considerados na validação analítica para método de doseamento.

Parâmetro Avaliado	**Características**
Exatidão	80 a 120%
Precisão Repetibilidade	RSD < 2,0%
Precisão Intermediária	RSD < 2,0% Passa no teste *t student*
Seletividade	Ausência de sinal analítico com mesmo tempo de retenção do ativo na injeção do diluente e na injeção da solução placebo. Pureza de pico ≥ 0,90
Linearidade	80-120% Passa nos testes
Intervalo	80 – 120%

O Quadro 16 mostra os parâmetros de performance e CQAs avaliados.

Quadro 16. Parâmetros de performances e CQAs.

Item avaliado	**Parâmetros de performance (CQAs)**
Recuperação no placebo *spiked*	98 a 102%
Pratos teóricos do pico do analito	N≥2000
Assimetria (A) do pico do analito	Entre 0,8 a 1,5
Pureza de pico do ativo	Pureza de pico ≥ 0,98
Fator de capacidade	> 1,0
System Suitability (3 inj do padrão)	RSD ≤ 2,0

O próximo passo é a realização de uma análise de risco com o objetivo de avaliar os itens que mais interferem nos CQAs.

A análise de risco deve ser concluída como etapa prévia a parte experimental. Todas as informações obtidas até aqui servirão de base para a elaboração de uma análise de risco eficaz, que tem como objetivo identificar os aspectos críticos que compõem o universo a ser estudado e a metodologia a ser desenvolvida, da preparação da amostra até a avaliação de dados.

Diversas ferramentas da qualidade podem ser utilizadas, más as mais comuns e aplicadas são:

- Brainstorm;
- Diagrama de Ishikawa;
- Gráfico de Pareto;
- 5W2H (ferramenta de gestão onde w significa what e h significa how);
- Fluxogramas;
- FMEA.

4.5. Análise de Risco

4.5.1. Análise de Risco - 1º Passo, Ishikawa

O diagrama de Ishikawa mostrando de forma visual as principais possíveis tipos de falha e suas causas.

Nessa etapa os dados da pesquisa bibliográfica devem subsidiar a seleção dos itens que possivelmente podem interferir nos CQAs. A Figura 21, mostra o diagrama de Ishikawa com alguns possíveis tipos de falhas e suas causas.

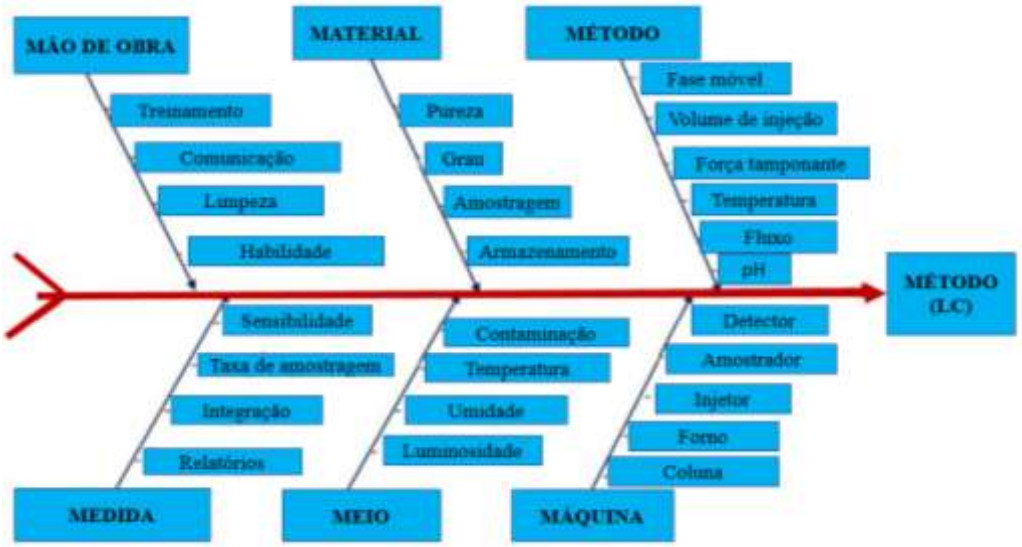

Figura 21. Diagrama de Ishikawa com os possíveis tipos de falhas e suas causas.
Fonte: BEG *et al.*, 2021.

4.5.2. Análise de Risco - 2º Passo, Brainstorm

Nesta etapa, deve ser realizado um *Brainstorm* com o objetivo de alinhamento entre analistas, gestores e envolvidos no projeto para avaliar o diagrama de Ishikawa obtido no passo anterior para a análise de risco. Deve-se escolher os itens que possivelmente podem apresentar maior impacto nos CQAs.

Outro ponto importante nessa etapa é que deve ser feita a escolha da ferramenta a ser utilizada na análise de risco. No nosso caso foi escolhido o FMEA.

4.5.3. Utilização do FMEA -3° Passo

O objetivo nesta etapa é avaliar o risco de forma quantitativa, de modo que possamos obter um valor numérico para indicar o grau do risco. O Quadro 17, mostra um exemplo de avaliação de risco utilizando os dados obtidos no item anterior.

Quadro 17. Exemplo de análise de risco utilizando o FMEA.

Item	Modo de falha potencial	Efeito no pior caso	S	Causa / Mecanismo da Falha	O	Controles existentes	D	NPR SXOxD	Classificação do Risco Não crítico/ Baixo: 1 a 15 Potencial/ Moderado: 25 a 45 Crítico/ Alto: 60 a 125	Justificativa da avaliação
pH do tampão ou FM	Pode interferir na pureza de pico, na recuperação do ativo..	Método não reprodutível.	5	Escolha do pH inadequado	5	Avaliar se o pH de escolha é condizente com a coluna e o analito.	5	125	125	**Severidade**: Impacta na qualidade do produto, um vez que não seja comprovado a pureza de pico do ativo e das impurezas conhecidas. **Ocorrência:** A taxa de incidência é baixa. **Detectabilidade**: A rastreabilidade do erro é realizada no próprio sistema e a reparação manualmente por um analista.
Fluxo na coluna.	Pode interferir na separação cromatográfica.	Método não reprodutível. Pode diminuir a vida útil da coluna e a robustez.	1	Escolha do fluxo muito alto ou muito baixo.	3	Acompanhar a pressão do sistema cromatográfico. Verificar manual da coluna.	3	9	9	**Severidade**: Baixo impacto na separação. **Ocorrência:** A taxa de incidência para esse erro é baixa devido a previsibilidade e possibilidade de teste. **Detectabilidade**: A rastreabilidade do erro é realizada no próprio sistema e a reparação manualmente por um analista.
Diluente.	Pode provocar quebra de pico, interferir na pureza de pico, e na recuperação..	Método não reprodutível.	5	O diluente deve solubilizar os analitos, não deve ser muito mais forte que a FM.	3	Verificar a solubilidade do analito no diluente, pureza de pico, N, assimetria e R.	3	45	45	**Severidade**: tem muito impacto na separação conforme descrito na literatura. **Ocorrência:** A taxa de incidência para esse erro é baixa devido a previsibilidade e possibilidade de teste. **Detectabilidade**: A rastreabilidade do erro é realizado no próprio sistema e a reparação manualmente por um analista.
Temperatura na coluna	Pode interferir na separação cromatográfic	Coeluição de picos	3	Temperatura muito alta pode danificar	5	Verificar a qualidade do pico	5	75	75	**Severidade**: tem médio impacto na separação conforme descrito na literatura. **Ocorrência:** A taxa de incidência para esse
Proporção da fase móvel.	Pode interferir na separação cromatográfica provocando baixa resolução entre os picos.	Coeluição de picos	5	Proporção inadequada da fase móvel pode interferir em todos os parâmetros cromatográficos.	5	Verificar a, verificar pureza de pico, N, assimetria e R.	5	125	125	**Severidade**: Alto impacto na separação. **Ocorrência:** A taxa de incidência para esse erro é alta. **Detectabilidade**: A rastreabilidade do erro através do acompanhamento dos parâmetros assimetria, N, R e pureza de pico.
Coluna	A separação cromatográfica é dependente da coluna utilizada.	Coeluição de picos	5	Coluna inadequada pode interferir em todos os parâmetros cromatográficos.	5	Verificar pureza de pico, N, R e assimetria	5	125	125	**Severidade**: Alto impacto na separação. **Ocorrência:** A taxa de incidência para esse erro é alta. **Detectabilidade**: A rastreabilidade do erro através do acompanhamento dos parâmetros assimetria, N, R e pureza de pico.

Fonte: Elaboração própria.

O Quadro 18 mostra o resumo na análise de risco de forma simplificada, para uma melhor visualização.

Quadro 18. Resumo da análise de risco.

Item	RPN	Risco
Fluxo utilizado na coluna cromatográfica	9	Baixo
Diluente utilizado no preparo da amostra	45	Médio
Temperatura da coluna	75	Alto
Proporção da fase móvel	125	Alto
pH do tampão utilizado na fase móvel	125	Alto
Características da coluna utilizada	125	Alto

4.5.4. Utilizando o Diagrama de Pareto para Elencar os Riscos - 4º Passo

Essa etapa vai facilitar a escolha das variáveis que serão utilizadas no DOE. Ela permite colocar os dados de forma visual utilizando o Diagrama de Pareto. Neste ponto, ainda não serão utilizados intervalos de confiança para a avaliação dos dados, porém nas etapas seguintes o Diagrama de Pareto será feito e avaliado utilizando um intervalo de confiança de 5% para a avaliação do impacto de cada variável alterada no desenvolvimento da metodologia. A Figura 22, mostra os resultados da avaliação de risco já transferida para o Diagrama de Pareto.

Figura 22. Pareto para priorização das variáveis.
Fonte: Elaboração própria.

4.6. Definição da Condição Inicial

A definição das condições iniciais deverá ser baseada nos resultados da pesquisa da pesquisa prévia juntamente com o conhecimento adquirido pelo analista sobre o IFA, sobre a

técnica analítica utilizada, sobre a legislação vigente e experiência adquirida em desenvolvimento analítico. Como exemplo o Quadro 19, traz algumas sugestões:

Quadro 19. Características importantes que influenciam nas condições iniciais.

Propriedade	Sugestão
pKa da analito	Utilizar pH da fase móvel ou tampão no mínimo duas unidades de distância do pKa do analito
pKa do sal do tampão	O pH do tampão deve estar a menos de duas unidades do pKa do sal utilizado para que tenha efeito tamponante.
Solubilidade	Tanto a fase móvel quanto o diluente deve ser capaz de solubilizar a substância ativa.
Log D e Log P do analito	Quanto mais apolar é o analito melhor ele é retido em coluna mais apolar.
Analito termosensível	Deve-se trabalhar com a temperatura do cooler de amostras abaixo da temperatura ambiente.
Analito fotosensível	Usar vial e balões âmbar, trabalhar em ambiente com luz de sódio.
Analito higroscópico	A pesagem deve ser realizada de forma mais rápida possível deve-se também evitar pesagem de massas muito pequenas devido a estabilização da balança.
Analito pKa alto	Tem tendência de ser mais retido em fases móveis com pH mais altos.
Analito pKa baixo	Tem tendência de ser mais retido em fases móveis com pH mais baixos.
Analito pKa próximo de 7	Tem sua retenção na coluna menos sensível a pequenas variações de pH.
Analito é polímero de cadeia longa	Geralmente separa mais facilmente em colunas de exclusão por tamanho.
Analito não tem cromóforo	Usar detectores que não dependem cromóforos. Por exemplo, de massas, índice de refração, *light scattering* ou FID por CG, etc.
Analito com cromóforo	É detectado pela maioria dos detectores, como UV/VIS, de massas, de índice de refração (RI), de fluorescência, *light scattering*, etc.

4.6.1. Escolhendo a Coluna Inicial e sua Temperatura

A melhor forma de escolher a coluna mais adequada para um método analítico deve ser baseando-se na literatura através da verificação de colunas utilizadas com boa separação em análises similares, através da avaliação do log P, log D, pKa e outras características como tamanho da molécula, tamanho de poro da coluna, micragem, polaridade, tipo, etc.

4.6.2. Escolhendo o pH do Tampão e o Tipo de Sal na Condição Inicial

Conforme descrito, na Figura 23, o pH do tampão deve estar a menos de duas unidades (o recomendado é de até 2,0) de distância do pKa do sal utilizado, para que ocorra efeito tampão. Quanto mais próximo for o pKa do sal do pH do tampão maior será seu efeito de tamponamento (β). O efeito tampão também depende diretamente da concentração do sal utilizado. Quanto mais próximo do pKa do sal menos substância é necessária para promover o mesmo efeito de

tamponamento. A Equação 6, mostra a relação do pH com o efeito de tamponamento de uma solução tampão.

$$\beta = 2.203C\frac{10^{-pKa-pH}}{(10^{-pKa}+10^{-pH})^2} \qquad \text{Equação 6}$$

O íon acetato possui pKa de 4,75. Na Figura 23, é possível verificar que em pH numericamente igual a esse valor a capacidade de tamponamento da solução é máxima. Por isso, deve-se buscar trabalhar com as soluções tampão com pH ajustado para o mais próximo possível do pKa do sal utilizado, porém com uma concentração reduzida, evitando assim danificar o equipamento (*HPLC Troubleshooting Guide, Waters*, 2002).

A Figura 23, mostra o gráfico de capacidade de tamponamento *versus* pH da solução salina.

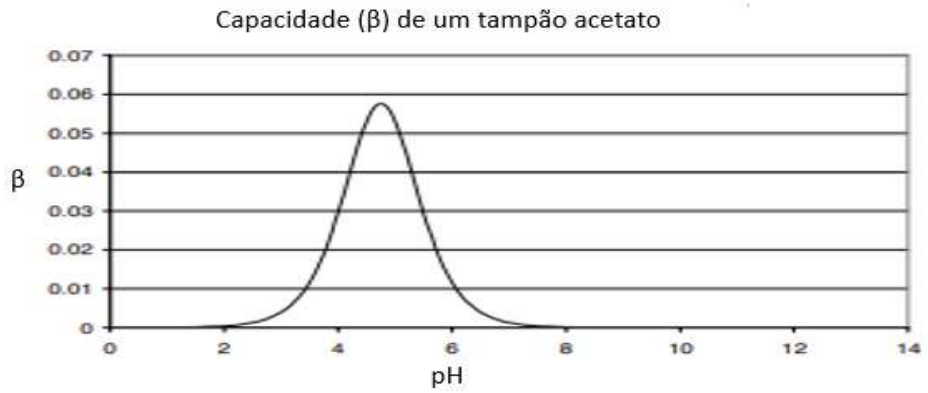

Figura 23. Capacidade de tamponamento (β) do tampão acetato 0,1 mol/L.
Fonte: *HPLC troubleshooting Guide, Waters*, 2002.

Na escolha do tampão deve-se atentar também para a absortividade molar da solução, especialmente quando trabalhamos com analitos com poucos cromóforos ou em concentrações muito baixas. Pois nesse caso, a própria fase móvel poderá provocar diminuição significativa da área do pico devido ao fato de estar absorvendo nesse comprimento de onda. Entre as soluções tampão mais utilizadas em cromatografia líquida a ordem de absortividade molar é:

Tampão acetato tem absortividade molar > tampão fosfato

Outra informação importante na escolha do sal do tampão é sua solubilidade em água e em solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano (THF), etc. A solubilidade do fosfato de potássio (S) é maior em soluções aquosas contendo metanol que em soluções aquosas contendo acetonitrila ou THF, de acordo com a seguinte ordem, MeOH > ACN > THF (DOLAN, 2005).

A Tabela 2 mostra a solubilidade em soluções aquosas contendo acetonitrila dos sais mais utilizados em cromatografia líquida.

Tabela 2. Solubilidade de sais em soluções aquosas contendo acetonitrila.

% de ACN	Acetato de amônio pH 5,0	Fosfato de amônio pH 3,0	Fosfato de potássio pH 3,0	Fosfato de amônio pH 7,0	Fosfato de potássio pH 7,0
60	> 50mM	> 50mM	> 50mM	50	45
70	> 50mM	> 50mM	> 50mM	25	20
80	> 50mM	35mM	20	5	0
90	25mM	5mM	0	0	0

Fonte: Dolan, 2005.

Também deve-se levar em conta que é preciso garantir que a molécula do analito só deve estar ionizada em uma espécie química. A ionização em mais de uma espécie química pode ocasionar quebra do pico ou, não aprovação na pureza de pico. Além disso tem relação com sua solubilidade.

4.6.3. Escolhendo o Diluente Inicial

A escolha do diluente é fundamental, pois pode provocar diversos problemas como baixa recuperação do analito, *carryover*, assimetria de pico, baixa pureza de pico, baixa eficiência da coluna, degradação do analito etc.

A escolha do diluente pode ser baseada também em métodos analíticos descritos em artigos e farmacopeias ou em um método analítico já existente no laboratório para um produto que contenha formulação similar e mesmo e IFA. Mas neste caso é recomendado verificar se esses métodos estão coerentes, pois em alguns compêndios, artigos e em algumas empresas ainda é possível encontrar métodos antigos pouco eficientes, devido ao aumento do grau de seletividade e especificidade exigidos na legislação atual.

É sempre importante garantir que o analito seja totalmente solúvel no diluente e na fase móvel utilizada. Os gráficos das Figuras 17, 18, 19 e 20 ajudam na escolha do diluente. Diluentes muito mais fortes que a fase móvel pode levar a valores baixos de simetria de pico e de pratos teóricos podendo provocar até a quebra do pico do analito. Quando possível utilize a fase móvel como diluente ou então um solvente mais fraco. O diluente deve ser capaz de solubilizar o analito de interesse mesmo depois que a amostra tenha sido filtrada e transferida para o amostrador, que na maioria das vezes possui uma temperatura inferior à do ambiente em que a amostra foi preparada.

Quando o analito possui solubilidade insuficiente na fase móvel e/ou no diluente há grande possibilidade de ocorrência de picos fantasmas e *carryover*.

Para saber se um diluente solubiliza adequadamente o analito, prepare uma amostra sem matriz e com concentração igual a desejada na metodologia que está sendo desenvolvida. Leve o balão ao ultrassom e depois da solubilização total complete volume do balão. Deixe em repouso e verifique se não ocorreu a formação de cristais no fundo. Em seguida transfira a solução para *vial* apropriado e deixe no amostrador na temperatura indicada no método, avaliando periodicamente se houve queda da área do pico ou a formação de cristais no fundo do *vial* ou algum tipo de precipitação. Em seguida, faça uma injeção de diluente depois de ter injetado o *vial* com o analito e avalie se ocorreu a presença de *carryover* (presença de pico do ativo na solução diluente). O *carryover* é detectado pela presença de picos fantasmas e/ou picos do analito na solução diluente.

4.6.4. Escolhendo a Concentração de Trabalho Inicial e Volume de Injeção

A concentração de trabalho ideal deve garantir a solubilização da substância e de suas impurezas e produtos de degradação quando for o caso, deve garantir a total solubilização do analito mesmo depois de estar inserido nos ambientes com temperaturas mais baixas dentro do sistema (no amostrador ou durante a passagem pela agulha metálica do injetor), sem a ocorrência de precipitação provocando *carryover* e contaminação do sistema cromatográfico. Moléculas com altas absortividades podem ser injetadas em concentrações de trabalho mais baixas se for necessário.

A melhor forma de escolher a concentração de trabalho é por pesquisa bibliográfica e experimentalmente através da realização de injeções no sistema cromatográfico e posterior avaliação dos dados.

No caso de métodos de impurezas, geralmente as concentrações dos padrões e amostras são diferentes, carregando uma relação entre elas. A concentração de trabalho das amostras e padrões dependerão da especificação de cada impureza. Na legislação atual, a RDC 53, da ANVISA traz um quadro que lista dos limites de notificação, identificação e de identificação em relação à dose máxima diária. Conhecendo a dose máxima diária de consumo de um medicamento, constada na bula pode ser calculada as concentrações de trabalho das soluções amostras concentradas e dos das soluções padrões (que é igual a especificação). O Quadro 14 mostra as recomendações da ANVISA.

No caso dos IFAS, também é recomendado consultar as especificações de impurezas nos compêndios oficiais, site da ANVISA e no *Drug Master File* (DMF). Nos casos em as especificações de impurezas calculadas no site da ANVISA forem diferentes das descritas no DMF, é recomendável optar pelo pior caso, que é o mais crítico ou que possuir a menor especificação. Esta avaliação é muito importante pois, a concentração de trabalho da solução amostra concentrada vai depender totalmente do limite de especificação das impurezas.

A concentração de trabalho ideal deve garantir uma relação sinal ruído (S/N=*Signal/Noise*) ≥10 no volume de injeção injetado. Para métodos de impurezas também deve ser avaliado se são atingidos os valores de limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) conforme determinado na legislação vigente.

A escolha do volume de injeção também pode ser determinada através da avaliação de curvas com diferentes volumes. Neste caso deve-se avaliar a recuperação e parâmetros como pratos teóricos, simetria etc. Os volumes de injeção adequados são os que se posicionam na região linear das curvas traçadas com área *versus* volume de injeção. Também deve ser levado em conta a capacidade de carga da coluna, que é calculada em função do volume interno da coluna, geralmente o volume de injeção máximo em uma coluna é em torno de 1% de seu volume total.

4.6.5. Escolhendo o Comprimento de Onda Inicial

O comprimento de onda escolhido deve representar o máximo ou um dos máximos de absorbâncias durante a varredura realizada. Só devemos proceder de outra forma como segunda opção, principalmente nos casos em que é quantificado mais de um analito simultaneamente. Quando possível é ideal também que se escolha um comprimento de onda em que a fase móvel tenha menor absortividade. Em comprimentos de onda mais baixos a interferência da fase móvel tende a ser maior (WELTER, 2011).

4.6.6. Escolhendo o Fluxo Inicial

A escolha do fluxo inicial vai depender muito da viscosidade da fase móvel, da micragem e do diâmetro da coluna e de sua temperatura. Cada coluna possui uma faixa de trabalho com maiores valores de pratos em relação ao fluxo utilizado. Na literatura é fácil de encontrar curvas da equação de Van Deemter mostrando os valores de fluxo em que cada tipo de coluna produz mais pratos teóricos (FANALI *et all*, 2023). Essa pesquisa juntamente com

os valores de pressão no equipamento e a qualidade da separação pode orientar o analista iniciar a análise com fluxo de fase móvel mais próximo do ideal.

4.6.7. Definindo as Condições Inicias para o Planejamento de Triagem

Depois da realização de ampla pesquisa bibliográfica, realização da análise de risco entre outros aspectos importantes, chegou o momento de definir as condições inicias para iniciar o desenvolvimento analítico propriamente dito.

Como este caso se refere a melhoria de uma metodologia primeiramente apresentaremos as condições do método original e depois uma tabela com os apontamentos baseados nos conhecimentos adquiridos nas pesquisas e no conhecimento do analista.

4.6.8. Condições Originais da Metodologia a ser melhorada

Condições cromatográficas:
Coluna: X-Terra RP 18 150x4,6 mm 5 µm
Volume de injeção: 20 uL
Comprimento de onda: 230 nm
Fluxo: 1,2 mL/min
Temperatura da coluna: 40°C
Diluente: Fase móvel
Solução de limpeza da agulha: Água ultrapura
Temperatura do amostrador: 5°C

Preparo da fase móvel:

Transfira 545,0 mL de água ultrapura para um béquer de 1,0 L. Adicione 450,0 mL de acetonitrila e 5,0 mL de trietilamina. Ajuste o pH para 5,2 utilizando ácido fórmico. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparo do padrão:

Transfira 8,0 mg de analito padrão para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicione 80 mL de fase móvel e leve ao ultrassom até a solubilização completa (Solução A).

Transfira 0,5 mL de solução A para um balão volumétrico de 50,0 mL. Complete o volume com fase móvel. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para vial âmbar apropriado.

Preparo da amostra:

Transfira uma quantidade de amostra equivalente a 10,0 mg de analito para balão volumétrico âmbar de 25,0 mL. Adicione 20,0 mL de fase móvel e leve ao ultrassom. Deixe esfriar a temperatura ambiente e complete o volume com fase móvel. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* âmbar apropriado. O Quadro 20, compara a metodologia a ser melhorada com o ótimo teórico das condições previstas.

Quadro 20. Comparação do método antigo com a proposta de método inicial para otimização.

Condição	Condição original	Condições ótimas previstas	Status
Coluna	X-Terra RP 18 150x4,6 mm 5 µm	C8 ou C18	Ok
pH da fase	5,2	Próximo de 4,4 ou menor que 4,6.	Não recomendado
Proporção da fase	Água, ACN, TEA (545:450:5). pH ajustado depois de misturado	O ajuste do pH antes de colocar a ACN é mais recomendado	Ok
Volume de injeção	20 uL	Até 18 uL	Ok
Comprimento de onda	230 nm	230nm	Ok
Fluxo	1,2 mL/min	Próximo de 1,0 mL/min	Ok
Temperatura da coluna	40°C	Na faixa de trabalho da coluna	Ok
Diluente	Fase móvel	Fase móvel	Ok
Temperatura do amostrador	5°C	Usar temperatura mais alta devido a baixa solubilidade do analito.	Não recomendado
Solução de limpeza da agulha	Água	Fase móvel ou mistura de água e acetonitrila	Não recomendado, pouco solúvel

4.6.9. Metodologia Proposta

Condições cromatográficas:

Coluna: X-Terra RP 18 150x4,6 mm 5 µm

Volume de injeção: 20 uL

Comprimento de onda: 230 nm

Fluxo: 1,0 mL/min

Temperatura da coluna: 40°C

Diluente: Fase móvel

Solução de limpeza da agulha: Água ultrapura, acetonitrila (50:50)

Temperatura do amostrador: 20°C

Preparo da fase móvel:

Transfira 545 mL de água ultrapura para um béquer de 1,0 L. Adicione 5,0 mL de trietilamina. Ajuste o pH para 4,5 utilizando ácido fórmico. Adicione 450,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Degaseifique e filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparo do padrão:

Transfira 8,0 mg de analito padrão para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicione 80 mL de fase móvel e leve ao ultrassom até a solubilização completa (Solução A).

Transfira 0,5 mL de solução A para um balão volumétrico de 50,0 mL. Complete o volume com fase móvel. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para vial âmbar apropriado.

Preparo da amostra:

Transfira uma quantidade de amostra equivalente a 10,0 mg de analito para balão volumétrico âmbar de 25,0 mL. Adicione 20 mL de fase móvel e leve ao ultrassom. Deixe esfriar a temperatura ambiente e complete o volume com fase móvel. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para vial âmbar apropriado.

O Quadro 21, compara as condições propostas para o DOE 01 e as condições ótimas previstas.

Quadro 21. Comparação das condições analíticas para DOE 01 com condições ótimas previstas.

Item	Condição	Condição para DOE 01	Condições ótimas previstas
01	Coluna	X-Terra RP 18 100x4,6mm 3,5 µm	C8 ou C18
02	pH do tampão	4,5	Próximo de 4,4 ou menor que 4,6.
03	Proporção da fase	Água, ACN, TEA (545:450:5).	Ajuste de pH antes de misturar
04	Volume de injeção	20 uL	Até 18 uL
05	Comprimento de onda	230 nm	230nm ou conforme varredura espectral.
06	Fluxo	1,0 mL/min	Próximo de 1,0 mL/min
07	Temperatura da coluna	40°C	Na faixa de trabalho da coluna
08	Diluente final	FM	Fase móvel
09	Temperatura do amostrador	20°C	20°C a 25°C
10	Solução de limpeza da agulha	Água, ACN (50:50)	FM ou mistura de água e acetonitrila

4.7. Planejamento Experimental (DOE)

O DOE de *screening* nas condições do método analítico e nas suas vizinhanças somente para entender a condição inicial. Depois será feito um novo *screening* com o objetivo de alterar as condições necessárias.

4.7.1. DOE 01

As variáveis avaliadas na etapa de *screening* são obtidas através da avaliação do Gráfico de Pareto obtido na análise de risco. As variáveis escolhidas nesse caso são, fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, pH do tampão, proporção da fase, tipo de coluna, diluente e volume de injeção.

Nesse caso os parâmetros avaliados são assimetria < 2,0, fator de capacidade > 1,0, pratos ≥ 2000, resolução ≥ 2,0, pureza de pico ≥ 0,98, recuperação de 98-102.

Deverão ser feitas alterações nessas variáveis na condição definida como inicial. De preferência deve-se utilizar a condição inicial e valores acima e abaixo desta.

O *screening* realizado numa condição baixa, média e alta permite resultados com previsibilidade ou não de possíveis efeitos que ocorram de forma linear. Porém é mais comum o *screening* ser feito inicialmente nos níveis apenas alto e baixo. Aqui foi escolhido 3 níveis porque o número de variáveis não é muito alto então foi adicionado um ponto central. Foi utilizado apenas uma réplica de cada condição para que fosse possível um tempo reduzido de análise (metade do tempo).

Nesse trabalho, os DOEs serão nomeados ordenadamente por números como DOE 01 para o primeiro, DOE 02 para o segundo experimento e assim por diante.

Embora exista diversos software no mercado, neste experimento foi utilizado o *software* Minitab®.

Os experimentos foram realizados de forma aleatorizada pelo próprio *software* utilizado, ou seja, ordem de injeção não teve influência do analista.

Então, as condições para o DOE 01, devem ser baseadas no método proposto no item 4.6.7.2, alternando a condição inicial com valores baixos, altos e médios.

Coluna: X-Terra RP 18 100x4,6 mm 3,5 micras

Volume de injeção: 20 uL

Comprimento de onda: 230 nm

pH do tampão: 4,5 (testar 4,0; 4,5 e 5,0).

Proporção da fase móvel: Água ultrapura, acetonitrila, trietilamina (545:450:5) com pH ajustado utilizando ácido fórmico ou hidróxido de amônio antes de adicionar acetonitrila.

Fluxo: 1,0 mL/min (testar 0,8; 1,0 e 1,2 mL/min)

Temperatura: 40°C (testar 35°C, 40°C e 45°C)

Diluente: Fase móvel

Solução de limpeza da agulha: água ultrapura, ACN (50:50)

Temperatura do amostrador: 20°C

O experimento inicial será um DOE de filtragem (*screening*) definitivo com 3 fatores (fluxo, temperatura da coluna e pH do tampão), 3 níveis (baixo, médio e alto), 1 réplica e 1 bloco. O Quadro 22 mostra o resumo do experimento. Os sinais -, 0 e + representam respectivamente os níveis baixos, médios e altos respectivamente.

4.7.1.1. Resumos do Experimento DOE 01

O Quadro 22 mostra o resumo do experimento DOE 01.

Quadro 22. Resumo do experimento DOE 01.

Ensaio	Ordem de injeção	Bloco	pH	Temperatura	Fluxo
1	12	1	-	-	+
2	1	1	0	0	+
3	11	1	+	+	-
4	4	1	-	-	-
5	2	1	0	0	-
6	7	1	+	+	+
7	10	1	-	-	+
8	8	1	-	-	-
9	9	1	+	+	-
10	5	1	+	+	0
11	3	1	+	+	+
12	6	1	0	-	0
13	13	1	-	0	0

4.7.2. DOE 02

4.7.2.1. Escolha das Condições de Análises

Para a realização do experimento DOE 02, foram utilizadas as condições ótimas de pH da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo. Foram feitos pequenos ajustes como o preparo da fase móvel incluindo o tampão do sal acetato de sódio e retirando o ácido fórmico devido a sua periculosidade e volatilidade. A trietilamina (TEA) também foi retirada da fase móvel devido ao fato de as colunas X-Terra RP não requererem fases móveis com essa substância e devido a sua alta volatilidade.

O DOE 02 também incluirá um outro tipo de coluna em seus experimentos. Essa nova coluna é bem similar más possui a característica de reter menos metais em seu recheio, pois trata-se da X-Terra MS, o diâmetro, comprimento e tamanho de partícula serão mantidos, para essa mudança espera-se pouca alteração no cromatograma. A possível vantagem da X-Terra

MS é reter menos Mg^{++} em sua estrutura, aumentando o tempo de vida útil da coluna, já que a formulação do produto a ser analisado é comprimido e o estearato de magnésio entra na sua formulação.

No DOE 02 também será incluído um novo comprimento de onda, 302 nm, que é outro ponto de máximo de absorção do analito, conforme foi verificado durante a realização dos testes posteriores.

O volume de injeção também será outro fator avaliado, pois 20 µL é um volume de injeção um pouco alto para as colunas testadas e para compensar essa mudança a célula de fluxo utilizada será uma célula de 60 mm ao invés de 10 mm. Lembrando que a mudança da célula pouco interfere na separação, más muito na altura e área do pico cromatográfico. O aumento da área do pico diminuir a resolução de dois picos, mas isso ocorre quando há picos muito próximos do analito.

Devido ao fato da recuperação ter apresentado valores levemente mais baixo em fases com pH mais baixo, a proporção de tampão e acetonitrila será 50:50, pois o pequeno aumento de acetonitrila na fase, poderá ocasionar a um aumento da solubilidade do analito na fase e consequentemente um tempo de corrida menor com uma melhor recuperação, o mesmo raciocínio deverá ser aplicado ao diluente utilizado. Também será introduzido novo gradiente com uma maior variação na polaridade da fase móvel com o intuito de eluir possíveis excipientes retidos na coluna.

4.7.2.2. Preparo da Fase Móvel

Preparação do tampão pH 3,8

Transfira 2,1 g de acetato de sódio para béquer de 1,0 L. Adicione 900 mL de água ultrapura. Homogeneíze. Ajuste o pH para 3,8 com acético 2 mol/litro ou NaOH 2,0 mol/L.

Preparação da fase móvel para linha A

Transfira 500,0 mL de tampão pH 3,8. Adicione 500,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação da fase móvel para linha B

Transfira 350,0 mL de tampão pH 3,8 para béquer de 1000,0 mL. Adicione 650,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação da solução diluente

Transfira 400,0 mL de tampão pH 3,8. Adicione 600,0 mL acetonitrila. Homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação do padrão

Transfira 8,0 mg de padrão do analito para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicione 80,0 mL de diluente. Leve ao ultrassom até a solubilização completa. Deixe esfriar a temperatura ambiente. Complete o volume com solução diluente. Transfira 0,5 mL para balão volumétrico de 50,0 mL. Complete o volume para com fase móvel A e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* apropriado. Concentração=0,0008 mg/mL

Peparo da amostra

Homogeneíze e transfira quantidade de amostra equivalente a 20,0 mg analito para balão volumétrico âmbar de 50,0 mL. Adicione 80 mL de solução diluente. Leve ao ultrassom por 20 minutos. Deixe esfriar a temperatura ambiente e complete o volume com solução diluente. Transfira 0,1 mL para balão volumétrico de 50,0 mL e complete o volume com fase móvel A. Concentração = 0,0008 mg/mL

Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* apropriado.

4.7.2.3. Condições Analíticas do DOE 02

Coluna: X-Terra RP 18 100x4,6 mm 3,5 µm (deverão ser testadas X-Terra RP18 e X-Terra MS 18)

Comprimento de Onda: 230 nm com célula de 60 mm. Foram testados 230 e 302 nm)

Fluxo: 1,2 mL/min

Temperatura da coluna: 35°C

Volume de injeção: 20 uL (deverão ser testados 15 e 20 µL)

Fase móvel: Utilizar as fases móveis A e B em sistema de bombeamento gradiente nas proporções descritas no Quadro 23:

Quadro 23. Gradiente de eluição para DOE 02.

Tempo(min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0,0
7,5	100	0,0
7,6	80	20
10,6	0	100
11,0	100	0,0
16,0	100	0,0

4.7.2.4. Resumos do Experimento DOE 02 - Experimento Fatorial Completo

Neste experimento não foi possível incluir pontos centrais devido ao fato de as variáveis serem categóricas. O Quadro 24, mostra como foram executados os experimentos, inclusive à randomização na execução.

Quadro 24. Resumo de experimento DOE 02.

Ensaio	Bloco	Ordem de injeção	Volume de injeção	Coluna	Comprimento de onda (ʎ)
1	1	8	+	+	+
2	1	13	+	-	-
3	1	14	-	+	-
4	1	2	-	-	+
5	1	7	+	-	+
6	1	15	-	-	+
7	1	10	-	-	-
8	1	5	-	+	-
9	1	11	-	+	+
10	1	9	+	+	-
11	1	12	+	-	-
12	1	4	+	-	+
13	1	6	-	+	+
14	1	3	+	+	+
15	1	16	+	+	-
16	1	1	-	-	-

4.7.3. DOE 03

4.7.3.1. Escolha das Condições de Análises

As condições de análise para o DOE 03, serão baseada nos resultados do DOE 02. A otimização dos resultados do DOE 02 levando em consideração todos os parâmetros e variáveis, propôs a utilização de coluna X-Terra MS18, temperatura da coluna de 35°C, 20 µL de volume de injeção e comprimento de onda de 230 nm.

O objetivo do DOE 03 é propor experimentos que torne a metodologia a obter a melhor performance possível. Porém, a melhoria nos resultados de pureza de pico e recuperação são os principais desafios do DOE 03.

No DOE 03, além de utilizar as condições previstas no DOE 02 para coluna, volume de injeção e comprimento de onda, será utilizado um novo gradiente de fase móvel conforme mostrado nos Quadros 25 e 26. O diluente da primeira diluição também teve uma leve alteração no seu pH, com o objetivo de aumentar a solubilidade do analito nesse meio.

Quadro 25. Gradiente 1.

Tempo(min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0,0
7,5	100	0,0
7,6	0	100
10,6	0	100
11,0	100	0,0
16,0	100	0,0

Quadro 26. Gradiente 2.

Tempo(min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0,0
7,5	100	0,0
7,6	80	20
10,6	0	100
11,0	100	0,0
16,0	100	0,0

Condição final

Coluna:X-Terra MS 18 100x4,6 mm 3,5 µm

Comprimento de Onda: Injetar em 230 nm e 302 nm com célula de 60 mm

Fluxo: 1,2 mL/min

Temperatura da coluna: 35°C

Volume de injeção: 20 uL

Fase móvel: Conforme gradientes dos Quadros 25 e 26:

Observação importante: A nova proposta de gradiente (gradiente 2) foi adicionada com o objetivo de retirar excipientes pouco solúveis de dentro da coluna, para que estes não interfiram na pureza de pico e recuperação do analito.

Preparação do tampão pH 4,5

Transfira 2,05 g de acetato de sódio para béquer de 1,0 L. Adicione 950 mL de água ultrapura. Ajuste o pH para 4,5 com ácido acético 2 mol/L ou NaOH 2 mol/L e complete o volume com água ultrapura e homogeneíze.

Preparação do tampão pH 3,8

Transfira 2,05 g de acetato de sódio para béquer de 1,0 L. Adicione 950 mL de água ultrapura. Ajuste o pH para 3,8 com ácido acético 2 mol/L ou NaOH 2 mol/L e complete o volume com água ultrapura e homogeneíze.

Preparação da fase móvel para linha A

Transfira 500,0 mL de tampão pH 3,8 para um béquer de 1 L. Adicione 500,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação da fase móvel para linha B

Transfira 350,0 mL de tampão pH 3,8 para béquer de 1 L. Adicione 650,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação da solução diluente

Transfira 400,0 mL de tampão pH 4,5. Adicione 600,0 mL acetonitrila. Homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

Preparação do padrão

Transfira 8,0 mg de padrão do analito para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicione 80,0 mL de diluente. Leve ao ultrassom até a solubilização completa. Deixe esfriar a temperatura ambiente. Complete o volume com solução diluente. Transfira 0,5 mL para balão volumétrico de 50,0 mL. Complete o volume para com fase móvel A e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* apropriado.

Concentração do analito = 0,0008 mg/mL

Preparo da amostra

Homogeneíze e transfira quantidade de amostra equivalente a 20,0 mg analito para balão volumétrico âmbar de 50,0 mL. Adicione 80 mL de solução diluente. Leve ao ultrassom por 20 minutos. Deixe esfriar a temperatura ambiente e complete o volume com solução diluente. Transfira 0,1 mL para balão volumétrico de 50,0 mL e complete o volume com fase móvel A.

Concentração do analito = 0,0008 mg/mL

4.7.3.2. Resumo do Experimento DOE 03

Foi realizado um experimento fatorial completo, com todos fatores categóricos, por isso não foi possível a inclusão de pontos centrais. O Quadro 27, mostra o resumo do experimento DOE 03.

Quadro 27. Resumo do experimento DOE 03.

Ensaio	Bloco	Ordem de injeção	Comprimento de onda (ʎ)	Gradiente
1	1	4	+	-
2	1	2	-	+
3	1	8	+	+
4	1	5	-	-
5	2	7	+	+
6	2	3	+	-
7	2	6	-	+
8	2	1	-	-

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1. Resultados e Discussão do *Design of Experiments* 01

O Quadro 28, mostra como o experimento foi executado (condições cromatográficas, aleatorização e ordem de injeção) e os resultados obtidos em cada condição.

Quadro 28. Resumo do experimento DOE 01 com resultados obtidos.

Ordem de injeção	pH	Fluxo	°C	Pureza	Assimetria	N	R	Rec	Tr	k´
12	3,5	0,8	45	1,0	1,0	5801	1,61	97,85	4,87	3,68
2	4,0	0,8	35	0,99	1,1	5800	2,90	100,01	5,26	4,06
10	3,5	1,2	45	1,00	1,0	6100	1,54	97,86	3,25	3,71
8	3,5	1,2	35	1,00	1,0	6105	2,73	97,92	4,16	5,03
4	3,5	1,0	35	1,00	1,0	6297	2,82	97,93	4,95	4,96
6	3,5	0,8	40	1,00	1,0	5803	1,72	97,90	5,31	4,11
5	4,5	1,2	40	0,95	1,2	6108	1,56	98,50	2,72	2,94
7	4,5	0,8	45	0,90	1,2	5805	1,58	98,06	3,87	2,72
9	4,5	0,8	35	0,98	1,2	5800	2,85	98,72	4,76	3,58
13	4,0	1,0	40	0,99	1,1	6293	1,55	99,51	4,01	3,83
1	4,0	1,2	45	0,98	1,1	6091	1,50	99,03	2,76	3,00
11	4,5	1,2	35	0,98	1,2	6033	2,68	98,73	3,17	3,59
3	4,5	1,0	45	0,90	1,2	6303	1,51	98,01	3,06	2,69

5.1.1. A Análise Visual dos Resultados do *Design of Experiments* 01

Na avaliação da pureza de pico, todas as amostras injetadas com fase móvel pH 3,5 deram resultados ótimos, ou seja, apresentaram pureza igual a 1,0 (100%), sendo todas aprovadas. Já nas amostras injetadas com fase em pH 4,0 houve queda na pureza, atingindo valores de até 0,98 (98%) ou seja, atingiram o valor mínimo aceitável. No pH 4,5 os resultados de pureza de pico na maioria das injeções apresentaram-se como reprovado (<0,98) ou aprovado com 0,98. Logo, pode-se concluir que o pH afetou a pureza de pico e pHs acima de 4,0 não é recomendável. Outro ponto importante é que os resultados de recuperação mais próximos de 100% (aceitável=98 a 102%) foram com pH 4,0.

O número de prato teóricos (N) sofreu pouca variação com a mudança das condições, apresentando-se sempre como aprovado (≥2000) e entre 5800 e 6300.

Diversas observações visuais podem ser feitas a partir do Quadro 28, más essa não é a maneira mais adequada de avaliação de resultados de um DOE, mas com ela dá para perceber de forma grosseira os aspectos que mais influenciaram nos resultados obtidos. A avaliação adequada é através de gráficos e observações do ponto de vista estatístico. A avaliação visual

é de difícil conclusão sobre as interações entre as condições que foram variadas durante o experimento.

5.1.2. Avaliação Gráfica e Estatística dos Resultados do *Design of Experiments* 01

Embora o software traga muito recursos, neste ponto foram avaliados apenas os resultados relevantes para o objetivo em questão. Por exemplo, como as amostras foram injetas em unicata, não será feita a análise de variância, pois a variação de um resultado para o outro tem pouca relevância. O foco é no resultado, e na interação entre as variáveis de entrada.

5.1.3. Avaliação da Pureza de Pico

De acordo com o modelo matemático gerado pelo software na avaliação dos resultados da pureza de pico, conforme descrito na Equação 7, o pH foi o fator que mais interferiu na pureza de pico, de modo que o aumento do pH diminui a pureza pois na equação o pH possui sinal negativo. A aumento da temperatura também provoca diminuição na pureza de pico pois também apresenta sinal negativo. Já, o aumento do fluxo aumenta a pureza de pico. Ainda de acordo com a Equação 7, o pH é o fator que mais interfere na pureza de pico, de modo a provocar sua diminuição, enquanto o fluxo provoca aumento da pureza pois possui sinal positivo.

O modelo matemático proposto na regressão, tem poder de predição de 41,50% conforme R^2(pred) descrito no sumário do modelo descrito no Quadro 29.

$$\text{Pureza} = 1{,}3226 - 0{,}0580\text{pH} + 0{,}0200\text{F} - 0{,}00340\text{T} \qquad \text{Equação 7}$$

onde F é o fluxo da fase móvel e T temperatura da coluna em Celcius.

Quadro 29. Sumário do modelo matemático para pureza de pico.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,0212474	73,83%	65,10%	41,50%

O Gráfico normal dos efeitos padronizados da Figura 24, mostra que num intervalo de confiança de 5%(α=0,05), pH e temperatura são os fatores que tem relevância na diminuição da pureza de pico, concordando com a equação 7.

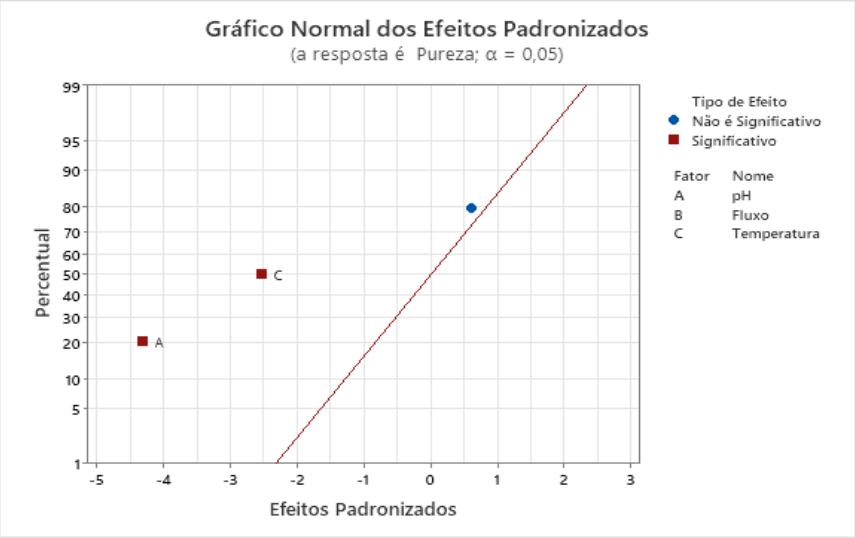

Figura 24. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico.

O gráfico de Pareto da Figura 25, também confirma os resultados mostrados, de acordo com o descrito, efeitos padronizados menores que 2,262 (valores em módulo), na linha tracejada em vermelho, não tem efeito significativo na pureza de pico. E o efeito padronizado do fluxo é menor que 1,0 enquanto temperatura e pH da fase móvel apresentam valores maiores que 2,262.

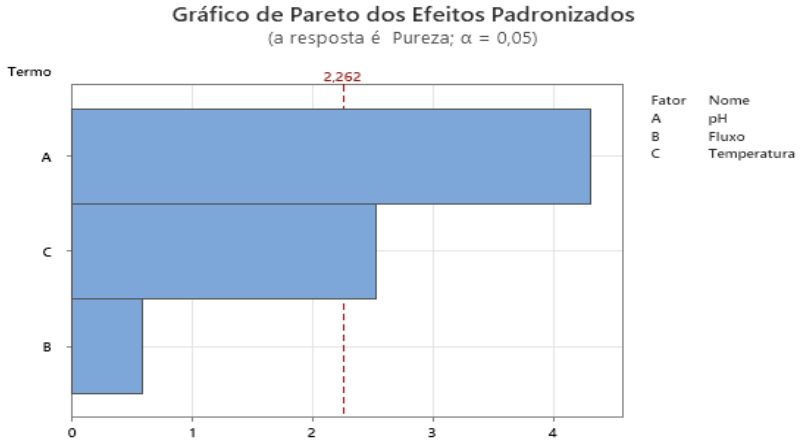

Figura 25. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico.

Na avaliação dos resíduos (Figura 26) é possível verificar que a aleatorização da ordem de injeção não interferiu nos resultados obtidos, pois no gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção, não houve tendência ou padrão de aumento ou de diminuição.

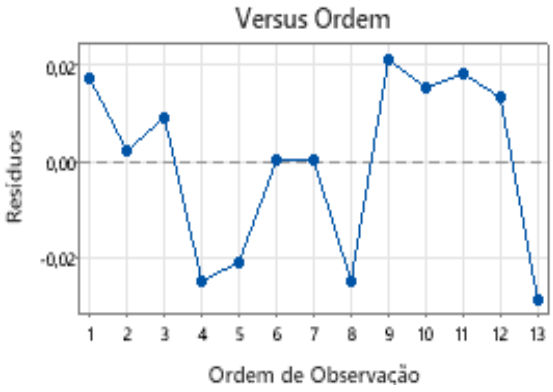

Figura 26. Gráficos de avaliação dos resíduos para pureza de pico.

Uma avaliação do gráfico de contorno de pureza *versus* fluxo; pH da Figura 27, mostra que o aumento do fluxo e a diminuição do pH da fase móvel levam a aumento da pureza de pico. No gráfico de contorno maiores valores de pureza são encontrados em regiões de verde mais escuro, ou seja, fluxo mais alto e pH mais baixo. A legenda ao lado do gráfico mostra a faixa de pureza para cada cor do gráfico.

O gráfico de contorno de pureza *versus* temperatura; pH da Figura 28, mostra que a diminuição da temperatura e diminuição do pH da fase móvel leva a valores maiores de pureza de pico, que fica na região de verde mais escuro do gráfico de contorno. A legenda ao lado do gráfico mostra a faixa de pureza para cor do gráfico.

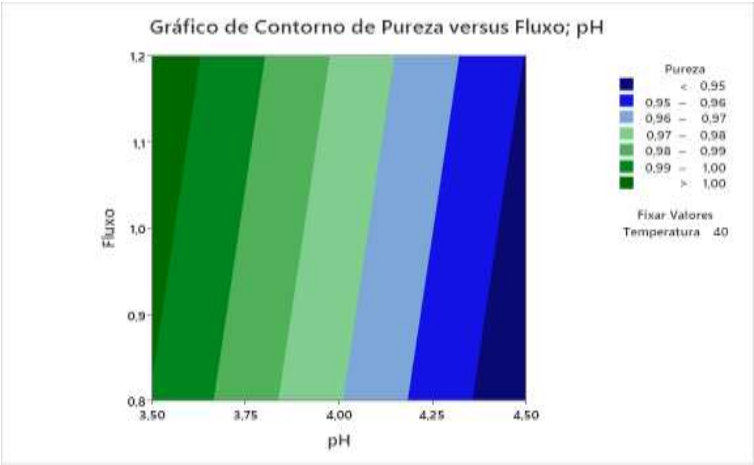

Figura 27. Gráfico de Contorno de Pureza *versus* fluxo; pH.

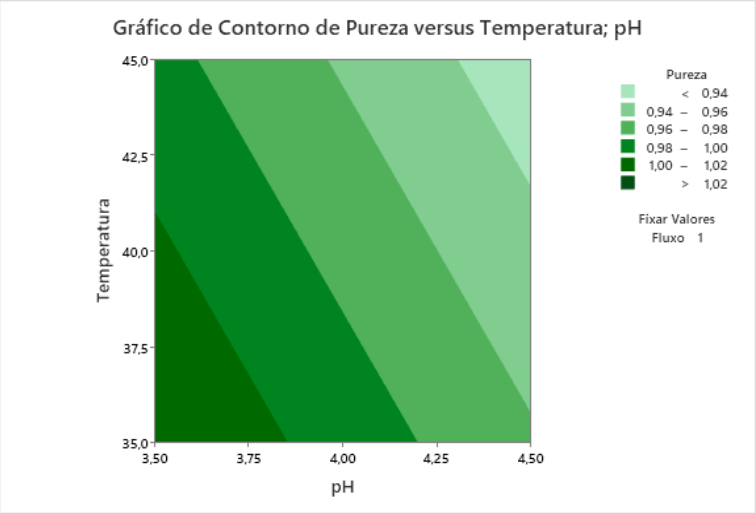

Figura 28. Gráfico de contorno de pureza *versus* temperatura; pH.

A Figura 29 permite verificar a dimensão do efeito de cada variável na pureza de pico. Quanto maior e menos inclinada a linha, maior será o efeito dessa variável de entrada. Neste gráfico também fica claro que as interferências, neste caso são: Interferência do pH da fase móvel > interferência da temperatura da coluna > interferência do fluxo.

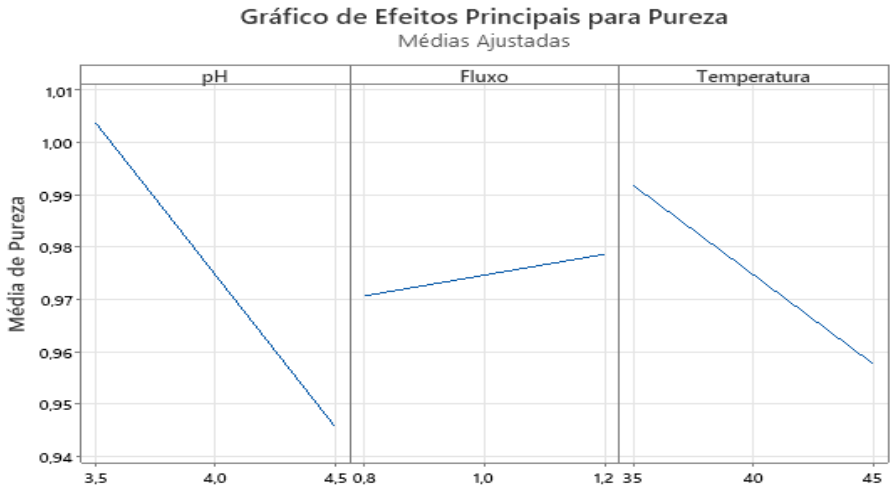

Figura 29. Gráfico de efeitos principais para pureza de pico.

5.1.4. Conclusão da Avaliação da Pureza de Pico para o DOE 01

Com base na avaliação do item anterior, conclui-se que é recomendável trabalhar com uma fase móvel com pH igual ou abaixo de 4, temperatura igual ou menor que 40°C e fluxos de 0,8 até 1,2 mL/min para obtenção de maiores valores de pureza de pico.

5.1.5. Avaliação do Número de Pratos Teóricos (N)

A avaliação dos resultados para pureza de pico, foram feitas de modo bem detalhado para que fosse possível introduzir o raciocínio utilizado na avaliação. A partir de agora adotaremos o mesmo racional para cada avaliação e avaliaremos de forma mais resumida. Sempre que surgir algo de novo em relação aos gráficos ou parâmetros estatísticos será explicado de forma detalhada no primeiro aparecimento do item, quando o item aparecer novamente discutiremos de forma mais resumida.

A avaliação da equação de regressão da Equação 8, mostra que o fluxo e a temperatura são os fatores de maior impacto no aumento do número de pratos teóricos. O aumento do pH tem pouco efeito más diminui o número de pratos teóricos.

$$N = 5306 - 11pH + 714F + 1{,}3T \qquad \text{Equação 8}$$

onde F é o fluxo de fase móvel e T a temperatura da coluna em Celcius.

Ao avaliar a equação observa-se que o número 5306 no início da mesma, faz com que a mudança das condições de pH, fluxo e temperatura altere muito pouco os resultados de N. Pois 5306 é muito maior que -11pH +714F + 1,3T. E isso concorda com os resultados das Figura 30 e 31. Além disso, o poder de predição do modelo (R^2(pred)) do Quadro 30 é de 0,0%. Além disso, pode haver confusão sobre as interferências de cada condição, pois os valores de pH multiplicado por -11 são próximos dos valores de temperatura multiplicados por 1,3 e os sinais são opostos quase cancelando a influência dos resultados. Como os valores de fluxo utilizados são de 0,8, 1,0 e 1,2, então na mudança de fluxo vai provocar muito pouca mudança no número de pratos teóricos. E mesmo assim, o fluxo provocará maior influência nos resultados que o pH da fase móvel e a temperatura da coluna.

A Figura 30, mostra no gráfico dos efeitos padronizados que apenas o fluxo tem efeito significativo sobre o número de pratos teóricos (N), concordando com os resultados descritos na Figura 31, que mostra o gráfico de Pareto. Ambos os gráficos avaliam os efeitos dentro de um intervalo de confiança de 5% (α=0,05).

Quadro 30. Sumário do modelo para pratos teóricos.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
179,770	41,30%	21,74%	0,00%

Figura 30. Gráfico normal dos efeitos padronizados para número de pratos teóricos (N).

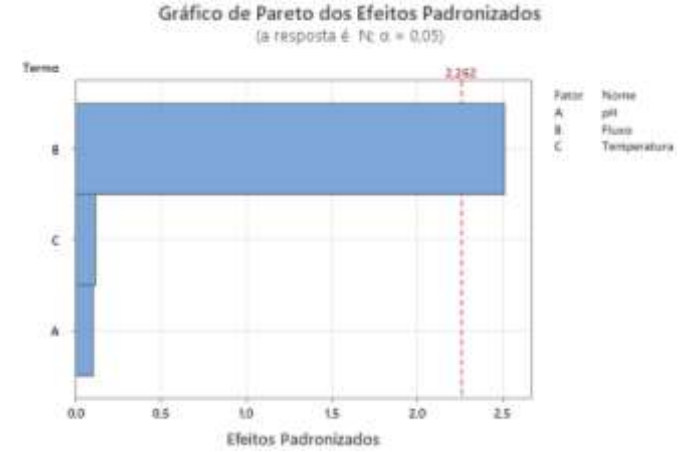

Figura 31. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para número de pratos teóricos (N).

As Figuras 32 e 33 mostram respectivamente os resultados referentes as figuras de contorno de N *versus* temperatura; pH e N *versus* fluxo; pH. Os gráficos mostrados nessas figuras mostram que as variações de pH da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna pouco interferem no número de pratos teóricos (N).

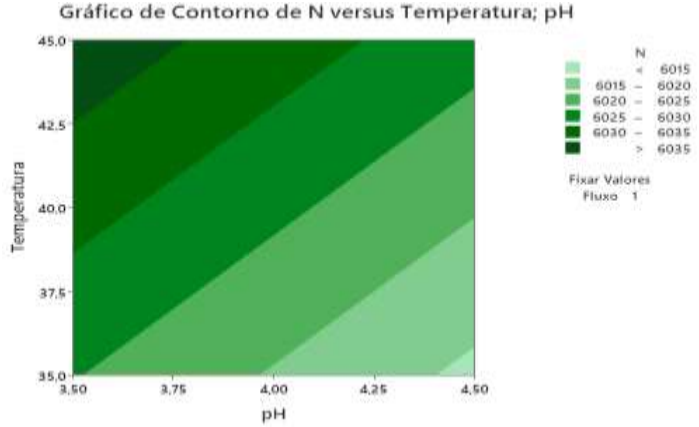

Figura 32. Gráfico de contorno de número de pratos *versus* temperatura; pH.

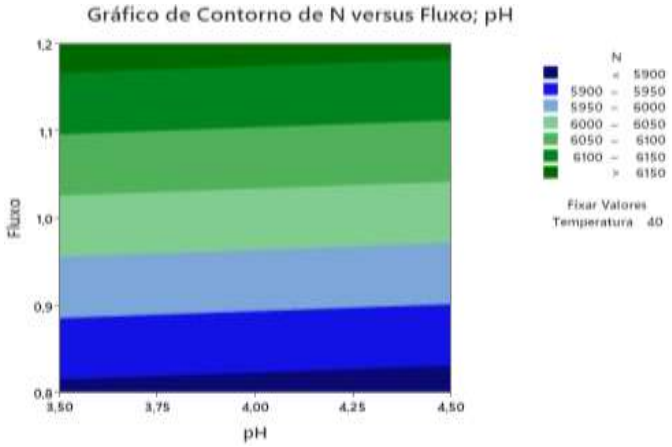

Figura 33. Gráfico de contorno de número de pratos teóricos *versus* fluxo; pH.

A Figura 34, mostra no gráfico de resíduos de N, que a aleatoriedade da ordem de injeção não influencia nos resultados, ou seja, não apresenta tendência ou padrão de comportamento.

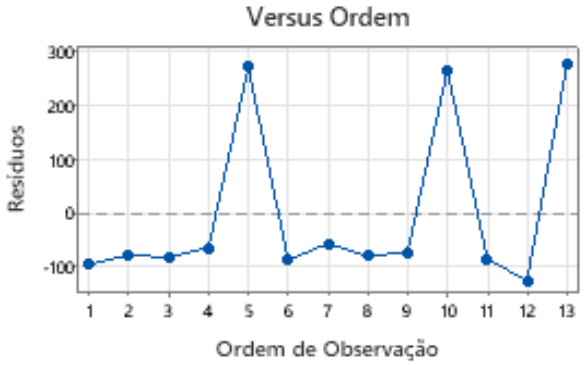

Figura 34. Gráficos de resíduos para número de pratos teóricos (N).

A Figura 35, mostra no gráfico de efeitos principais para N, a dimensão dos efeitos. Quanto maior, e menos inclinada a linha, maior será o efeito dessa variável de entrada nos resultados de saída.

Figura 35. Gráfico de efeitos principais para número de pratos teóricos.

5.1.6. Conclusão da Avaliação do Número de Pratos Teóricos (N)

Com base no item anterior, conclui-se que as variáveis de entrada temperatura da coluna, fluxo e pH da fase tem pouco impacto no número de pratos teóricos (N). Porém o fluxo apresenta um impacto significativo, embora seja pequeno.

5.1.7. Avaliação da Resolução (R) entre o Pico do Analito e o Pico Mais Próximo

Outra característica importante na análise cromatográfica é a resolução (R). Ela indica o quanto dois picos estão separados um do outro. Uma resolução de 1,5 é o valor mínimo que indica que dois picos estão totalmente separados. Embora essa especificação mínima será descrita como especificação na metodologia e durante a validação, no desenvolvimento de métodos, é preferível resoluções igual ou maior que 2,0.

Ao avaliar a Equação 9, os gráficos das Figuras 36, 37 e 39, podemos verificar que o aumento da temperatura da coluna é o fator que mais interfere na resolução. Outra observação importante é que o aumento de qualquer uma das variáveis testadas diminui a resolução da separação cromatográfica, e os efeitos se somam, pois, na equação os sinais de pH, fluxo da fase móvel (F) e temperatura da coluna (T) são negativos.

$$\text{Res} = 7{,}55 - 0{,}048\text{pH} - 0{,}325\text{F} + 0{,}1248\text{T} \qquad \text{Equação 9}$$

A predição do modelo é de 72,28%, conforme descrito no valor de R^2(pred) do Quadro 31.

Quadro 31. Sumário do modelo para resolução.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,286717	84,20%	78,93%	72,28%

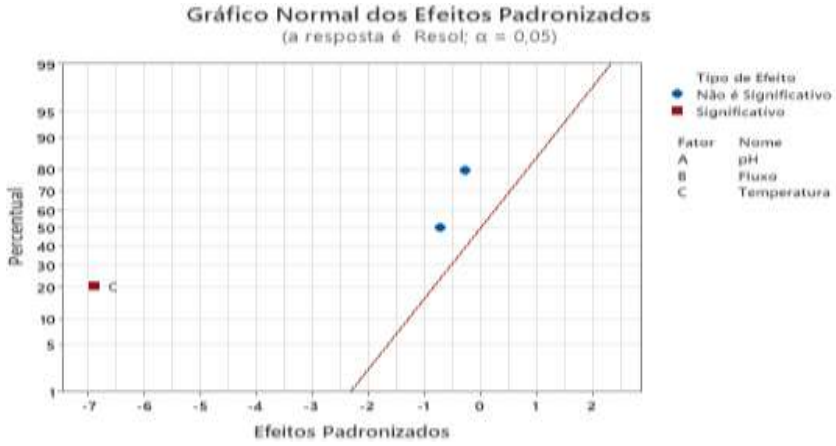

Figura 36. Gráfico normal dos efeitos padronizados para resolução.

De acordo com o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados, mostrado na Figura 37 apenas a temperatura apresentou influência estatisticamente significativa na variável de saída.

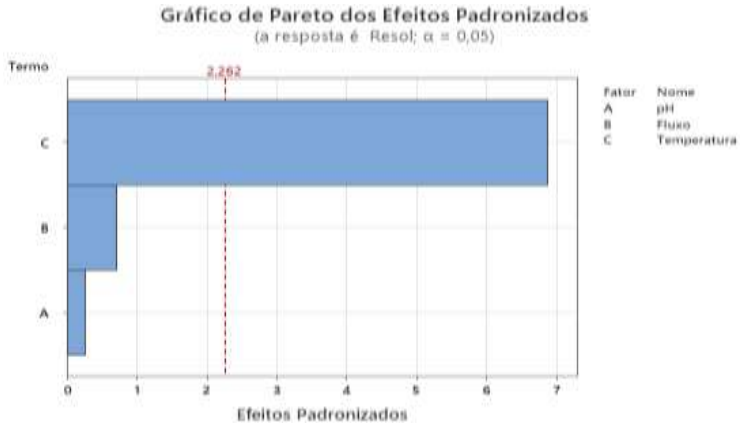

Figura 37. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para resolução (R).

Outra informação importante é que durante as injeções, a ordem de injeção de forma randomizada mostrou que os resultados não são tendenciosos conforme mostrado na Figura 38.

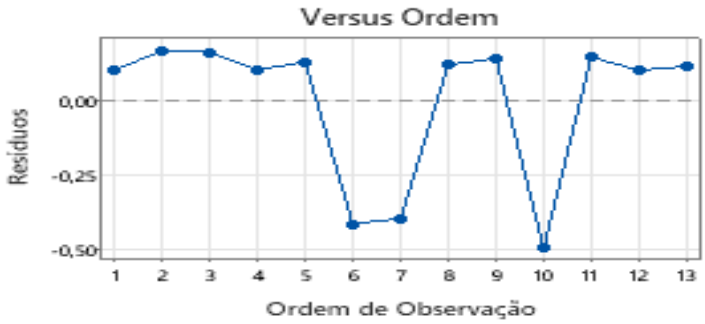

Figura 38. Gráficos de resíduos para resolução (R).

A Figura 39 mostra que a dimensão de influência da temperatura da coluna na resolução é muito maior que do pH da fase móvel e do fluxo.

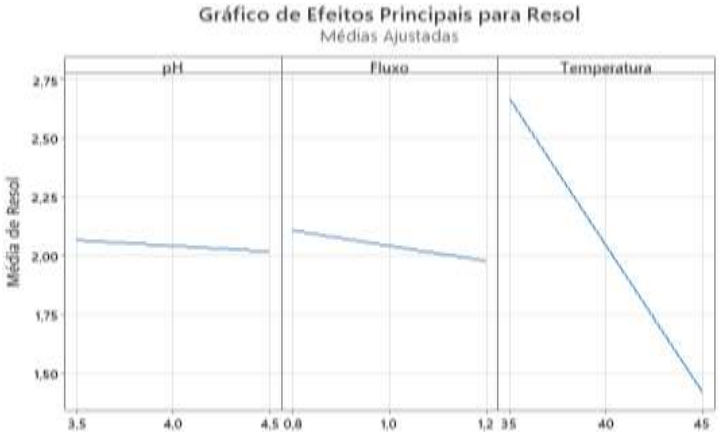

Figura 39. Gráfico de efeitos principais para resolução.

5.1.8. Conclusão da Avaliação dos Resultados Obtido para Resolução entre Analito e o Pico Mais Próximo

Ao avaliar os resultados da influência do pH da fase móvel, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel, foi possível verificar que os efeitos dessas 3 variáveis se somam, porém apenas a influência da temperatura apresenta significância. Os efeitos das variáveis de entrada pH e fluxo são muito pequenos.

5.1.9. Avaliação dos Resultados de Recuperação do Analito

A recuperação, assim como a pureza de pico é um dos parâmetros mais importantes de um método analítico.

A Equação 9, é o modelo matemático obtido para o cálculo da recuperação no DOE realizado. Observa-se que o aumento do fluxo da fase móvel (F) e da temperatura da coluna

(T) influenciam negativamente nos resultados da recuperação do analito. A mesma equação também informa que o aumento do pH ocasiona um leve aumento nos valores de recuperação.

$$\text{Rec} = 98{,}67 + 0{,}512\text{pH} - 0{,}25\text{F} - 0{,}0500\text{T} \qquad \text{Equação 10}$$

Embora os resultados da Equação 10 concordam com os gráficos das Figuras 40, 41 e 43, o modelo tem R^2(pred) de 0,00%, conforme mostra o Quadro 32.

Quadro 32. Sumário do modelo matemático para recuperação.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,718575	21,93%	0,00%	0,00%

Mesmo o modelo não sendo preditivo, essa análise nos permite através dos gráficos e valores das figuras, entender quais variáveis de entrada testadas causam maior impacto nos resultados de recuperação.

Conforme mostra a Figura 40, pH da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna, não apresentaram interferências significativas nos resultados de recuperação.

Figura 40. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação.

Embora sem significância estatística, os fatores testados no DOE 01 de maior impacto na recuperação são pH e temperatura, conforme mostra a Figura 41.

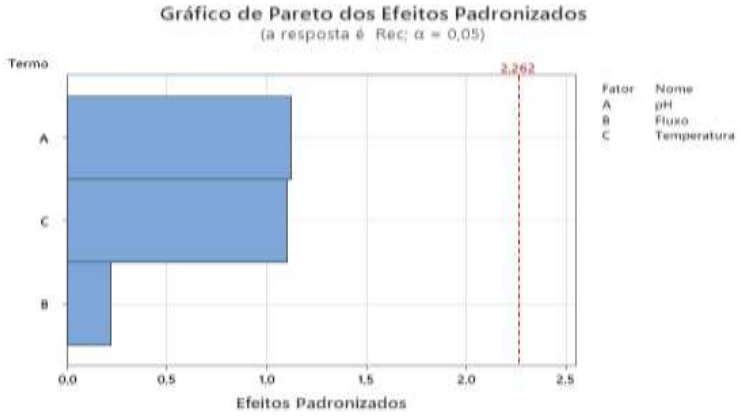

Figura 41. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação.

Outra observação importante, é que a ordem de injeção não influencia nos resultados de recuperação do ativo conforme mostra a Figura 42.

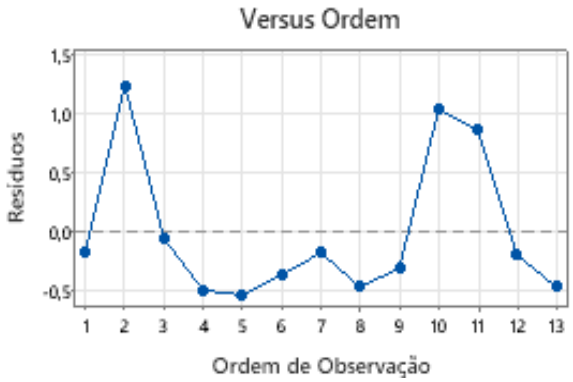

Figura 42. Gráficos de resíduo para recuperação.

A Figura 43, mostra as tendências de variações na recuperação decorrentes da mudança das variáveis de entrada pH, fluxo e temperatura da coluna. Embora os efeitos são estatisticamente insignificantes, eles ajudam na compreensão do fenômeno.

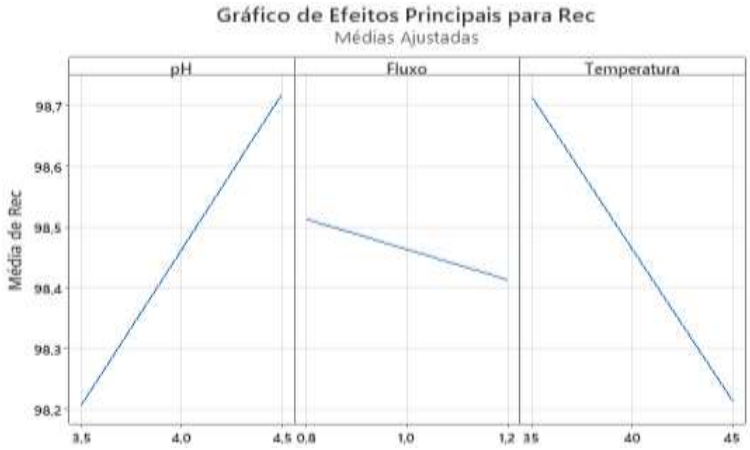

Figura 43. Gráfico dos efeitos principais para recuperação.

5.1.10. Conclusão da avaliação dos resultados obtidos para recuperação do Analito

Pode-se concluir que o aumento da temperatura da coluna cromatográfica provoca uma leve diminuição na recuperação do analito, o mesmo acontece com o aumento do fluxo de fase móvel. Essa diminuição da recuperação representa em torno de 0,5% a cada 10°C de aumento na temperatura da coluna e 0,1% no aumento do fluxo de 0,8 para 1,2 mL/min. Já o aumento do pH de 3,5 para 4,5 leva a um aumento de 0,5% na recuperação do analito, conforme pode ser verificado no gráfico da Figura 43.

5.1.11. Avaliação dos Resultados Obtidos para o fator de capacidade (K´) do pico do Analito

O fator de capacidade é uma das características que garantem que o analito apresente retenção satisfatória na coluna, ou seja, é separado das moléculas que não são retidas na coluna. O k´ não foi indicado como um fator problemático da metodologia original e em todos os testes realizados até aqui sempre deram valores maiores que 2,5 (a especificação mínima é de 1,0). Por isso, esta variável de saída não é crítica, pois o analito tem boa retenção em coluna de fase reversa. Sendo assim, esse parâmetro não terá sua estatística avaliada a menos que durante as análises apresente algum resultado próximo de 1,0.

5.1.12. Otimização das Respostas

Depois de avaliar todos os resultados obtidos do experimento DOE 01, foi realizado a otimização das respostas utilizando o mesmo software.

O Quadro 33, mostra a solução proposta para a otimização, considerando como meta, valores máximos para recuperação (Rec), resolução (R), número de pratos teóricos (N) e pureza de pico (pureza).

Quadro 33. Solução da otimização dos parâmetros e condições.

Solução	pH	Fluxo	Temperatura	Rec (ajuste)	R (ajuste)	N (ajuste)	Pureza (ajuste)	Desejabilidade composta
1	3,93	1,2	35°C	98,63	2,60	6163	0,9994	0,67

O Quadro 34, mostra os ajustes da predição de múltiplas respostas para a obtenção das melhors condição de temperatura da coluna, fluxo na coluna e pH da fase móvel para alcançar os resultados melhores possíveis de recuperação do analito, resolução do analito com seu pico mais próximo, número de pratos teóricos e pureza do pico do analito.

Quadro 34. Ajustes da predição de múltiplas respostas.

Resposta	Ajuste	EP do ajuste	IC de 95%	IP de 95%
Rec	98,63	0,379	99,77;99,49	96,792;100,486
R	2,60	0,151	2,262;2,947	1,871;3,338
N	6163,1	94,9	5948,1;6377,8	5703,3;6623,0
Pureza	0,9994	0,01	0,9741;1,0248	0,9451;1,0538

5.1.13. Conclusão da otimização das variáveis de entrada pH, fluxo e temperatura da coluna para DOE 01

De acordo com a otimização proposta pelo software, os melhores resultados são obtidos com as seguintes condições: pH da fase móvel 3,9343, fluxo na coluna de 1,2 e temperatura de 35°C na coluna.

5.1.14. Conclusão da análise dos resultados do DOE 01

Ao avaliar o DOE 01, conclui-se que as variáveis que mais interferem nos resultados são pH da fase móvel, fluxo e temperatura na coluna. Os valores ótimos encontrados são, pH de 3,9, fluxo de 1,2 e 35°C. Nessas condições são atendidos os valores de especificação de pratos teóricos (N) ≥ 2000, pureza de pico ≥ 0,98, recuperação ≥ 98,0% (de 98,0 a 102,0%), assimetria ≤ 1,5 e fator de capacidade (k´) ≤ 1,5.

O fator de capacidade e a assimetria apresentaram valores altos em todas as condições testadas, por isso não foi realizada uma análise detalhada para essas variáveis. Os gráficos de contorno só foram avaliados para os parâmetros mais críticos ou relevantes.

A próxima etapa do desenvolvimento deverá levar em consideração os resultados do DOE 01 para o seu planejamento.

5.2. Resultados e Discussão do DOE 02

5.2.1. Resultados obtidos no DOE 02

5.2.1.1. Regressão fatorial: pureza de pico *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda

A Equação 11, representa a regressão fatorial para pureza de pico em relação ás variáveis de entrada volume de injeção (V), coluna (C) e comprimento de onda em nanômetros (ʎ).

$$\text{Pureza} = 98{,}544 + 0{,}718V + 0{,}723C + 0{,}806\lambda - 0{,}756VC - 1{,}001V\lambda - 0{,}723C\lambda + 0{,}818V\lambda \quad \text{Equação 11}$$

Ao avaliar a regressão fatorial pureza de pico *versus* volume de injeção; coluna; comprimento de onda. O Quadro 35, mostra a avaliação dos coeficientes.

Quadro 35. Coeficientes codificados.

Termo	Efeito	Coef	EP de coef	Valor-t	Valor-P
Constante	-	98,544	0,699	140,92	0,000
Vol. Injeção (V)	1,436	0,718	0,699	1,03	0,334
Coluna (C)	1,446	0,723	0,699	1,03	0,331
Comprimento de onda (λ)	1,611	0,806	0,699	1,15	0,283
V x C	-1,511	-0,756	0,699	-1,08	0,311
V x λ	-2,001	-1,001	0,699	-1,43	0,190
C x λ	-1,446	-0,723	0,699	-1,03	0,331
V x C x λ	1,636	0,818	0,699	1,17	0,276

Na segunda coluna (efeito) do Quadro 35, pode ser observado se um efeito é grande ou pequeno, ou se é negativo ou positivo. Se uma variável de entrada tem efeito negativo, o seu aumento provoca diminuição da variável de resposta.

Na terceira coluna do Quadro 35, temos os coeficientes (Coef), que são os coeficientes da Equação 11, com os coeficientes também podemos saber os fatores de mais impacto na variável de saída (neste caso pureza de pico).

Na quarta coluna do Quadro 35, temos o erro padrão do coeficiente (EP de Coef), quanto menor o valor do EP de Coef, menor é o erro e maior é a confiabilidade na previsão dos resultados da regressão, e mais próximos da realidade são os valores dos coeficientes (Coef) da equação de regressão e maior é o poder de previsão da equação de regressão.

Na quinta coluna do Quadro 35, temos o valor-t. O valor-p é calculado usando o valor-t pelo Minitab, e por isso conforme indicação no próprio tutorial deste software, basta avaliar o valor-p para avaliar a significância estatística de um modelo ou dado. Então, seguiremos esse racional para simplificar a avaliação.

Na sexta coluna do Quadro 35, temos o valor-p. Se o valor p de um coeficiente é menor que o nível de significância especificado, como 0,05, a relação entre o preditor e a resposta é estatisticamente significante. Como no nosso caso o valor-p é 0,000, consideramos que o coeficiente 98,544 é altamente significativo na Equação 11.

O Quadro 36, mostra que o modelo é pouco preditivo, pois apresenta R^2(pred) igual a 0,00. Isso ocorre porque o primeiro termo da Equação 11 (a constante 98,544), é muito maior

que todos os outros termos constantes desta equação e também como mostra a coluna 3 do Quadro 35.

Quadro 36. Sumário do modelo para pureza de pico.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
2,79707	53,23%	12,31%	0,00%

O Quadro 37, mostra a análise de variância para pureza de pico. A primeira linha já mostra um valor-p de 0,358 para o modelo de regressão ou seja > 0,05, portanto o modelo é pouco significativo estatisticamente. No mesmo Quadro 37, pode ser observado que todos os valores-p estão acima de 0,05, portanto, nenhuma variável avaliada tem impacto significativo estatisticamente na pureza de pico.

Quadro 37. Análise de variância para pureza de pico.

Fonte	GL	SQ (aj)	QM (aj)	Valor-F	Valor-p
Modelo	7	71,234	10,176	1,30	0,358
Linear	3	27,002	9,001	1,15	0,386
Vol. injeção (V)	1	8,251	8,251	1,05	0,334
Coluna (V)	1	8,367	8,367	1,07	0,331
Comprimento de onda (λ)	1	10,385	10,385	1,33	0,283
Interações de 2 fatores	3	33,522	11,174	1,43	0,305
V x C	1	9,136	9,136	1,17	0,311
V x λ	1	16,020	16,020	2,05	0,190
C x λ	1	8,367	8,367	1,07	0,331
Interações de 3 fatores	1	10,709	10,709	1,37	0,276
V x C x λ	1	10,709	10,709	1,37	0,276
Erro	8	62,589	7,824	1,30	0,358
Total	15	133,823	-	-	-

Se a avaliação do Quadro 37, for feita usando o valor-F, quanto maior for F mais estatisticamente significativa é a variável. Já se a avaliação do Quadro 37, levar em consideração o QM (aj), quanto maior o QM (aj) mais impacto tem a variável de entrada ou as interações entre as variáveis de entrada na variável de saída ou resposta.

O gráfico da Figura 44, mostra que nenhuma variável de entrada sozinha teve influência significativa na pureza de pico.

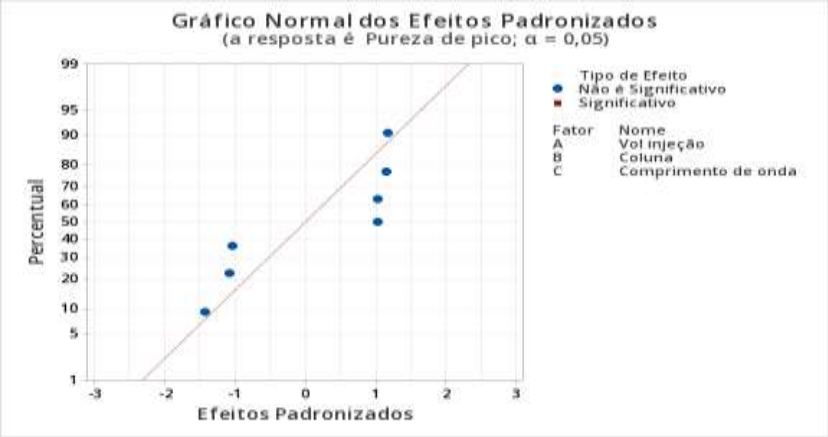

Figura 44. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico.

Ao avaliar a o gráfico de Pareto da Figura 45, e comparando com a coluna de valor-p, do Quadro 35, observa-se que quanto menor o valor-p da tabela, mais deslocados para a direita é a barra do gráfico de Pareto, ou seja, os valores-p concordam com esse gráfico. Isso, explica o porquê nas avaliações anteriores não avaliamos esse tipo de dado, pois não era necessário.

Figura 45. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico.

A avaliação do Quadro 35, para os coeficientes pode substituir ou subsidiar as análises gráficas, porém, nas análises gráficas são bem mais simples, exige menos conhecimento do analista e é muito mais visual. Nas próximas avaliações incluiremos a tabela dos coeficientes codificados como complementar a avaliação gráfica.

A Figura 46, mostra que a maioria dos resíduos apresentaram valores bem próximos de zero. E os resíduos com valores absolutos (sem considerar o sinal positivo ou negativo) maiores

representam uma minoria. Como a pureza de pico não é uma característica linear, esse tipo de comportamento pode ocorrer normalmente.

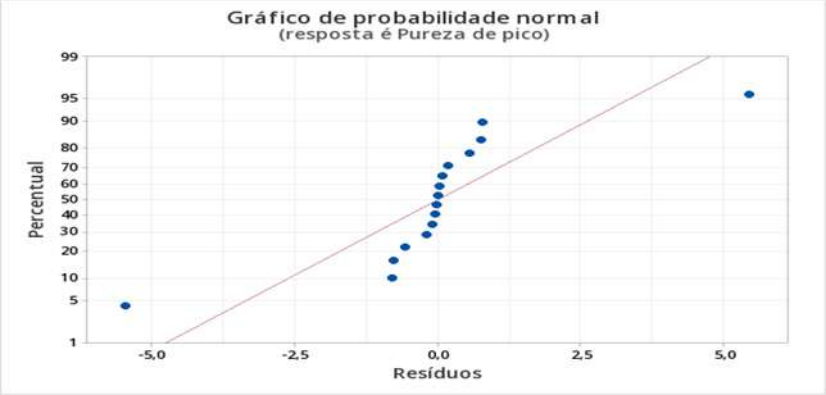

Figura 46. Gráfico de probabilidade normal para pureza de pico.

A Figura 47 mostra que a variabilidade dos resultados é maior quando os resultados de pureza de pico são menores.

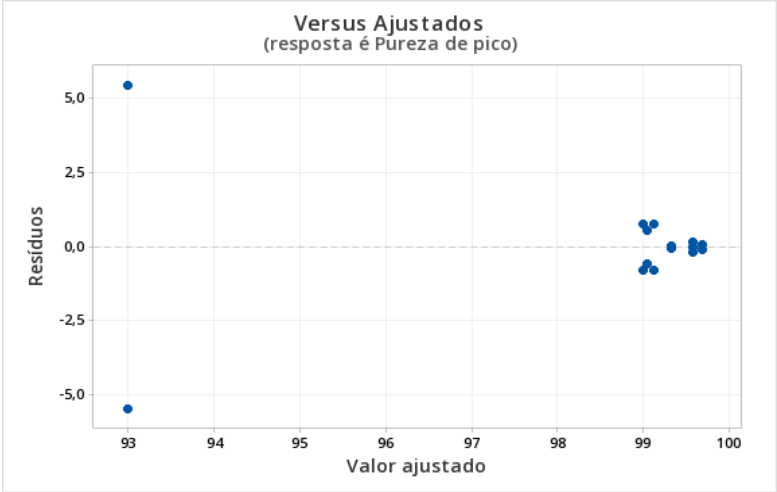

Figura 47. Gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para pureza de pico.

A Figura 48, mostra que a frequência de resíduos é maior para os valores baixos, ou seja, próximos de zero.

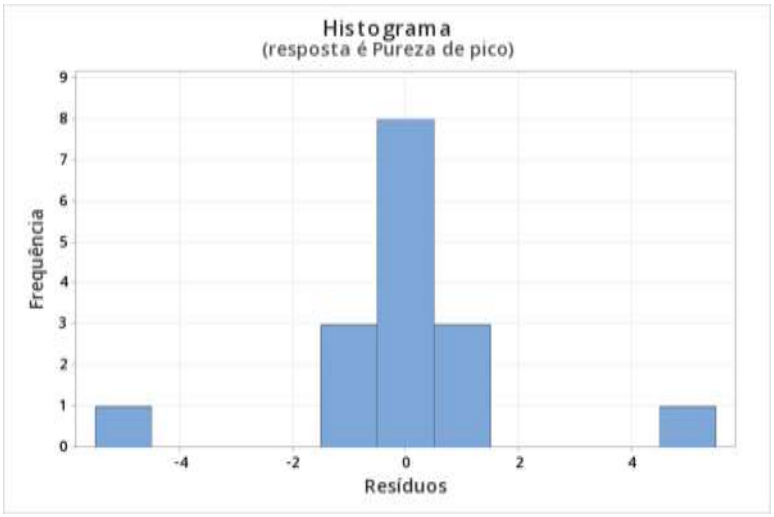

Figura 48. Histograma de frequência dos resíduos para pureza de pico.

Finalmente, o gráfico da Figura 49, mostra que os resultados não foram influenciados pela ordem de injeção, embora o resíduo grande da última injeção possa ser um *outlier*. Quando ocorre tendência ou padrão os pontos do gráfico de resíduos apresenta aspecto de sino.

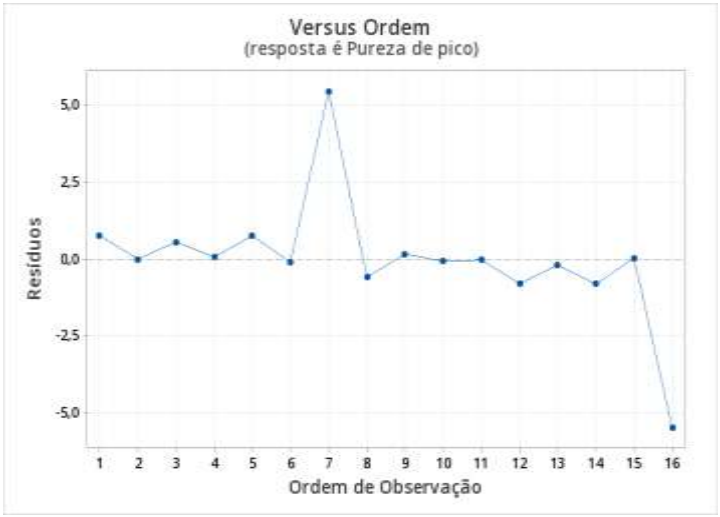

Figura 49. Gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção para pureza de pico.

As próximas avaliações seguirão o mesmo racional explicado nos parágrafos aqui, más de forma resumida, pois todos os itens importantes nas avaliações de tabelas e gráficos foram avaliados.

5.2.1.2. Conclusão da avaliação da pureza no DOE 02

As mudanças de comprimento de onda (230 e 302nm, volume de injeção (15 e 20 µL) e coluna (X-Terra MS 100x4,6 mm 3,5 µm e X-Terra RP 100x4,6 mm 3,5 µm) avaliados do no

DOE 02, não apresentaram significância estatística na pureza de pico, ou seja, não foi verificado impacto relevante. Sendo assim qualquer uma das condições testadas apresenta resultados satisfatório dentro da especificação para esse quesito.

5.2.1.3. Regressão fatorial: recuperação *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda

A Equação 12, representa a regressão fatorial para recuperação em relação às variáveis de entrada volume de injeção (V), coluna cromatográfica (C) e comprimento de onda (ʎ).

$$\text{Rec} = 98{,}218 - 0{,}076\text{V} - 0{,}108\text{C} - 0{,}051\lambda + 0{,}161\text{VC} - 0{,}119\ \text{V}\lambda - 0{,}723\text{C}\lambda - 0{,}112\text{C}\lambda - 0{,}103\text{VC}\lambda \quad \text{Equação 12}$$

Ao avaliar a o Quadro 38, observa-se que a recuperação do analito não sofreu influência dos fatores alterados durante os experimentos do DOE 02. Isso fica bem claro, quando se observa que os valores-p, são todos maiores que 0,05 para as variáveis. O coeficiente 98,218 é muito alto em relação aos outros coeficientes da Equação 12, por isso seu valor-p é de 0,000. Ou seja, a constante da equação é tão alta em relação aos outros coeficientes de modo que os outros coeficientes não apresentem significância estatística. Mas isso não significa que a equação não tem validade.

Quadro 38. Coeficientes Codificados para recuperação.

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P
Constante	-	98,218	0,123	797,46	0,000
Vol injeção (V)	-0,151	-0,076	0,123	-0,61	0,556
Coluna (C)	-0,216	-0,108	0,123	-0,88	0,406
Comprimento de onda (λ)	-0,101	-0,051	0,123	-0,41	0,692
V x C	0,321	0,161	0,123	1,30	0,228
V x C	-0,239	-0,119	0,123	-0,97	0,361
C x λ	-0,224	-0,112	0,123	-0,91	0,390
V x C x λ	-0,206	-0,103	0,123	-0,84	0,427

O R^2(pred) descrito no Quadro 39 é 0,00%, indicando um baixo poder de previsibilidade da Equação 12.

Quadro 39. Sumário do modelo para recuperação.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,492652	40,67%	0,00%	0,00%

Ao analisar a análise de variância para recuperação descrita no Quadro 40, pode ser observado que os resultados de valor-p são muito altos tanto para o modelo matemático quanto para as variáveis e suas interações. Os altos valores-p também indicam a baixa significância estatística. Já os valores-F, estão muito baixos. Quanto mais baixos os valores-F menos estatisticamente significativos são as variáveis de entrada, suas interações (se para elas também esses valores forem baixos) e o mesmo se aplica ao modelo matemático.

Quadro 40. Análise de variância para recuperação.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	QM (Aj.)	Valor-F	Valor-P
Modelo	7	1,33079	0,19011	0,19011	0,78	0,620
Linear	3	0,31957	0,10652	0,10652	0,44	0,731
Vol injeção (V)	1	0,09151	0,09151	0,09151	0,38	0,556
Coluna (C)	1	0,18706	0,18706	0,18706	0,77	0,406
Comprimento de onda (λ)	1	0,04101	0,04101	0,04101	0,17	0,692
Interações de 2 fatores	3	0,84107	0,28036	0,28036	1,16	0,385
V x C	1	0,41281	0,41281	0,41281	1,70	0,228
V x λ	1	0,22801	0,22801	0,22801	0,94	0,361
C x λ	1	0,20026	0,20026	0,20026	0,83	0,390
Interações de 3 fatores	1	0,17016	0,17016	0,17016	0,70	0,427
V x C x λ	1	0,17016	0,17016	0,17016	-	-
Erro	8	1,94165	0,24271	0,24271	-	-
Total	15	3,27244	-	-	-	-

A Figura 50, mostra o gráfico normal dos efeitos padronizados. De acordo com esse gráfico, nenhuma das variáveis testadas teve significância estatística na variação da resposta recuperação, considerando um intervalo de confiança de $\alpha = 0,05$.

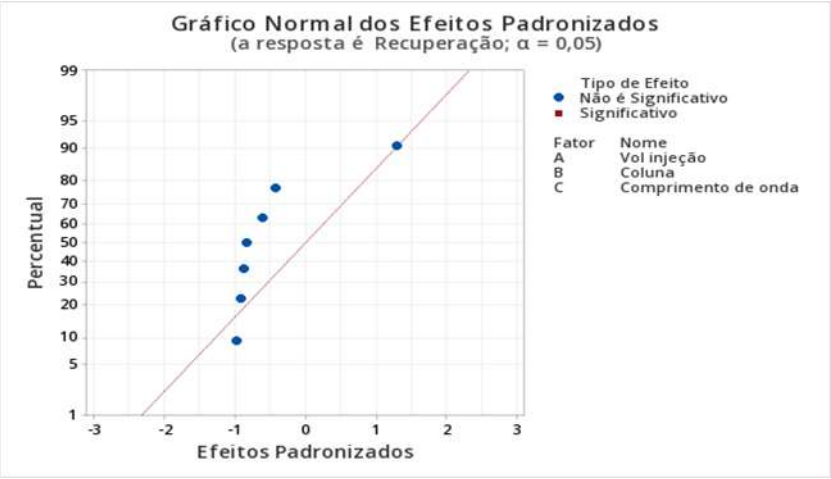

Figura 50. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação.

Ao avaliar a Figura 51. A linha pontilhada indicando 2,306, representa o ponto a partir do qual um efeito se torna estatisticamente significativo dentro de um intervalo de confiança α = 0,05. Neste caso, é bem visível que nenhuma das variáveis testadas apresentou alteração na variável de saída recuperação. O mesmo vale para as interações entre as variáveis.

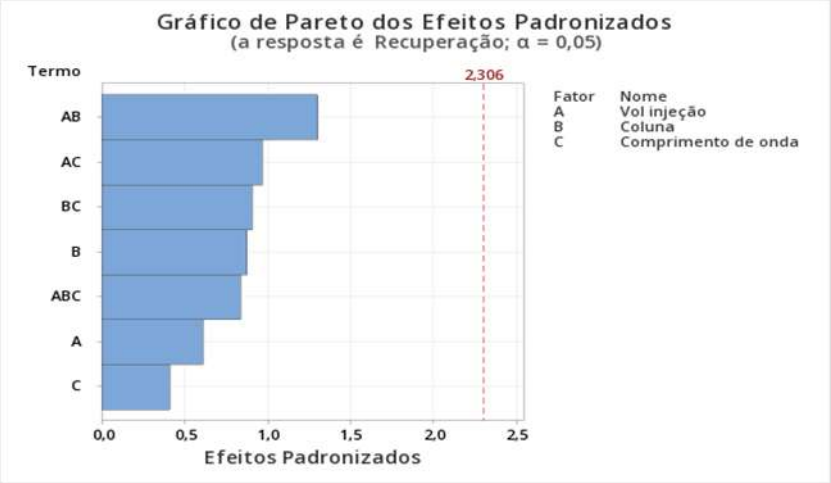

Figura 51. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação.

A Figura 52, mostra o gráfico de probabilidade normal para a análise de resíduos da recuperação. Como recuperação é uma propriedade linear, é esperado que o gráfico de resíduos apresente os pontos distribuídos próximos a linha da normalidade mostrada. Este gráfico evidencia, que os maiores resultados de resíduos foram obtidos para os resultados altos e baixos de recuperação, mas de um modo geral foram bem distribuídos.

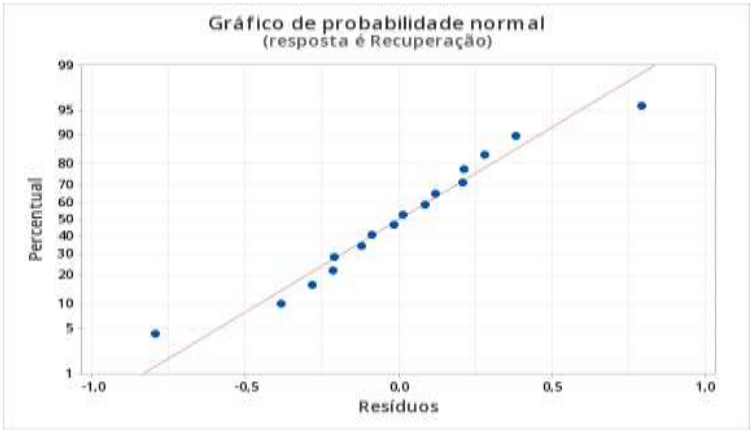

Figura 52. Gráfico de probabilidade normal para recuperação.

A Figura 53, mostra a dispersão dos resíduos referentes às respostas obtidas. Mostrando que não houve tendências.

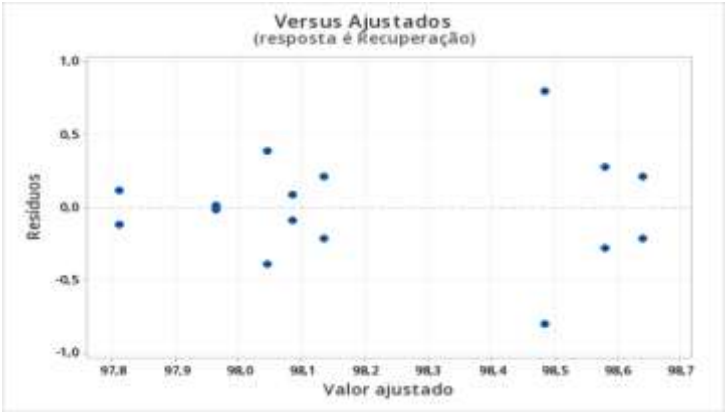

Figura 53. Gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para recuperação.

A Figura 54, mostra o histograma de frequência de resíduos para recuperação, indicando que a maioria dos resíduos apresentaram valores próximos de zero.

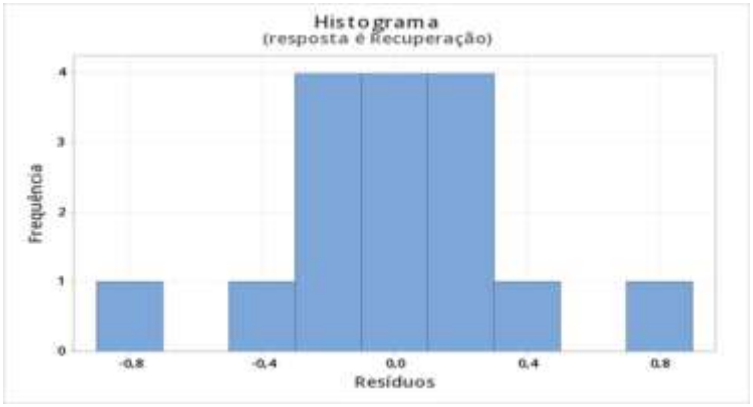

Figura 54. Histograma de frequência de resíduos para recuperação.

A Figura 55, mostra o gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção. Esse gráfico mostra que a ordem de injeção não interfere nos resultados. Quando há interferência o formato é similar a um sino. Portanto os resultados estão satisfatórios nesse aspecto.

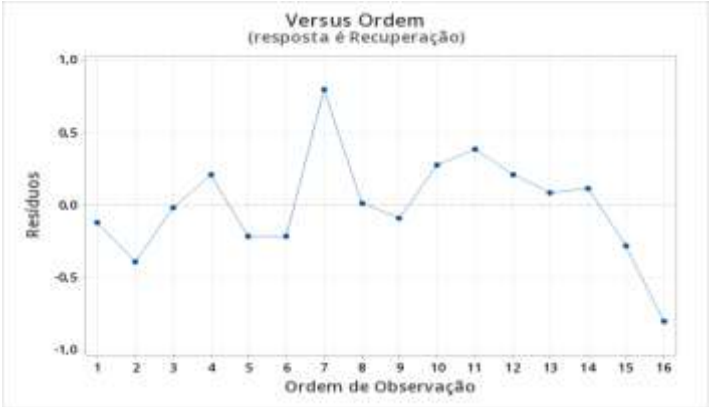

Figura 55. Gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção para recuperação.

5.2.1.4. Conclusão da avaliação da pureza no DOE 02

As mudanças de comprimento de onda (230 e 302nm, volume de injeção (15 e 20 µL) e coluna (X-Terra MS 100x4,6 mm 3,5 µm e X-Terra RP 100x4,6 mm 3,5 µm) avaliados do no DOE 02, não apresentaram significância estatística na recuperação, ou seja, não foi verificado impacto relevante. Sendo assim qualquer uma das condições testadas apresenta resultados satisfatório dentro da especificação para esse quesito.

5.2.1.5. Regressão fatorial: assimetria *versus* volume injeção; coluna; comprimento de onda

A Equação 13, representa a equação de regressão fatorial para assimetria em relação às variáveis de entrada volume de injeção (V), coluna (C), e comprimento de onda (ʎ).

$$\begin{aligned}\text{Assimetria} = {} & 1{,}3662 + 0{,}0087\text{V} - 0{,}0413\text{C} - 0{,}00121\lambda \\ & + 0{,}0388\text{VC} + 0{,}0{,}0188\text{V}\lambda + 0{,}0087\text{C}\lambda - 0{,}0488\text{VC} \\ & - 0{,}103\text{VC}\lambda\end{aligned} \qquad \text{Equação 13}$$

No Quadro 41, os valores-p são altos para todas as variáveis, com exceção do valor 0,00 para a constante da equação. Quanto menor os valores-p, de uma variável, maior é sua significância estatística. Apenas a constante da equação apresentou valor-p menor que 0,05, logo ela causa mais impacto nos resultados que cada variável sozinha e até mais que as interações entre variáveis. Nenhuma variável de entrada individual apresentou influência na variável de saída assimetria. Porém, a interação entre comprimento de onda, volume de injeção e tipo de coluna (V x C x λ) apresentou valor-p de 0,05 ou seja a influência está no limite de ser relevante ou não.

Conforme mostra a Figura 95, a ordem de execução das injeções não provoca tendência ou ocorrência de algum padrão de nos resultados. A Figura 95, também mostra que não foi foram verificados outliers nem resíduos muito altos.

Quadro 41. Coeficientes codificados para assimetria.

Termo	Efeito	Coef	EP de Coef	Valor-T	Valor-P
Constante	-	1,3662	0,0211	64,74	0,000
Vol injeção (V)	0,0175	0,0087	0,0211	0,41	0,689
Coluna (C)	-0,0825	-0,0413	0,0211	-1,95	0,086
Comprimento de onda (λ)	-0,0025	-0,0012	0,0211	-0,06	0,954
V x C	0,0775	0,0388	0,0211	1,84	0,104
V x λ	0,0375	0,0188	0,0211	0,89	0,400
C x λ	0,0175	0,0087	0,0211	0,41	0,689
V x C x λ	-0,0975	-0,0488	0,0211	-2,31	0,050

O Quadro 42, mostra o sumário do modelo da equação de regressão para assimetria. Como pode ser verificado, o R^2 (pred) é de 0,00%, ou seja, a Equação 13 apresenta baixo poder de predição.

Quadro 42. Sumário do modelo para assimetria.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,0844097	63,08%	30,77%	0,00%

Quanto a análise de variância, mostrada no Quadro 43, fica evidente que o modelo matemático da Equação 13, é pouco preditivo pois apresenta um valor-p de 0,184 e apenas a interação V x C x λ não apresenta valor-p maior que 0,05. Ou seja, embora o poder de predição do modelo seja baixo, a interação entre volume de injeção, coluna e comprimento de onda apresentam a maior relevância estatística, causando a maior variação nos resultados.

Quadro 43. Análise de Variância para assimetria.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	0,097375	0,013911	1,95	0,184
Linear	3	0,028475	0,009492	1,33	0,330
Vol injeção (V)	1	0,001225	0,001225	0,17	0,689
Coluna (C)	1	0,027225	0,027225	3,82	0,086
Comprimento de onda (λ)	1	0,000025	0,000025	0,00	0,954
Interações de 2 fatores	3	0,030875	0,010292	1,44	0,300
V x C	1	0,024025	0,024025	3,37	0,104
V x λ	1	0,005625	0,005625	0,79	0,400
C x λ	1	0,001225	0,001225	0,17	0,689
Interações de 3 fatores	1	0,038025	0,038025	5,34	0,050
V x C x λ	1	0,038025	0,038025	5,34	0,050
Erro	8	0,057000	0,007125	-	-
Total	15	0,154375	-	-	-

O gráfico normal dos efeitos padronizados para assimetria da Figura 56, mostra que nenhuma das variáveis de entrada, quando avaliadas individualmente provocou interferência estatisticamente significativa nos resultados de assimetria. Já a interação entre as variáveis volume de injeção, coluna e comprimento de onda foi estatisticamente significativa dentro do intervalo de confiança α = 0,05.

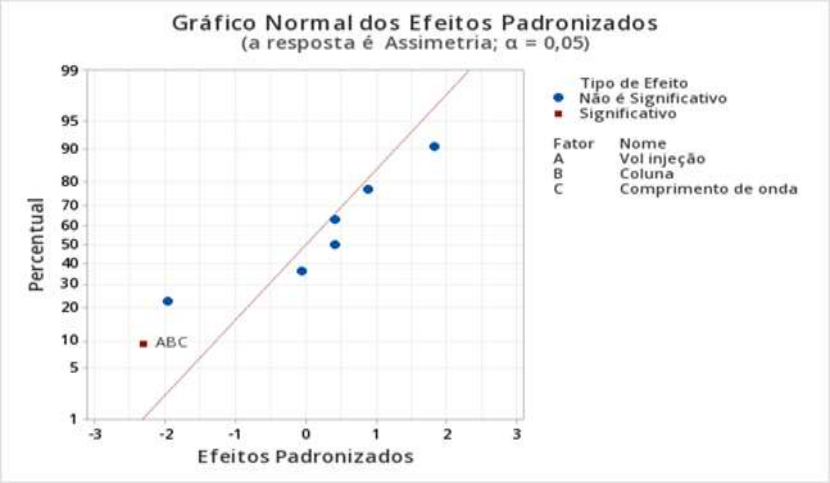

Figura 56. Gráfico normal dos efeitos padronizados para assimetria.

O gráfico de Pareto da Figura 57, mostra que nenhuma variável individual apresentou interferência estatisticamente significativa nos resultados de assimetria. Porém, a interação entre as variáveis de entrada volume de injeção, coluna e comprimento de onda é estatisticamente significativa, más no limiar de significância considerando um intervalo de confiança de α = 0,05.

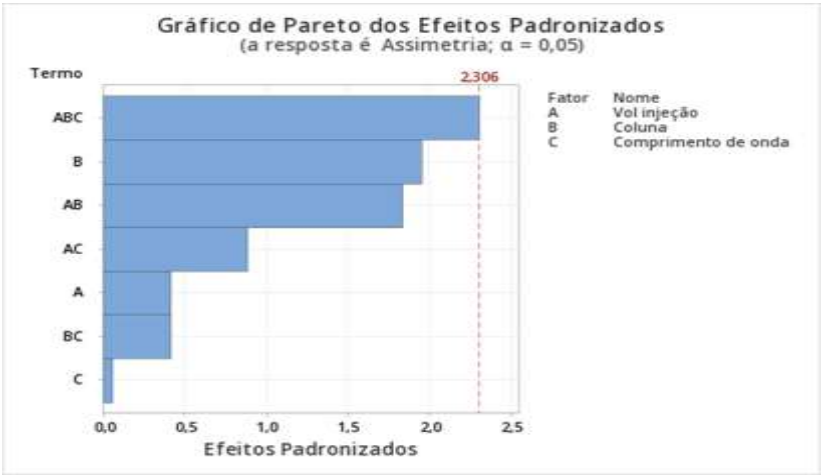

Figura 57. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para assimetria.

A Figura 58, mostra o gráfico de probabilidade normal dos resíduos para assimetria. Os resultados estão distribuídos próximos da linha indicando normalidade nos resultados.

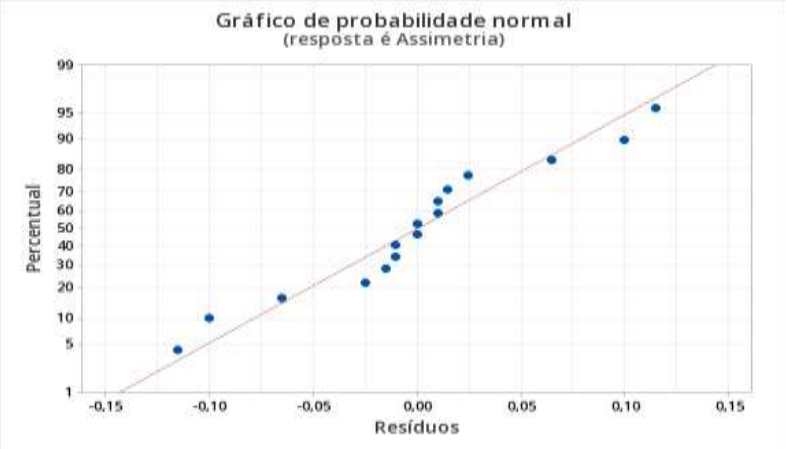

Figura 58. Gráfico de probabilidade normal para assimetria.

A Figura 59, mostra o gráfico de resíduos *versus* valores ajustados para assimetria. Os resultados estão bem dispersos no gráfico não mostrando nenhum tipo de tendência.

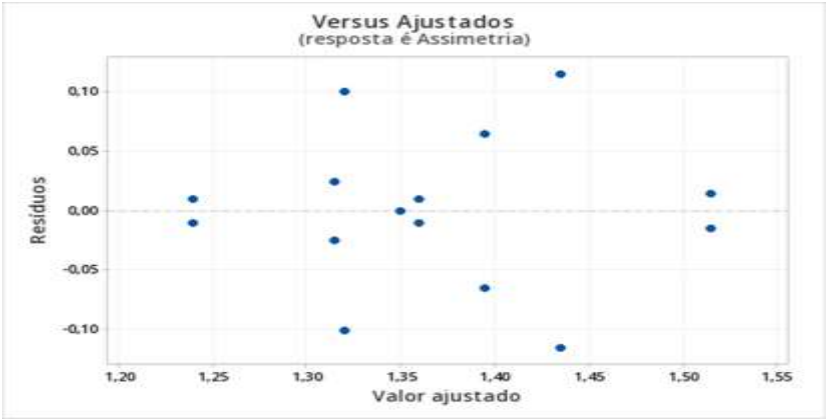

Figura 59. Gráfico de resíduos *versus* valores ajustados para assimetria.

A Figura 60, mostra o histograma de frequência de resíduos para assimetria. De acordo com a análise gráfica a grande maioria dos resíduos apresentados foram próximos de zero, isso indica uma alta reprodutibilidade nos resultados para essa variável de saída.

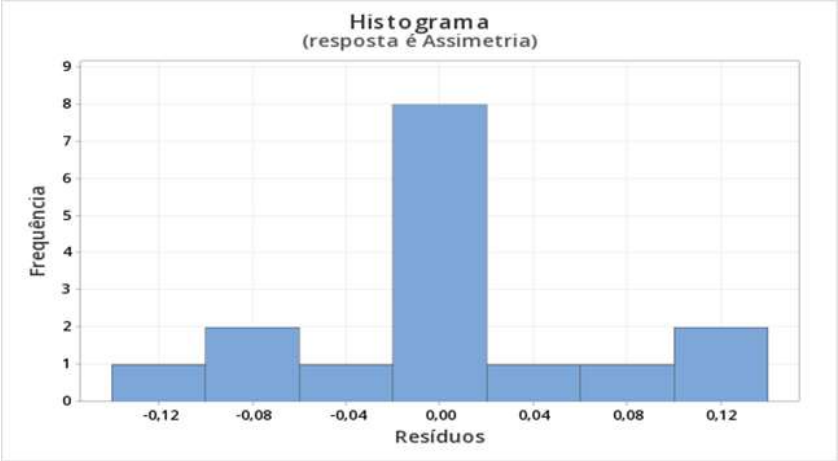

Figura 60. Histograma de frequência de resíduos para assimetria.

A Figura 61, mostra o gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção das amostras. Como os resultados estão bem aleatórios não mostrando tendências, então a ordem de injeção não interfere nos resultados obtidos para assimetria.

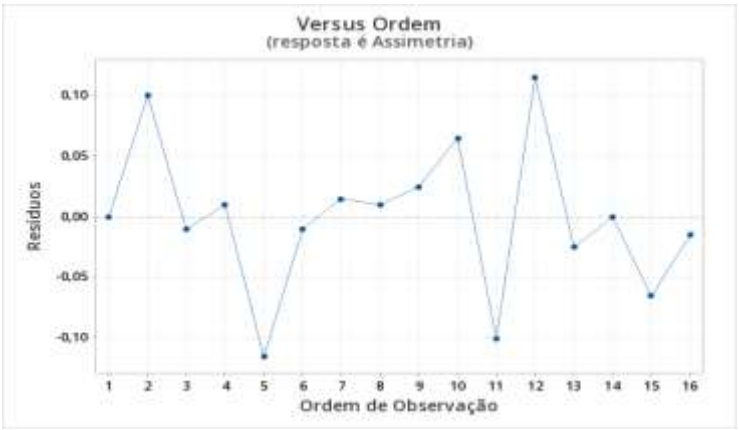

Figura 61. Gráfico de resíduos *versus* ordem de observação para assimetria.

5.2.1.6. Conclusão da avalição de assimetria no DOE 02

As mudanças de comprimento de onda (230 e 302nm, volume de injeção (15 e 20 µL) e coluna (X-Terra MS 100x4,6 mm 3,5 µm e X-Terra RP 100x4,6 mm 3,5 µm) avaliados do no DOE 02, não apresentaram significância estatística na assimetria de pico, ou seja, não foi verificado impacto relevante. Nenhuma variável de entrada individual apresentou alteração significativa na resposta, porém a interação entre elas apresentou uma interferência no limite entre a significância e não significância estatística. Sendo assim qualquer uma das condições testadas apresenta resultados satisfatório dentro da especificação para esse quesito.

5.2.1.7. Regressão fatorial: resolução *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda

A Equação 14, mostra a regressão fatorial para resolução em relação às variáveis de entrada volume de injeção, coluna e comprimento de onda.

$$\text{Resolução} = 4{,}919 + 0{,}013\text{V} - 0{,}761\text{C} - 0{,}042\lambda + 0{,}078\text{VC} - 0{,}206\text{V}\lambda + 0{,}026\text{C}\lambda - 0{,}203\text{VC}\lambda \quad \text{Equação 14}$$

O Quadro 44, mostra os coeficientes codificados referentes à Equação 14. Ao avaliar os resultados observa-se que o valor-p para a constante da equação é 0,000. Ou seja, a constante 4,919 é altamente significativa nesta equação, pois é menor que 0,05 (intervalo de confiança de 5%).

Outra observação importante é que o valor-p para a variável coluna é 0,001 ou seja, a variável coluna (C) na Equação 14, é bem menor que 0,05. Portanto a variável coluna interfere estatisticamente na variável de saída resolução. Isso pode ser observado também ao fazer uma avaliação visual da equação pois o fator que multiplica por C só é menor que a constante sendo maior que todos os outros fatores presentes na equação.

Outra observação importante é que a interação entre as variáveis apresentou interferência sem significância estatística pois em todos os casos apresentaram valor-p bem maiores que 0,05 (intervalo de confiança de 5%).

Quadro 44. Coeficientes Codificados para resolução.

Termo	Efeito	Coeficiente	EP de Coef	Valor-t	Valor-p
Constante		4,919	0,156	31,46	0,000
Vol injeção (V)	0,026	0,013	0,156	0,08	0,935
Coluna (C)	-1,521	-0,761	0,156	-4,86	0,001
Comprimento de onda (λ)	-0,084	-0,042	0,156	-0,27	0,796
V x C	0,156	0,078	0,156	0,50	0,631
V x λ	-0,411	-0,206	0,156	-1,31	0,225
C x λ	0,051	0,026	0,156	0,16	0,874
V x C x λ	-0,406	-0,203	0,156	-1,30	0,230

Ao avaliar o sumário do modelo matemático referente a equação 14, descrito no Quadro 45, observa-se que o poder de predição desta equação é baixo, sendo de 9,67%. O baixo valor de R^2(pred) obtido ocorreu principalmente devido aos baixos valores da maioria dos coeficientes da equação. Deste modo a parte da equação com maior impacto no resultado é a própria constante 4,919.

Quadro 45. Sumário do modelo para resolução.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,625565	77,42%	57,66%	9,67%

Ao avaliar o Quadro 46, observa-se que o valor-p para o modelo matemático é de 0,037. Ou seja, é um pouco alto para esta situação, embora esteja menor que 0,05 (intervalo de confiança de 5%). Desta forma o poder de predição da equação para resolução não é alto.

Ainda no mesmo quadro, os valores de QM (aj) e F são altos para coluna (C), indicando que a coluna é uma variável de entrada que interfere de forma estatisticamente significativa na variável de saída resolução. Pode-se chegar a mesma conclusão avaliando o valor-p para a variável de entrada coluna, que é de 0,001 ou seja, muito menor que o intervalo de confiança de 5%.

Quadro 46. Análise de variância para resolução.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor-F	Valor-P
Modelo	7	10,7324	1,53321	3,92	0,037
Linear	3	9,2876	3,09587	7,91	0,009
Vol injeção (V)	1	0,0028	0,00276	0,01	0,935
Coluna (C)	1	9,2568	9,25681	23,65	0,001
Comprimento de onda (λ)	1	0,0281	0,02806	0,07	0,796
Interações de 2 fatores	3	0,7847	0,26156	0,67	0,595
V x C	1	0,0977	0,09766	0,25	0,631
V x λ	1	0,6765	0,67651	1,73	0,225
C x λ	1	0,0105	0,01051	0,03	0,874
Interações de 3 fatores	1	0,6602	0,66016	1,69	0,230
V x C x λ	1	0,6602	0,66016	1,69	0,230
Erro	8	3,1307	0,39133	-	-
Total	15	13,8631	-	-	-

Ao avaliar a Figura 62, observa-se que apenas a variável de entrada coluna, apresentou alteração com significância estatística na variável de saída resolução, num intervalo de confiança de $\alpha = 0,05$. As interações entre as variáveis de entrada também não apresentaram interferência estatisticamente significativa na resolução.

Figura 62. Gráfico normal dos efeitos padronizados para resolução.

A Figura 63, mostra o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados. Observa-se que apenas a variável de entrada coluna, apresentou alteração com significância estatística na variável de saída resolução, num intervalo de confiança de α = 0,05 (o valor 2,306 representa 0,05). As interações entre as variáveis de entrada também não apresentaram interferência estatisticamente significativa na resolução.

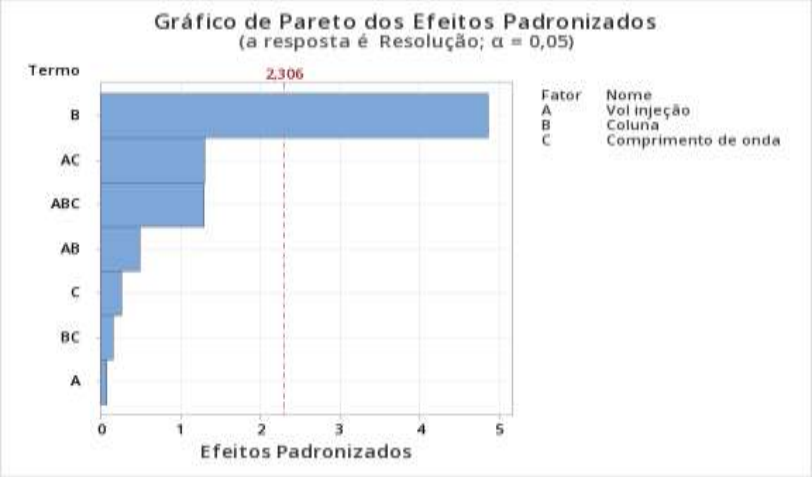

Figura 63. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para resolução.

A Figura 64, mostra o gráfico de probabilidade normal para resolução. Observa-se neste gráfico que os resíduos se distribuem bem próximos a linha inclinada. Quando isso acontece, pode-se dizer que os resultados apresentam normalidade. A condição mais ideal é a que os resultados estejam em cima ou bem próximos da linha inclinada.

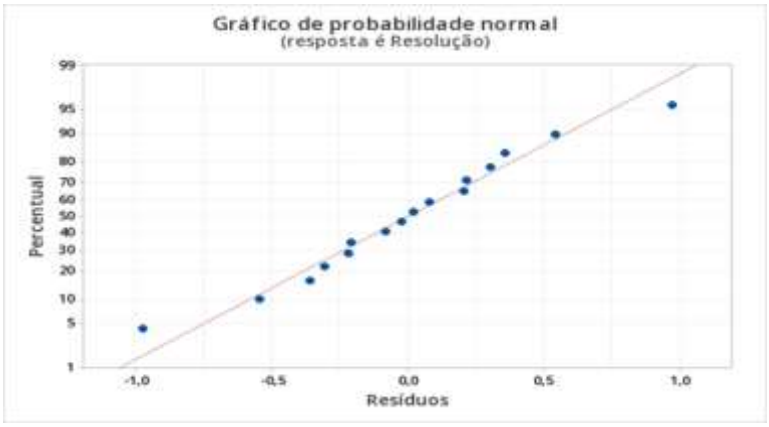

Figura 64. Gráfico de probabilidade normal para resolução.

A Figura 65, mostra o gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para a variável resolução. Observa-se que os resultados estão distribuídos de forma aleatória, isso significa que os resíduos não apresentaram tendências.

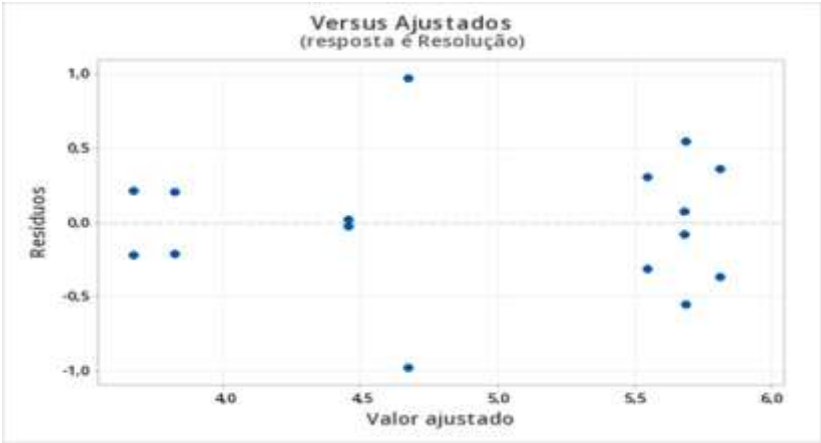

Figura 65. Gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para resolução.

A Figura 66, mostra o histograma de frequência de resíduos para a variável de saída resolução. Observa-se, que a maioria das ocorrências de resíduos estão próximos do valor zero, indicando que os resultados apresentaram baixa variabilidade.

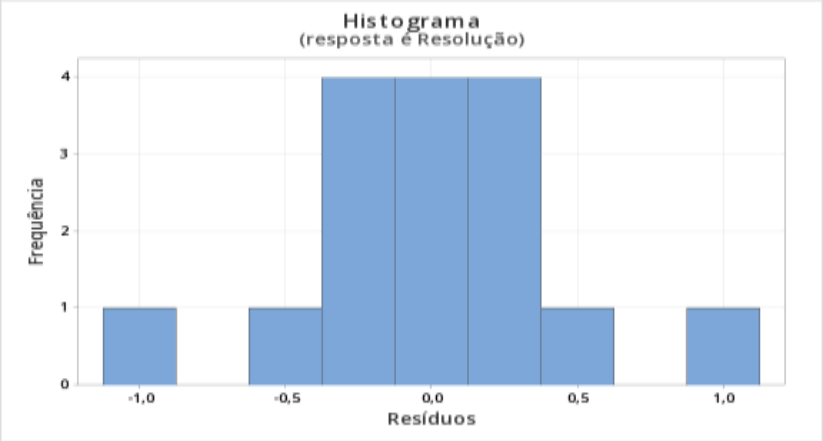

Figura 66. Histograma de frequência de resíduos para resolução.

A Figura 67, mostra o gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção para a variável resolução. Observa-se nesta figura que a ordem de injeção não interfere nos resultados.

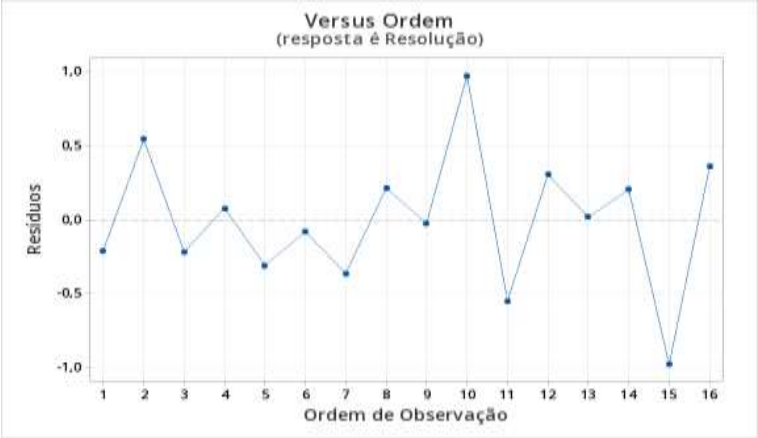

Figura 67. Gráfico de resíduos *versus* ordem de observação.

5.2.1.8. Conclusão da avaliação dos resultados de resolução

A resolução entre o pico do analito e o pico secundário mais próximo, sofre interferência estatisticamente significativa na troca de uma coluna X-Terra RP 18 100x4,6 mm 5 µm por uma coluna X-Terra MS 18 100x4,6 mm 5 µm.

5.2.1.9. Regressão fatorial: pratos teóricos *versus* vol injeção; coluna; comprimento de onda

A Equação 15, mostra o modelo matemático de regressão fatorial para pratos teóricos em relação às variáveis volume de injeção (V), coluna (C) e comprimento de onda (λ).

$$N = 3965{,}6 + 6{,}4V + 545{,}6C - 239{,}5\lambda - 157{,}1VC - 57{,}7V\lambda + 295{,}2C\lambda \quad \text{Equação 15}$$

O Quadro 47, mostra os coeficientes codificados para pratos teóricos. Ao avaliar os resultados deste quadro observa-se que o valor-p da constante 3965,6 é de 0,000. Indicando que esta constante provoca grande interferência nos resultados de pratos teóricos (N) quando as variáveis de entrada são volume de injeção, coluna e comprimento de onda.

Ao avaliar os resultados obtidos de valor-p para as variáveis de entrada e para suas interações verifica-se que a coluna, o comprimento de onda e a interação entre comprimento de onda e coluna apresentam valores-p menores que 0,05 (intervalo de confiança de 5%). Portanto essas variáveis de entrada interferem de forma estatisticamente significativas no número de pratos teóricos.

Quadro 47. Coeficientes codificados para pratos teóricos.

Termo	Efeito	Coeficiente	EP de Coeficiente	Valor-t	Valor-p
Constante	-	3965,6	75,5	52,55	0,000
Vol injeção (V)	12,8	6,4	75,5	0,08	0,935
Coluna (C)	1091,3	545,6	75,5	7,23	0,000
Comprimento de onda (λ)	-479,0	-239,5	75,5	-3,17	0,013
V x C	-314,3	-157,1	75,5	-2,08	0,071
V x λ	-115,5	-57,7	75,5	-0,77	0,466
C x λ	590,5	295,2	75,5	3,91	0,004
V x C x λ	143,0	71,5	75,5	0,95	0,371

O sumário do modelo para número de pratos teóricos é descrito no Quadro 48. O valor de R^2 (pred) é de 65,02% indicando que a Equação 15, tem um poder de predição razoável.

Quadro 48. Sumário do modelo para pratos teóricos.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
301,861	91,25%	83,60%	65,02%

Na avaliação da análise de variância para pratos teóricos, mostrada no Quadro 49, observa-se que o valor-p para o modelo é de 0,001. Indicando que o o modelo tem relevância estatística para o cálculo em da variável em questão.

Ao analisar os valores-p para as variáveis de entrada coluna, comprimento de onda e para as interações entre comprimento de onda e coluna observa-se que possuem valor-p

menores que 0,05. Estes valores indicam que estas variáveis de entrada interferem significativamente sob o ponto de vista estatístico no número de pratos teóricos.

Já as variáveis volume de injeção, interação entre volume de injeção com coluna, interação entre volume de injeção com comprimento de onda e também as interações entre volume de injeção com comprimento de onda com coluna, apresentam valores-p maiores que 0,05, ou seja, não são estatisticamente significativas.

Na análise de variância, os dados podem ser avaliados também através de outras colunas da tabela. Se na avaliação for usado o valor-F, o raciocínio é o oposto, ou seja, quanto maior o valor-F mais estatisticamente significativa é a variável ou a interação. É mais comum em DOE a utilização do p-valor.

Quadro 49. Análise de variância para pratos teóricos.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor-F	Valor-P
Modelo	7	7606651	1086664	11,93	0,001
Linear	3	5681721	1893907	20,78	0,000
Vol injeção (V)	1	650	650	0,01	0,935
Coluna (C)	1	4763306	4763306	52,28	0,000
Comprimento de onda (λ)	1	917764	917764	10,07	0,013
Interações de 2 fatores	3	1843134	614378	6,74	0,014
V x C	1	395012	395012	4,34	0,071
V x λ	1	53361	53361	0,59	0,466
C x λ	1	1394761	1394761	15,31	0,004
Interações de 3 fatores	1	81796	81796	0,90	0,371
V x C x λ	1	81796	81796	0,90	0,371
Erro	8	728961	91120	-	-
Total	15	8335612	-	-	-

Ao avaliar a Figura 68, observa-se que apenas as variáveis comprimento de onda, coluna e a interação entre coluna com comprimento de onda interferem significativamente no número de pratos teóricos sob o ponto de vista estatístico, considerando um intervalo de confiança de $\alpha = 0,05$ (5%).

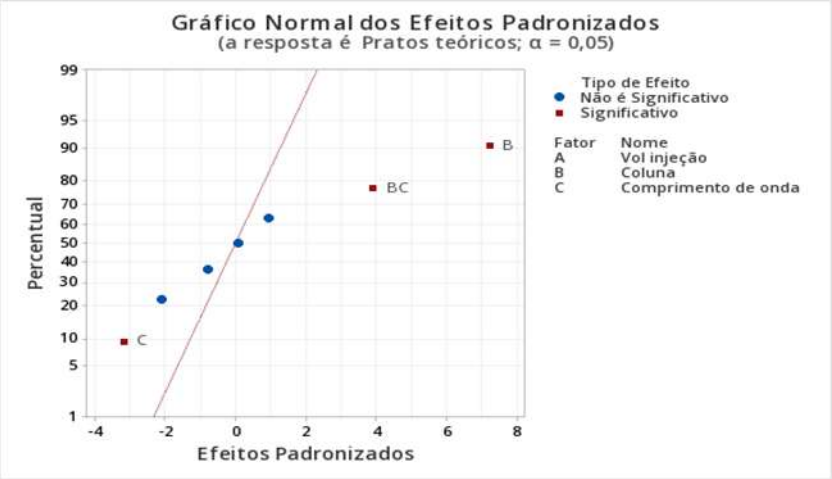

Figura 68. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pratos teóricos (N).

O gráfico de Pareto da Figura 69, mostra que apenas as variáveis comprimento de onda, coluna e a interação entre coluna com comprimento de onda interferem significativamente no número de pratos teóricos sob o ponto de vista estatístico, considerando um intervalo de confiança de α = 0,05 (5%). Neste caso 0,05 é representado pelo valor 2,306, indicado na linha tracejada. Se a barra atingir um valor igual ou maior que 2,306 a variável ou interação tem significância estatística.

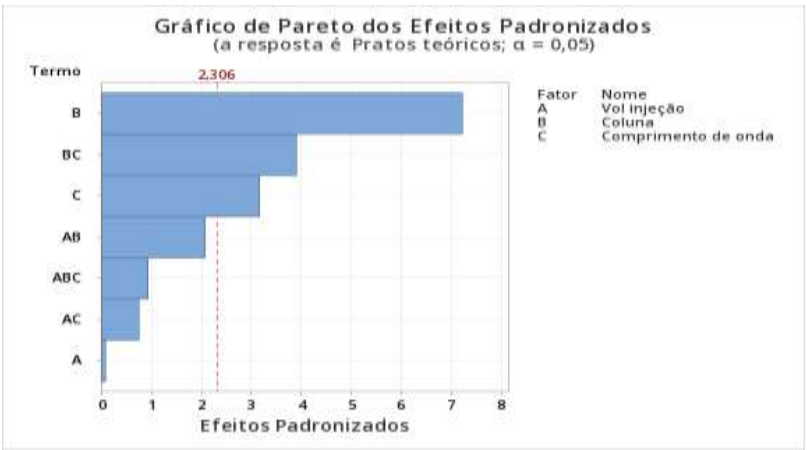

Figura 69. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pratos teóricos (N).

A Figura 70, mostra o gráfico de probabilidade normal para pratos teóricos. Os resíduos estão distribuídos bem próximos da linha inclinada. Quanto mais próximos da linha estiverem os pontos mais normais estão os resíduos. Normal significa dentro da curva gaussiana de distribuição. É desejável este tipo de comportamento nas análises de resíduos.

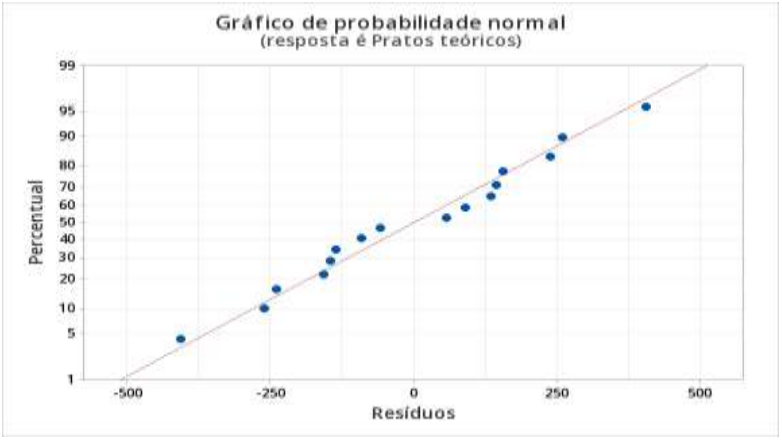

Figura 70. Gráfico de probabilidade normal para pratos teóricos (N).

A Figura 71, mostra o gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para pratos teóricos. Indicando que os resíduos não apresentaram tendências, pois apresentam valores baixos no início e no fim do gráfico.

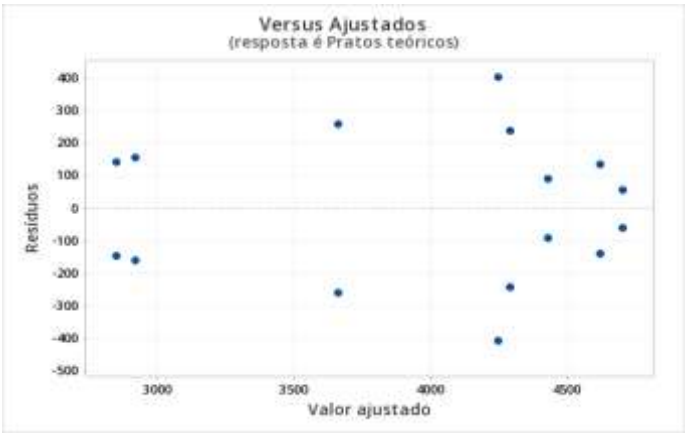

Figura 71. Gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para pratos teóricos (N).

A Figura 72, mostra o histograma de frequência dos resíduos para pratos teóricos. Este gráfico mostra que a grande maioria dos resíduos apresentaram resultados próximos de zero, indicando baixa variabilidade nos resultados. Isso é muito bom, pois indica alta reprodutibilidade e robustez quando a variável de saída é número de pratos teóricos.

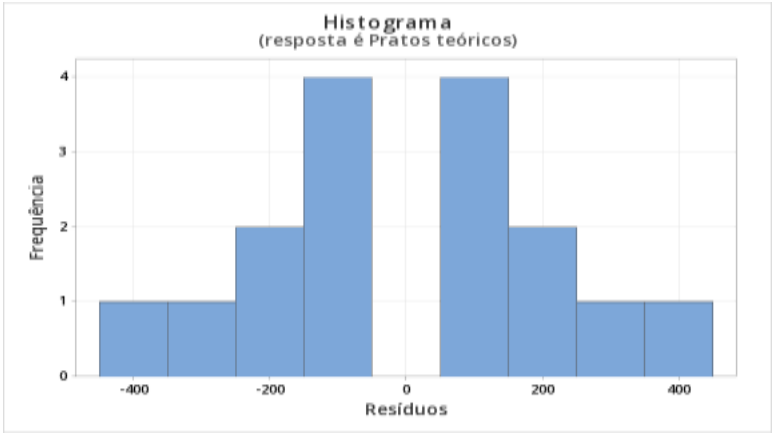

Figura 72. Histograma de frequência dos resíduos para pratos teóricos (N).

A Figura 73, mostra o gráfico de resíduos *versus* frequência de observação para pratos teóricos. Os resultados mostrados neste gráfico, indicam que a ordem de injeção não apresenta interferência nos resultados de pratos teóricos.

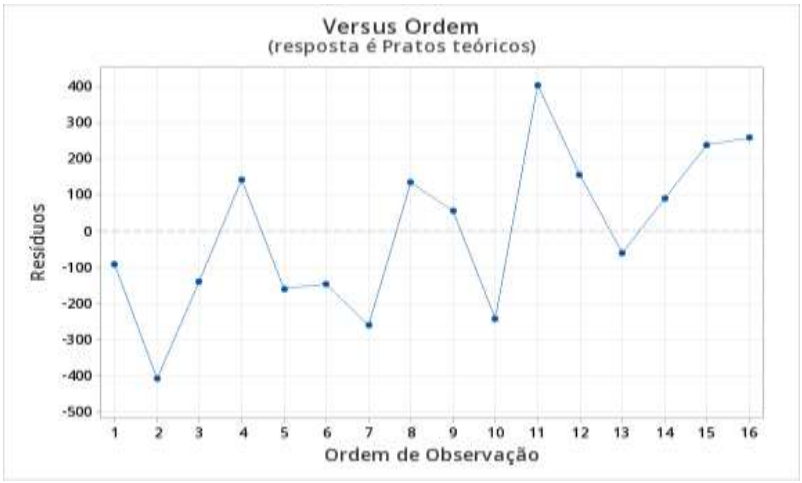

Figura 73. Gráfico de resíduos *versus* frequência de observação para pratos teóricos (N).

Na Figura 74, são mostrados os gráficos fatoriais para pratos teóricos. A avaliação por esse tipo de gráfico é bem visual, porém não mostra a significância dos resultados sob o ponto de vista estatístico.

Pode-se observar que a mudança do volume de injeção de 15 µL para 20 µL praticamente não alterou o número de pratos teóricos. Já a troca de uma coluna X-Terra RP18 por uma X-Terra MS18 de mesmas dimensões provocou um aumento em mais de 1000 unidades no número de pratos teóricos mostrando que a segunda coluna é a mais indicada para essa metodologia analítica. Já a mudança de comprimento de onda de 230 nm para 302 nm provocou uma queda de 500 unidades no número de pratos teóricos. Porém na escolha das melhores condições deve ser avaliado também outras variáveis além do número de pratos

teóricos, tentando escolher a que resolva principalmente os problemas das variáveis de saída mais críticas.

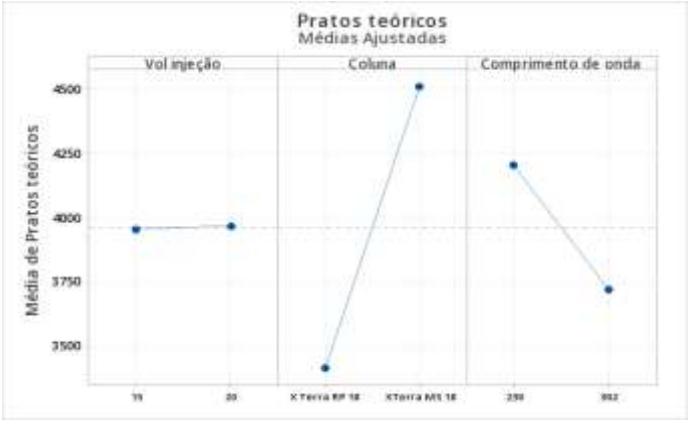

Figura 74. Gráficos fatoriais para pratos teóricos (N).

O gráfico fatorial da Figura 75, mostra a comparação do comportamento no número de pratos teóricos quando os fatores, coluna e volume de injeção foram variados.

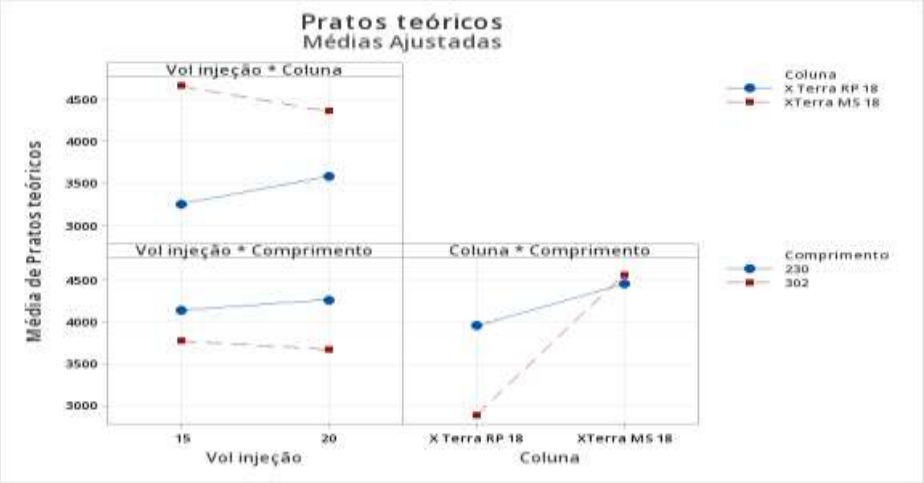

Figura 75. Gráficos fatoriais comparativos para pratos teóricos (N).

5.2.1.10. Conclusão da avaliação de número de pratos teóricos (N)

Mudanças nas variáveis de entrada coluna, comprimento de onda e comprimento de onda*coluna, provoca variação estatisticamente relevante na resposta pratos teóricos.

5.2.1.11. Otimização da resposta: pratos teóricos; resolução; recuperação; pureza de pico

Os Quadros 50, 51 e 52 mostram os resultados da otimização das condições das variáveis de entrada, volume de injeção, tipo de coluna e comprimento de onda para a obtenção

dos melhores resultados (em relação as especificações) de número de pratos teóricos (N), resolução (R), recuperação (Rec) e pureza de pico.

A melhor condição para que seja obtido os melhores valores de número de pratos, resolução do pico do analito com o pico mais próximo, recuperação do analito e pureza de pico foi com a coluna X-Terra MS 18 100x4,6 mm 5 µm, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 230 nm.

O Quadro 50, mostra solução da otimização para N, R, Rec e pureza de pico.

Quadro 50. Solução da otimização para N, R, Rec e pureza de pico.

Solução	Volume injeção	Coluna	λ	N Ajuste	R Ajuste	Rec Ajuste	Pureza Ajuste	Desirability Composta
1	20 µL	X-Terra MS 18	230	4291	4,675	98,58	99,33	0,653916

O Quadro 51, mostra as condições de otimização de Múltiplas Respostas para N, R, Rec e pureza de pico.

Quadro 51. Condições de otimização de Múltiplas Respostas para N, R, Rec e pureza de pico.

Variável	Configuração
Volume de injeção	20 µL
Coluna	X-Terra MS 18
Comprimento de onda (λ)	230 nm

O Quadro 52, mostra os resultados de predição de múltiplas respostas para N, R, Rec e pureza de pico.

Quadro 52. Predição de múltiplas respostas para N, R, Rec e pureza de pico.

Resposta	Ajuste	EP do ajustado	IC de 95%	IP de 95%
Pratos teóricos	4291	213	(3799; 4783)	(3438; 5144)
Resolução	4,675	0,442	(3,655; 5,695)	(2,908; 6,442)
Recuperação	98,580	0,348	(97,777; 99,383)	(97,189; 99,971)
Pureza de pico	99,33	1,98	(94,77; 103,89)	(91,43; 107,23)

5.2.1.12. Conclusão da otimização para múltiplas respostas

A melhor condição para que seja obtido os melhores valores de número de pratos, resolução do pico do analito com o pico mais próximo, recuperação do analito e pureza de pico para o analito é com coluna X-Terra MS 18 100x4,6 mm 5 µm, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 230 nm. Essa conclusão foi alcançada através da comparação e otimização de todos os resultados obtidos no DOE 02.

5.2.1.13. Conclusão dos resultados obtidos no DOE 02

Apenas os parâmetros resolução (R) e número de pratos teóricos (N), foram afetados significativamente pelas alterações das variáveis volume de injeção, comprimento de onda e tipo de coluna. Porém, esses parâmetros não são os mais críticos e por isso foi feita uma otimização que considerando todos os parâmetros avaliados (R, Rec, pureza, N, assimetria, etc).

Com base na avaliação dos resultados do DOE 02, a melhor condição cromatográfica para continuar as análises é:

Coluna: X-Terra MS 18 100x4,6 mm 3,5 µm

Volume de injeção: 20 µL

Fluxo: 1,2 mL/ min

Temperatura da coluna: 35°C

Temperatura do amostrador: 20°C

Comprimento de onda: 230 nm

5.3. Resultados e discussão do DOE 03

5.3.1. Resultados obtidos no DOE 03

5.3.1.1. Regressão fatorial: recuperação *versus* blocos; comprimento onda; gradiente

A Equação 16, mostra a regressão fatorial para recuperação.

$$\text{Rec} = 99{,}100 + 0{,}325\lambda - 0{,}650\text{G} + 0{,}275\lambda\text{G} \qquad \text{Equação 16}$$

Observa-se que a o gradiente (G) é um fator de grande impacto no valor da recuperação pois é multiplicado por -0,650 e a constante 99,100 é ocasiona o maior aumento nos resultados, porém ela é fixa não sofrendo interferência da mudança das outras variáveis. Embora o comprimento de onda (λ), também possa interferir nos resultados, essa interferência é muito pequena e o mesmo raciocínio vale para a interação entre comprimento de onda e gradiente.

O Quadro 53, mostra valor-p abaixo de 0,05 apenas para gradiente, ou seja, variando comprimento de onda (230 e 302 nm) e gradiente foi possível verificar que apenas a mudança no gradiente teve impacto estatisticamente significativo na variável de saída recuperação. O experimento foi realizado em blocos para facilitar o entendimento sobre a interferência de um segundo analista na realização das análises. Mas a blocagem não interferiu nos resultados significativamente, isso pode ser verificado no valor-p de 0,212 obtido.

Quadro 53. Coeficientes codificados para recuperação *versus* blocos; comprimento de onda; gradiente.

Termo	Efeito	Coeficiente	EP de coeficiente	Valor-t	Valor-p
Constante	-	99,100	0,142	697,12	0,000
Bloco 1	-	0,225	0,142	1,58	0,212
Comprimento de onda (λ)	0,650	0,325	0,142	2,29	0,106
Gradiente (G)	-1,300	-0,650	0,142	-4,57	0,020
C x G	0,550	0,275	0,142	1,93	0,149

A Quadro 54, mostra que a equação de regressão para recuperação, apresentou um R^2 (pred) de 39,70. Isso ocorreu devido ao alto valor da constante de 99,100 ou seja, as outras partes da Equação 16, interferem muito pouco nos resultados da recuperação.

Quadro 54. Sumário do modelo para recuperação.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,402078	91,52%	80,22%	39,70%

O Quadro 55, referente à análise de variância para recuperação, mostra que o menor valor-p e o maior valor-F foi obtido para o gradiente, logo, fica evidente que o único fator de impacto nos resultados é essa variável de entrada.

Quadro 55. Análise de variância para recuperação *versus* blocos; comprimento de onda; gradiente.

Fonte	GL	SQ (Aj)	QM (aj)	Valor-F	Valor-p
Modelo	4	5,2350	1,3087	8,10	0,059
Blocos	1	0,4050	0,4050	2,51	0,212
Linear	2	4,2250	2,1125	13,07	0,033
Comprimento de onda (λ)	1	0,8450	0,8450	5,23	0,106
Gradiente (G)	1	3,3800	3,3800	20,91	0,020
Interações de 2 fatores	1	0,6050	0,6050	3,74	0,149
λ x G	1	0,6050	0,6050	3,74	0,149
Erro	3	0,4850	0,1617	-	-
Total	7	5,7200	-	-	-

Ao avaliar a Figura 76, observa-se que apenas gradiente, interfere significativamente na recuperação sob o ponto de vista estatístico, considerando um intervalo de confiança de $\alpha = 0,05$ (5%).

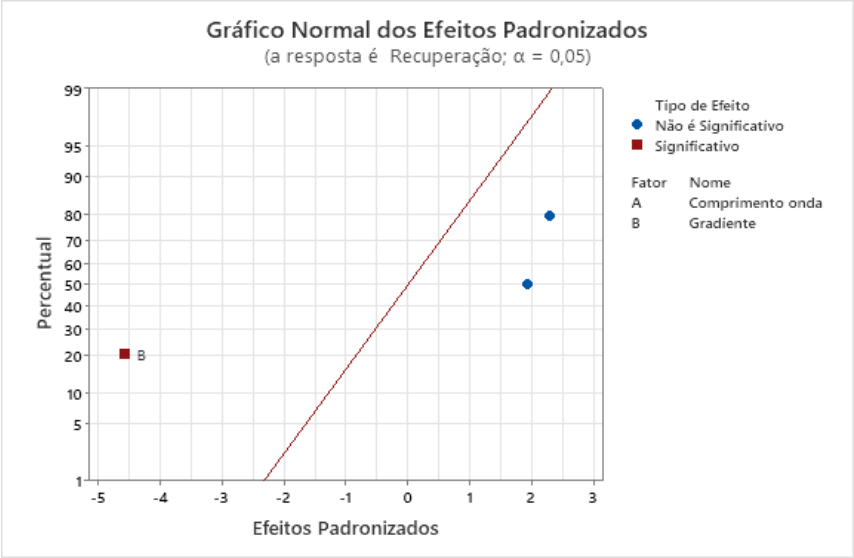

Figura 76. Gráfico normal dos efeitos padronizados para recuperação.

O gráfico de Pareto da Figura 77, mostra que apenas a variável gradiente interfere significativamente no número de pratos teóricos sob o ponto de vista estatístico, considerando um intervalo de confiança de α = 0,05 (5%). Neste caso 0,05 é representado pelo valor 3,182 indicados na linha tracejada. Ou seja, quando a barra atingir um valor igual ou maior que 3,182 a variável ou interação tem significância estatística.

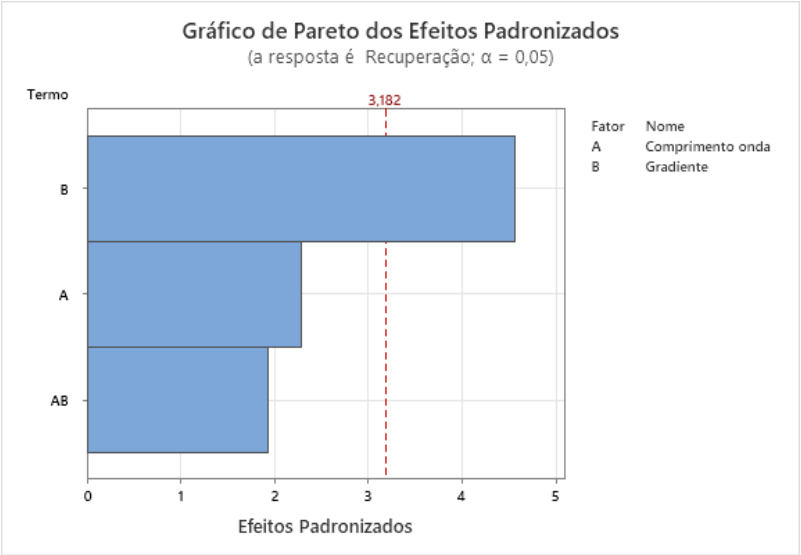

Figura 77. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para recuperação.

A Figura 78, mostra o gráfico de probabilidade normal para recuperação. Os resíduos estão distribuídos próximos da linha inclinada. Quanto mais próximos da linha estiverem os pontos mais ideais são os resultados, considerando uma distribuição gaussiana.

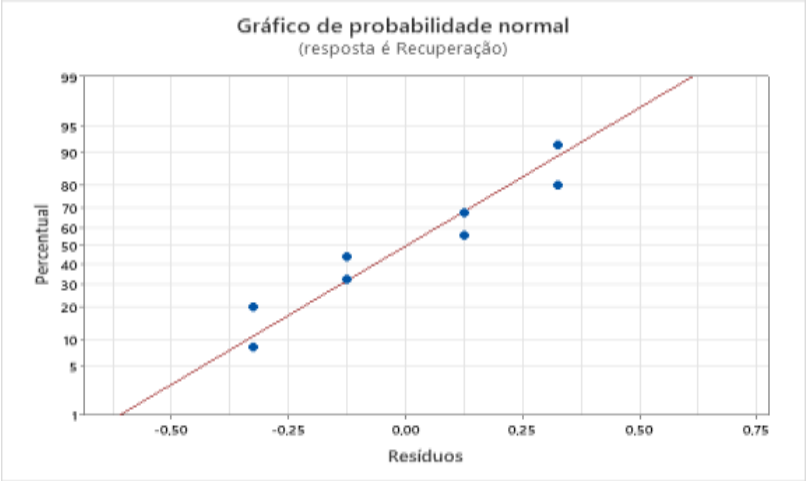

Figura 78. Gráfico de probabilidade normal para recuperação.

A Figura 79, mostra o gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para pratos recuperação. Indicando que os resíduos não apresentaram tendências, pois apresentam valores baixos e altos distribuídos aleatoriamente no intervalo de 97,5 até o valor máximo de recuperação obtido (próximo de 100%)

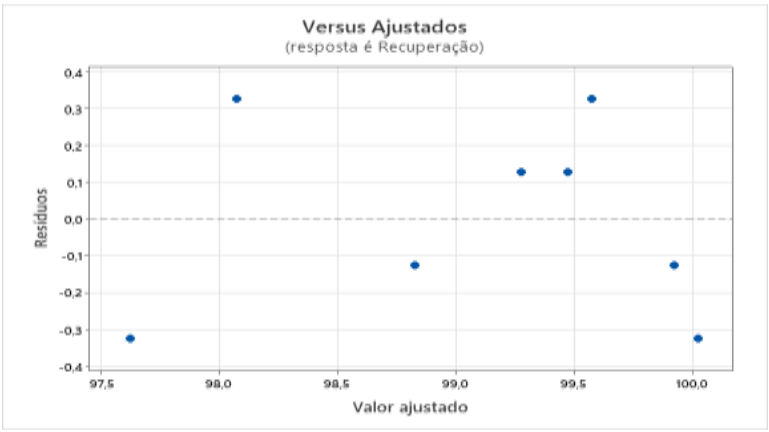

Figura 79. Resíduos *versus* valor ajustado para recuperação.

A Figura 80, mostra o histograma de frequência dos resíduos para recuperação. Este gráfico mostra que os resíduos encontrados variaram de -0,3 até 0,3. Mostra também que as frequências dos resíduos foram bem similares, indicando baixa variabilidade nos resultados, indicando alta reprodutibilidade e robustez quando a variável de saída é recuperação.

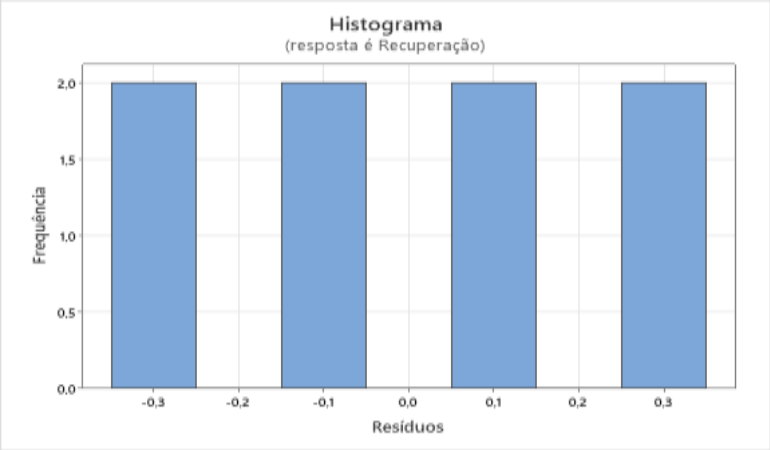

Figura 80. Histograma de resíduos *versus* frequência para recuperação.

Já a Figura 81, mostra que a mudança na ordem de execução dos experimentos não provocou interferência nos resultados de recuperação do analito.

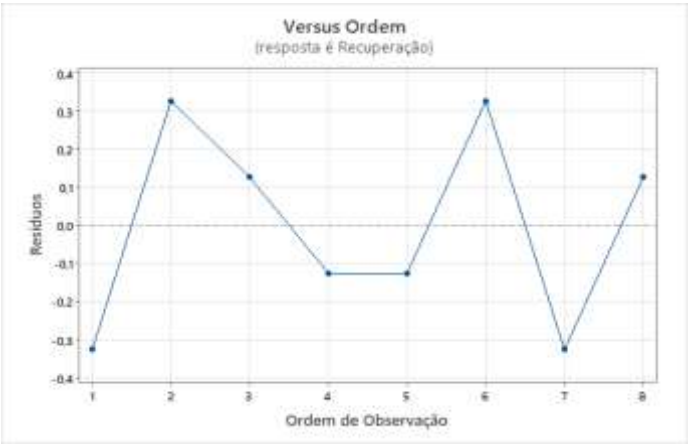

Figura 81. Resíduos *versus* ordem de observação para recuperação.

5.3.1.2. Conclusão da avaliação dos resultados de recuperação no DOE 03

Apenas mudança no gradiente provocou mudanças significativas nos resultados de recuperação e o gradiente 1 apresentou os melhores resultados quando observado a especificação para este item.

5.3.1.3. Regressão fatorial: pureza de pico *versus* blocos; comprimento onda; gradiente

A Equação 17, mostra a regressão fatorial para pureza de pico, em relação às variáveis comprimento de onda (λ) e gradiente (G).

$$\text{Pureza} = 99{,}200 + 0{,}600\lambda - 0{,}325G + 0{,}325\lambda G \qquad \text{Equação 17}$$

O Quadro 56, mostra os resultados dos coeficientes codificados para a avaliação de pureza de pico. Ao avaliar os resultados observa-se que nenhuma variável apresentou valor-p menor que 0,05. Portanto as variáveis de entrada comprimento de onda e gradiente não influenciam os resultados de pureza de pico de modo estatisticamente significativo. Como apenas a constante 99,2 apresenta valor-p igual a 0,000, o seu valor é o mais representativo na Equação 17.

Quadro 56. Coeficientes codificados para avaliação da pureza de pico.

Termo	Efeito	Coeficiente	EP de coeficiente	Valor-t	Valor-p
Constante	-	99,200	0,213	465,48	0,000
Bloco 1	-	-0,150	0,213	-0,70	0,532
Comprimento de onda (λ)	1,200	0,600	0,213	2,82	0,067
Gradiente (G)	-0,650	-0,325	0,213	-1,53	0,225
λ x G	0,650	0,325	0,213	1,53	0,225

O sumário do modelo matemático para a avaliação da pureza de pico descrito no Quadro 57, mostra que a Equação 17, tem um R^2(pred) de 0,00%, evidenciando que esta apresenta baixo poder de predição para a pureza de pico. Deste modo a avaliação gráfica dos dados pode ser mais útil que a avaliação da equação mostrada.

Quadro 57. Sumário do modelo para avaliação da pureza de pico.

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pred)
0,602771	81,34%	56,45%	0,00%

Na análise de variância, ao avaliar os valores-p, do Quadro 58, observa-se que o modelo possui um valor-p muito alto e valor-F muito baixo, indicando também que o modelo matemático não é muito satisfatório. As variáveis comprimento de onda, e gradiente também apresentam valor-p maior que 0,05. Portanto, nenhuma variável apresentou efeito significativo nos resultados de pureza de pico.

Quadro 58. Análise de variância para pureza de pico.

Fonte	GL	SQ (aj)	QM (aj)	Valor-F	Valor-p
Modelo	4	4,7500	1,1875	3,27	0,179
Blocos	1	0,1800	0,1800	0,50	0,532
Linear	2	3,7250	1,8625	5,13	0,108
Comprimento de onda (λ)	1	2,8800	2,8800	7,93	0,067
Gradiente (G)	1	0,8450	0,8450	2,33	0,225
Interações de 2 fatores	1	0,8450	0,8450	2,33	0,225
λ x G	1	0,8450	0,8450	2,33	0,225
Erro	3	1,0900	0,3633	-	-
Total	7	5,8400	-	-	-

Ao avaliar o gráfico normal dos efeitos padronizados mostrado na Figura 82, observa-se que nenhuma variável, interfere significativamente na pureza de pico sob o ponto de vista estatístico, considerando um intervalo de confiança de α = 0,05 (5%).

Figura 82. Gráfico normal dos efeitos padronizados para pureza de pico.

O gráfico de Pareto da Figura 83, mostra que nenhuma das variáveis testadas interfere significativamente na pureza de pico sob o ponto de vista estatístico, e o mesmo vale para suas interações, considerando um intervalo de confiança de α = 0,05 (5%). Neste caso 0,05 é representado pelo valor 3,182 indicados na linha tracejada. Ou seja, quando a barra atingir um valor igual ou maior que 3,182 a variável ou interação tem significância estatística.

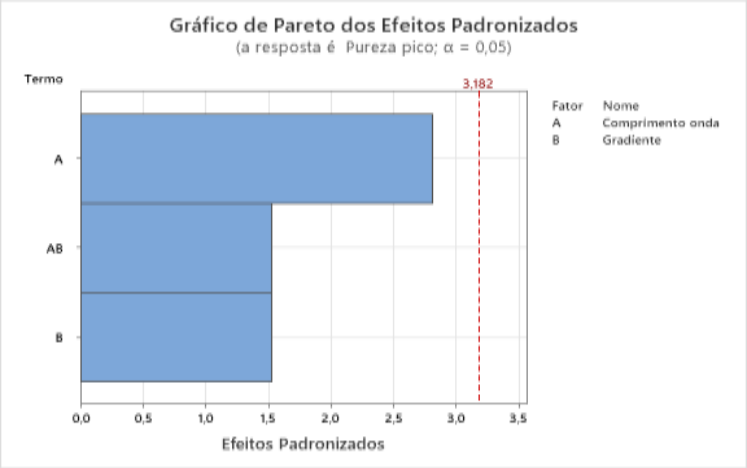

Figura 83. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados para pureza de pico.

A Figura 84, mostra o gráfico de probabilidade normal para pureza de pico. Observa-se neste gráfico que os resíduos se distribuem bem próximos a linha inclinada. Quando isso acontece, pode-se dizer que os resultados apresentam normalidade. A condição mais ideal é a que os resultados estejam em cima ou bem próximos da linha inclinada.

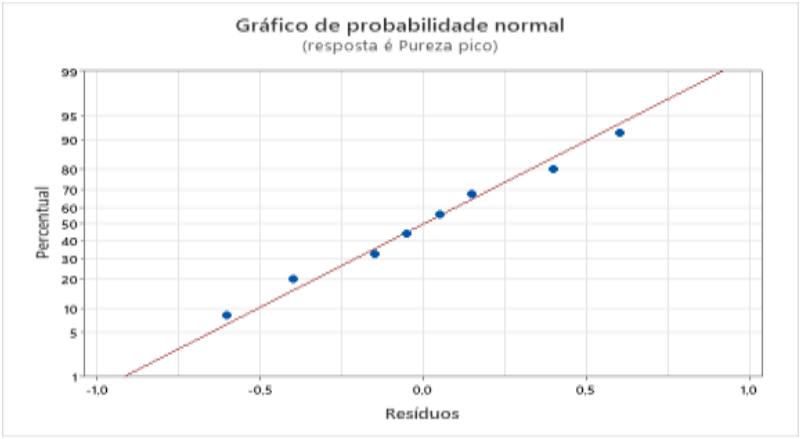

Figura 84. Gráfico de probabilidade normal para pureza de pico.

A Figura 85, mostra o gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para a variável pureza de pico. Observa-se que os resíduos ficaram menores com o aumento da pureza. Neste caso, não há problemas, pois, a pureza de pico é uma propriedade não linear e quanto mais puro o pico é normal que os resíduos fiquem menores. Pureza de pico mais alta indica que não há interferentes no sinal e por isso o esperado é que os resíduos diminuam com o aumento da pureza.

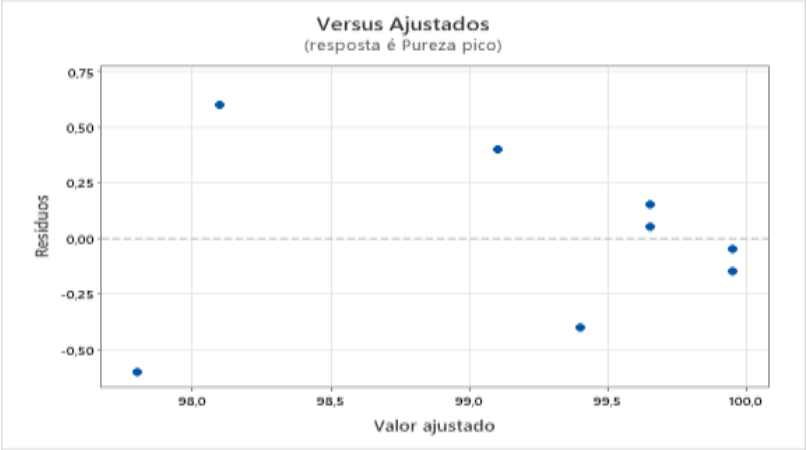

Figura 85. Gráfico de resíduos *versus* valor ajustado para pureza de pico.

A Figura 86, mostra o histograma de frequência dos resíduos para pureza de pico. Este gráfico mostra que os resíduos encontrados variaram de valores próximos de -0,5 até valores próximos de 0,5. Também é mostrado que a frequência de resíduos próximos de zero é similar a dos resíduos mais altos.

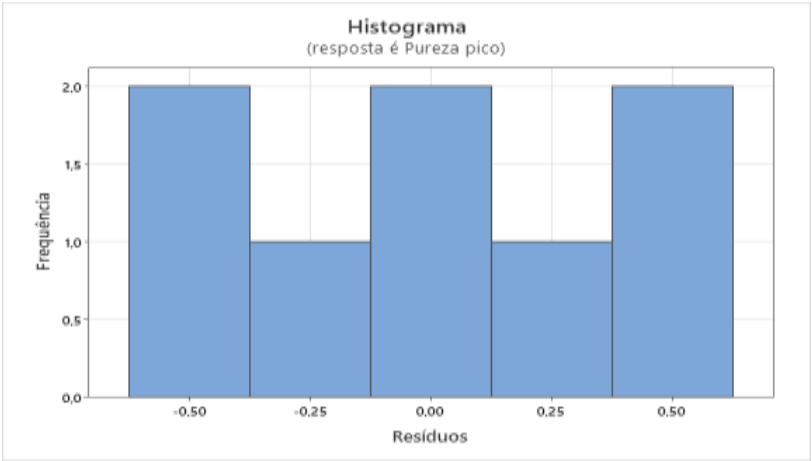

Figura 86. Histograma de resíduos *versus* frequência para pureza de pico.

A Figura 87, mostra o gráfico de resíduos *versus* ordem de injeção para a variável pureza de pico. Observa-se nesta figura que a ordem de injeção não interfere nos resultados. Essa é a condição ideal para um método analítico, ou seja, a ordem de injeção não provoca tendência na variabilidade dos resultados.

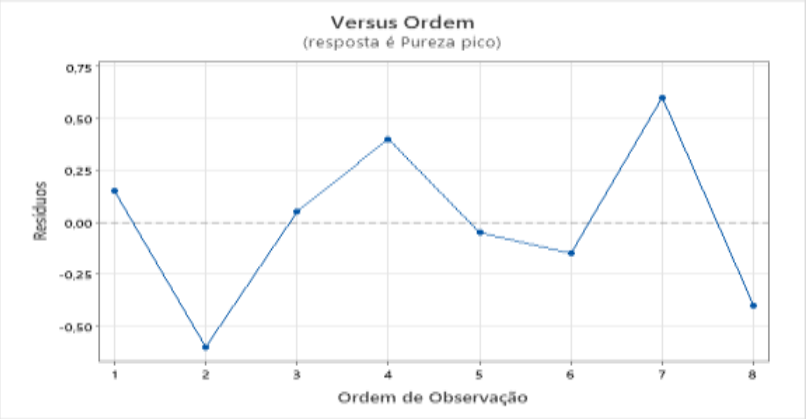

Figura 87. Resíduos *versus* ordem de observação para pureza de pico.

O Quadro 59, mostra, a predição do modelo com gradiente 1 e comprimento de onda de 230 nm.

Quadro 59. Predição do modelo com gradiente 1 e 230 nm para pureza de pico.

Ajuste	EP do ajustado	IC de 95%	IP de 95%
99,25	0,426224	(97,8936; 100,606)	(96,9006; 101,599)

O Quadro 60, mostra a predição do modelo com gradiente 1 e comprimento de onda de 302 nm.

Quadro 60. Predição do modelo com gradiente 1 e 302 nm para pureza de pico.

Ajuste	EP do ajustado	IC de 95%	IP de 95%
99,80	0,426224	(98,4436; 101,156)	(97,4506; 102,149)

A comparação entre os Quadros 59 e 60, mostra que a combinação do gradiente 1 com 302 nm apresenta os melhores resultados para pureza de pico.

Os dados mostrados na figura 88, também indicam que com 302 nm e com o gradiente 1 os resultados de pureza de pico são maiores. Este gráfico mostra os resultados da combinação de gradiente com comprimento de onda.

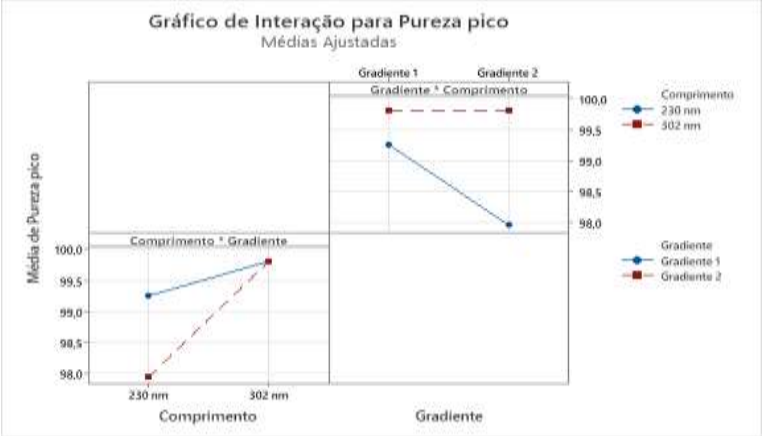

Figura 88. Gráfico de interação para pureza de pico.

A Figura 89, mostra o gráfico dos efeitos principais de forma separada. Este gráfico mostra de forma clara que em comprimentos de onda maiores e com o gradiente 1, as purezas de picos são maiores.

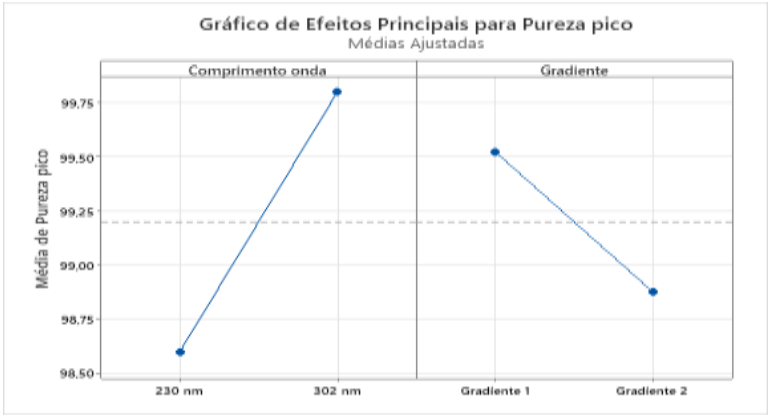

Figura 89. Gráfico dos efeitos principais para pureza de pico.

A Figura 90, mostra o gráfico de efeitos principais para recuperação. Neste caso, observa-se que em comprimentos de onda maiores a recuperação é maior e que com o gradiente 1 a recuperação é maior.

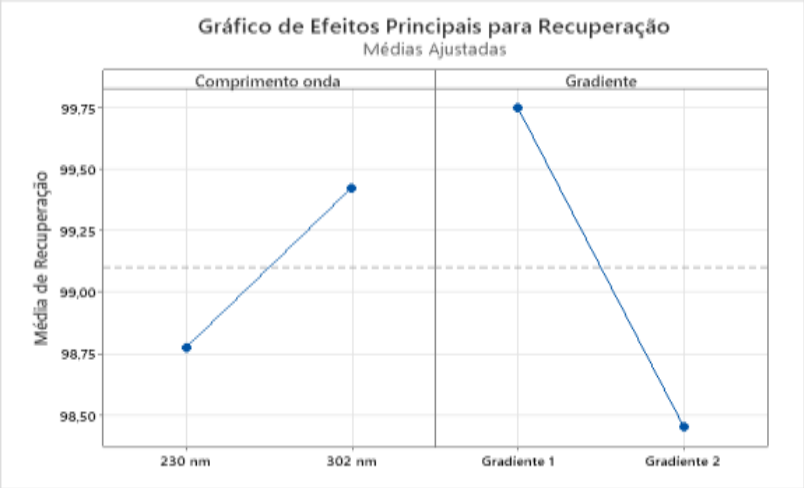

Figura 90. Gráfico de efeitos principais para recuperação.

A Figura 91, mostra o gráfico de interação para recuperação. Ao avaliar esse gráfico, verifica-se que os valores de recuperação mais altos são obtidos utilizando o gradiente 1 e o comprimento de onda 302 nm.

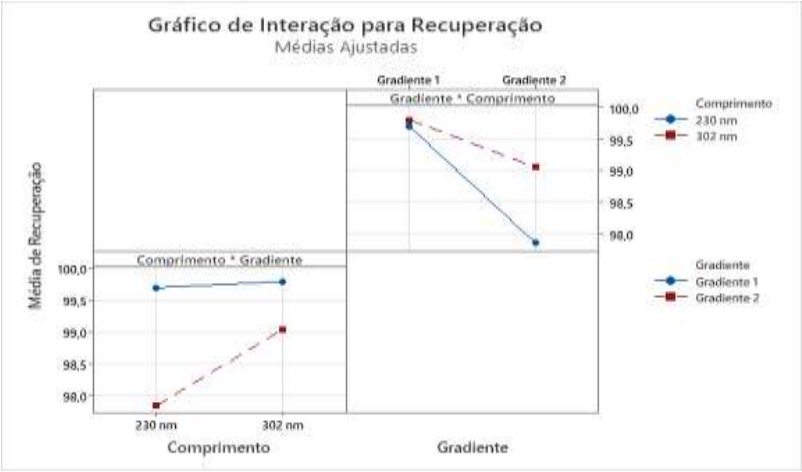

Figura 91. Gráfico de interação para recuperação.

5.3.1.4. Otimização da resposta: pureza pico; recuperação

O Quadro 61, mostra o resultado da otimização das condições para predição de múltiplas respostas, o gradiente 1 e o comprimento de onda 302 nm são as condições mais indicadas para a metodologia em estudo, de acordo com a predição do *software*, com base nos resultados avaliados. O valor da desejabilidade composta foi de 0,848528. Quanto maior o número de variáveis de entrada e de variáveis de saída mais difícil é para obter um valor alto de desejabilidade. Por isso, é sempre importante incluir na otimização as variáveis que são críticas na metodologia em desenvolvimento seja elas de entrada ou de saída. O software, neste caso

faz a previsão de quais as melhores condições analíticas que ocasionam os melhores resultados, isso com base nos resultados avaliados. Um resultado de 0,848528 é um resultado muito bom, pois temos duas variáveis de entrada e duas de saída, o que torna difícil um valor próximo de 1,0 que é a condição perfeita.

Quadro 61. Solução da otimização para recuperação e pureza de pico.

Solução	Comprimento de onda (λ)	Gradiente	Pureza de pico (ajuste)	Recuperação (ajuste)	Desejabilidade composta
1	302 nm	Gradiente 1	99,8	99,8	0,848528

O Quadro 62, mostra os dados do modelo de predição de múltiplas respostas para recuperação e pureza de pico. Observe que foi feito um ajuste de 99,80 com um erro padrão de 0,426 e 0,284. Esse valor de erro padrão é baixo

Quadro 62. Dados do modelo de predição de múltiplas respostas para recuperação e pureza de pico.

Resposta	Ajuste	EP do ajustado	IC de 95%	IP de 95%
Pureza de pico	99,80	0,426	98,444; 101,156	97,451; 102,149
Recuperação	99,80	0,284	98,895; 100,705	98,233; 101,367

5.3.1.5. Discussão dos resultados obtidos no DOE 03

De acordo com os resultados mostrados, apenas a variável gradiente apresenta interferência significativa apenas na recuperação. Já a pureza de pico não apresentou interferência estatisticamente significativa com a alteração da coluna e também do gradiente.

A otimização realizada pelo software, com base nos resultados obtidos mostrou que a combinação do gradiente 1 com o comprimento de onda 302 nm fornece a melhor configuração do sistema cromatógráfico.

5.3.1.6. Conclusão dos resultados obtidos no DOE 03

A análise dos resultados do DOE 03 mostrou que o comprimento de onda 302 nm e o gradiente 1 são as condições ideais para a metodologia proposta. Como os outros parâmetros e condições já foram ajustados nos DOE 02, então conclui-se que o método analítico já foi desenvolvido adequadamente não necessitando de mais delineamentos experimentais.

A análise dos resultados do DOE 03 permitiu obter uma metodologia que atende a especificação dos CQAs propostos para uma metodologia de teor. Nesse estudo foi possível

concluir a otimização da metodologia inicial sendo aqui propostas condições analíticas ótimas e que leve a resultados robustos e confiáveis.

5.3.2. Conclusão geral dos planejamentos experimentais de DOE 01, DOE 02 e DOE 03

A ocorrência de baixos valores de R^2(pred) é muito comum nos estudos onde há interação entre as variáveis, em experimentos fatoriais fracionados e quando trabalhamos com dados categóricos como coluna, comprimentos de onda diferentes e gradientes diferentes. Nesse trabalho e na literatura mostra, que quando trabalhamos principalmente com dados categóricos na maioria dos casos a análise gráfica e visual é suficiente como fator principal para a tomada de decisão de modo que a análise de variância é mais utilizada durante a validação, pois aí todos os dados são numéricos, sendo possível análises com um número grande de injeções, por exemplo 6 injeções de padrão na adequabilidade do sistema e análises com 5 ou mais níveis com triplicata em cada nível como no estudo de linearidade. Na validação o poder da ANOVA é maior que da análise visual e gráfica, sendo por isso uma avaliação obrigatória.

A utilização de planejamentos experimentais (DOE) permitiu alcançar as melhores condições analíticas para a metodologia de doseamento do analito em Analito 50 mg/cpr. Com essa técnica foi possível conseguir as condições ótimas de análise, com um número pequeno de experimentos quando comparado ao racional OFAT, análises reprodutíveis e confiáveis, economia de tempo e reagentes. Além disso, foi possível diminuir o risco de acidentes durante as análises através da utilização de reagentes menos tóxicos e menos agressivos para a saúde do analista e para o ambiente como um todo.

As condições analíticas finais do estudo estão descritas no item 5,8. Essas condições analíticas deverão ser confirmadas no estudo de degradação forçada e na validação (não faz parte do escopo deste trabalho). Em seguida foram feitos testes como recuperação em três níveis, teste de filtro, adequabilidade do sistema, estabilidade da amostra e um estudo prévio de degradação forçada. Os resultados destes testes também estão descritos no item 5.8.

5.3.3. Metodologia proposta de acordo com os planejamentos experimentais DOE 01, DOE 02 e DOE 03

5.3.3.1. Condições Cromatográficas

Coluna: X-Terra MS 18 100x4,6 mm 3,5 µm

Comprimento de Onda: 302 nm com célula de 60 mm

Fluxo: 1,2 mL/min

Temperatura da coluna: 35°C

Volume de injeção: 20 µL

Temperatura do amostrador: 20°C

Fase móvel: Conforme gradiente mostrado no Quadro 28:

Quadro 63. Gradiente de eluição.

Tempo(min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0,0	100	0,0
7,5	100	0,0
7,6	0	100
10,6	0	100
11,0	100	0,0
16,0	100	0,0

5.3.3.2. Preparação do tampão pH 3,8

Transfira 2,05 g de acetato de sódio para béquer de 1,0 L. Adicione 950 mL de água ultrapura. Ajuste o pH para 3,8 com ácido acético 2 mol/L ou NaOH 2 mol/L, complete o volume com água ultrapura e homogeneíze.

5.3.3.3. Preparação da fase móvel para linha A

Transfira 500,0 mL de tampão pH 3,8. Adicione 500,0 mL de acetonitrila e homogeneíze. Ajuste o pH para ácido acético 2 mol/L ou NaOH 2 mol/L. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

5.3.3.4. Preparação da fase móvel para linha B

Transfira 350,0 mL de tampão pH 3,8 para béquer de 1,0 L. Adicione 650,0 mL de acetonitrila e ajuste o pH para 3,8.

5.3.3.5. Preparação da solução diluente

Transfira 400,0 mL de tampão pH 3,8 para béquer de 1,0 L. Adicione 600,0 mL acetonitrila. Homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm.

5.3.3.6. Preparação do padrão

Transfira 8,0 mg de padrão do analito para balão volumétrico de 100,0 mL. Adicione 80,0 mL de diluente. Leve ao ultrassom até a solubilização completa. Deixe esfriar a temperatura ambiente. Complete o volume com solução diluente. Transfira 0,5 mL para balão volumétrico de 50,0 mL. Complete o volume para com fase móvel A e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* apropriado.

Concentração do analito = 0,0008 mg/mL

5.3.3.7. Preparação da amostra

Homogeneíze e transfira quantidade de amostra equivalente a 20,0 mg analito para balão volumétrico âmbar de 50,0 mL. Adicione 80 mL de solução diluente. Leve ao ultrassom por 20 minutos. Deixe esfriar a temperatura ambiente e complete o volume com solução diluente. Transfira 0,1 mL para balão volumétrico de 50,0 mL e complete o volume com fase móvel A e homogeneíze. Filtre em membrana PVDF 0,45 µm e transfira para *vial* apropriado.

Concentração do analito = 0,0008 mg/mL

5.3.4. Análises complementares ao desenvolvimento de método

5.3.4.1. Adequabilidade do sistema (System Suitability)

A análise de adequabilidade do sistema pode ser usada durante o ciclo de vida da metodologia como um parâmetro de controle e acompanhamento durante o ciclo de vida da metodologia.

Os parâmetros de adequabilidade do sistema adotados aqui foram:

- RSD $\leq$ 2,0% para as áreas das 6 injeções consecutivas de um mesmo *vial* da solução padrão;
- N $\geq$ 2000 em todas as injeções da sextuplicata do mesmo *vial* de padrão;
- Assimetria $\leq$ 1,5 em todas as injeções da sextuplicata do mesmo *vial* de padrão;
- Pureza de pico $\geq$ 98,0%.

5.3.4.2. Resultados obtidos para adequabilidade do sistema (System Suitability)

O Quadro 64, mostra os resultados do teste de adequabilidade do sistema.

Quadro 64. Resultados de adequabilidade do sistema.

Injeção	Área	Assimetria	Pratos teóricos	Pureza de pico (%)
1	65,9591	1,31	2858	99,47
2	66,0084	1,28	2893	99,81
3	66,1089	1,29	2848	99,32
4	66,1647	1,22	2896	100,00
5	66,2435	1,34	2884	99,83
6	66,0902	1,33	2897	99,94
Média	**66,0958**	**1,22**	**2879**	**99,73**
RSD%	**0,16**	**1,30**	**0,73**	**0,27**

5.3.4.3. Conclusão dos resultados do teste de adequabilidade do sistema (System Suitability)

Conforme mostra o Quadro 64, os resultados passam no teste de adequabilidade do sistema conforme especificação do item anterior.

5.3.5. Recuperação

O teste de recuperação foi realizado através da utilização de soluções placebo *spiked*, ou seja, foram preparadas soluções de placebo contaminadas com concentrações de analito de acordo com os níveis desejados em relação à concentração de trabalho da metodologia proposta. Embora a legislação atual recomenda de 80,0 a 120,0%, neste trabalho as amostras foram preparadas nos níveis de 50,0%, 100,0% e 120,0%. A especificação para recuperação neste caso é de 98,0 a 120,0%. A análise foi feita em triplicata para cada nível e cada injeção deve atender à especificação individualmente, embora o resultado seja mostrado como a média de cada nível.

5.3.5.1. Resultados obtidos para recuperação

O Quadro 65, mostra os resultados obtidos para o teste de recuperação.

Quadro 65. Resultados do teste de recuperação.

Nível (%)	Área	%	Média (%)	Rec (%)	Média Rec (%)
50	31,0332	50,27	50,33	100,55	100,67
50	31,1059	50,39		100,78	
50	31,0729	50,34		100,68	
100	61,7302	100,00	100,15	100,00	100,15
100	61,9603	100,38		100,38	
100	61,7689	100,07		100,07	
120	73,7831	119,53	119,44	99,61	99,53
120	73,8167	119,58		99,65	
120	73,5788	119,20		99,33	

5.3.5.2. Conclusão da avaliação dos resultados do teste de recuperação

Conforme mostra o Quadro 65, os resultados obtidos passam no teste de recuperação do analito em meio contendo o placebo da formulação do produto.

5.3.6. Teste de filtro

O teste de filtro foi realizado utilizando as membranas PVDF 0,45 µm, PTFE 0,45 µm e Nylon 0,45 µm. As áreas das amostras filtradas nas membranas foram comparadas com as áreas das mesmas amostras (do mesmo balão) centrifugadas. As áreas das amostras centrifugadas foram consideradas como padrão de calibração a 100%.

A especificação para o teste de filtro nesse caso é de 98,0 a 102,0% com RSD% ≤ 2,0 para cada triplicata.

5.3.6.1. Resultados do teste de filtro

Os resultados do teste de filtro são mostrados no Quadro 66.

Quadro 66. Resultados do teste de filtro.

Tipo de membrana	Recuperação (%)	RSD (%)	Rec. média (%)
PVDF 0,45 µm, 25 mm	99,50	0,56	99,21
	98,57		
	99,56		
PTFE 0,45 µm, 25 mm	98,96	0,56	98,67
	98,03		
	99,01		
Nylon 0,45 µm, 25 mm	101,28	0,06	101,23
	101,16		
	101,26		

5.3.6.2. Conclusão da avaliação dos resultados do teste filtro

Conforme mostra o Quadro 66 os resultados obtidos mostram que todos os 3 filtros testados passaram no teste de filtro com recuperação entre 98,0 a 102,0% e RSD% ≤ 2,0 para cada triplicata.

Embora o filtro de Nylon seja em torno de 30% mais barato que os de membrana PTFE e PVDF de mesmo diâmetro e tamanho de poro, o filtro escolhido foi o PVDF 0,45 µm de 25 mm, pois é o tipo de membrana mais comumente utilizado nos laboratórios de controle de qualidade.

5.3.7. Teste de estabilidade das soluções analíticas

O teste de estabilidade das soluções analíticas, avaliou a variação das áreas das amostras e padrões nos tempos de exposição em bancada de T_0 (inicial), 24 horas e 48 horas. A variação permitida é de até 2,0% para mais ou para menos. Os resultados são mostrados no Quadro 67.

Quadro 67. Resultados do teste de estabilidade das soluções analíticas.

Amostra	Área em T_0	Área em (24h)	Área em (48h)	Variação % (24h)	Variação % (48h)
Solução padrão	61,8501	61,4457	61,4601	-0,65	-0,63
Solução padrão	61,6439	61,4058	61,3189	-0,39	-0,53
Solução padrão	61,6858	61,2503	61,2061	-0,71	-0,78
Solução amostra PA	61,7302	61,5366	61,2084	-0,31	-0,85
Solução amostra PA	61,9603	61,7589	61,4509	-0,33	-0,82
Solução amostra PA	61,7689	61,2748	61,1214	-0,80	-1,05

5.3.7.1. Conclusão da avaliação dos resultados do teste de estabilidade das soluções analíticas

Com base nos resultados descritos no Quadro 67, as amostras e padrões tem estabilidade de até 48 horas em bancada.

5.3.8. Estudo de degradação forçada

O estudo de degradação forçada foi realizado conforme a legislação vigente. As amostras foram degradadas e depois diluídas até a concentração de trabalho da metodologia para serem injetadas. Neste caso foi avaliado a diminuição da área, que deve estar entre 10 e 30% em relação a condição controle (sem degradar) ou seja teor entre 70,0 e 90,0 % em relação

da condição inicial. A pureza de pico é outro parâmetro que foi avaliado neste estudo pois deve estar com no mínimo de 98,0% de pureza de pico. Embora as amostras foram injetadas diluídas e concentradas o balanço de massa não é obrigatório para métodos de teor.

No caso das metodologias só de doseamento, nas amostras injetadas concentradas avalia-se a resolução entre o pico do analito e os picos de impurezas formados, não se preocupando com a pureza de pico do analito principal, áreas nem balanço de massa. Já nas amostras injetadas na concentração de trabalho da metodologia proposta (diluídas) avalia-se a pureza de pico do analito principal, o teor do analito principal e a resolução entre o pico do analito principal e os picos de excipientes ou impurezas e produtos de degradação.

No caso de metodologias só de impurezas, nas amostras injetadas concentradas avalia-se a área de cada pico de impureza do cromatograma, a pureza de pico das impurezas que serão validadas, os parâmetros de performance como resolução, n° de pratos, assimetria, etc, dos picos das impurezas que serão validadas. Nesse caso, em relação ao pico da substância ativa só é necessário verificar a sua resolução com os picos das impurezas, produtos de degradação e excipientes. Já na solução diluída avalia-se a queda de teor, a pureza de pico, a resolução entre os possíveis picos próximos do pico principal.

O Quadro 68, mostra um exemplo de tabela que pode ser apresentado para demonstrar um estudo de degradação forçada para metodologia de teor.

Para os métodos de impureza é importante montar uma tabela similar ao Quadro 68, mas neste caso deve conter também as informações, tempo de retenção relativo de cada impureza, área de cada impureza, balanço de massa, pureza de pico dos picos que serão quantificados em cada situação e avaliados na validação.

5.3.8.1. Resumo do estudo de degradação forçada

O Quadro 68, mostra um exemplo de resumo de estudo de degradação forçada. Onde mostra as condições testadas e resultados obtidos. Esse caso se aplica a um método de doseamento, pois não mostra o balanço de massas.

Quadro 68. Resultados de estudo de degradação forçada.

Solução diluída	Condição	Tempo	Área	Teor (%)	Pureza (%)
PA	Controle	NA	61,7103	100,0	99,8
PA	H_2O_2 a 3,0%	24h	49,3682	80,0	99,9
PA	Cu^{++} a 0,05M	24h	54,5519	88,4	100,0
PA	HCL a 1M	5 dias	53,1943	86,2	99,7
PA	NaOH a 1M	2 dias	48,1957	78,1	99,5
PA	Térmica seca, 60°C	10 dias	54,3051	88,0	99,9
PA	Fotólise	3 dias	52,6389	85,3	99,6
IFA	Controle	NA	61,8501	100,0	99,9
IFA	H_2O_2 a 3,0%	24h	49,7275	80,4	99,4
IFA	Cu^{++} a 0,05M	24h	52,5726	85,0	99,1
IFA	HCL a 1M	3 dias	52,0159	84,1	99,6
IFA	NaOH a 1M	3 dias	47,8101	77,3	99,7
IFA	Térmica seca, 60°C	10 dias	50,4078	81,5	99,4
IFA	Fotólise	3 dias	52,82	85,4	99,2
Placebo	Controle	NA	-	0,0	Não detectado
Placebo	H_2O_2 a 3,0%	24h	-	0,0	Não detectado
Placebo	Cu^{++} a 0,05M	24h	-	0,0	Não detectado
Placebo	HCL a 1M	3 dias	-	0,0	Não detectado
Placebo	NaOH a 1M	3 dias	-	0,0	Não detectado
Placebo	Térmica seca, 60°C	10 dias	-	0,0	Não detectado
Placebo	Fotólise	3 dias	-	0,0	Não detectado
Diluente	Controle	NA	-	0,0	Não detectado
Diluente	H_2O_2 a 3,0%	24h	-	0,0	Não detectado
Diluente	Cu^{++} a 0,05M	24h	-	0,0	Não detectado
Diluente	HCL a 1M	3 dias	-	0,0	Não detectado
Diluente	NaOH a 1M	3 dias	-	0,0	Não detectado
Diluente	Térmica seca, 60°C	10 dias	-	0,0	Não detectado

5.3.8.2. Conclusão dos resultados do teste de degradação forçada

Conforme os resultados do estudo de degradação forçada, conclui-se que a metodologia em estudo é específica e seletiva para o analito, conseguindo quantificar o analito na presença de possíveis impurezas e excipientes da formulação.

5.3.9. Definição do MODR

Um ponto importante deste trabalho é sobre a definição do MODR, pois na literatura há poucas referências detalhadas de como definir esse parâmetro.

Para a definição do MODR, deve ser feita uma avaliação de todos os testes realizados e que deram resultados dentro da especificação a fim de verificar os pontos em que podem ser feitas alterações na metodologia em seu ciclo de vida. A recomendação mais segura é que esses

dados sejam apresentados à ANVISA e discutidos de modo que essa região seja definida juntamente com esse órgão regulador. A segunda opção é que a própria empresa solicitante defina o MODR e envie para a ANVISA, más nesse caso o risco é maior. Essas alterações devem ter a finalidade de melhorar a metodologia e garantir mais confiabilidade nos resultados e maior segurança para o consumidor. As mudanças feitas dentro do MODR não são consideradas alterações pós-registro, ou seja, há uma maior flexibilidade regulatória.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi demonstrado, o passo a passo para o desenvolvimento de uma metodologia analítica para doseamento utilizando DOE e a abordagem AQbD. O desenvolvimento analítico para um produto hipotético foi demonstrado utilizando o conceito de *Quality By Design* aplicado ao desenvolvimento analítico (AQbD). As análises foram conduzidas utilizando planejamentos de experimentos (DOE), análise de risco e o software Minitab®.

Todo o processo analítico foi conduzido, sendo mostrado e discutido passo a passo para que esse trabalho seja utilizado futuramente como um guia para o desenvolvimento de métodos analíticos utilizando AQbD para análises cromatográficas. Assim, poderá servir de guia para sobre desenvolver metodologias utilizando planejamento experimental (DOE) e *Analytical Quality by Design* (AQbD).

A utilização de DOE mostrou-se muito útil e eficaz, facilitando o entendimento das interações entre as variáveis de entrada, permitindo encontrar as condições ótimas de análises em menor tempo e com mais economia, proporcionando um método analítico mais confiável e robusto.

O trabalho foi concluído com êxito, uma vez que foi possível mostrar o passo a passo do desenvolvimento de uma metodologia usando o AQbD de forma hipotética. A metodologia hipotética atendeu aos parâmetros analíticos necessários com um tempo reduzido de desenvolvimento, economia de regentes, redução do tempo de análise e metodologia mais segura e robusta.

Com o método analítico hipotético desenvolvido neste trabalho foi possível solucionar um problema hipotético de uma metodologia que apresentava alta assimetria de pico (maior que 1,7), baixo número de pratos teóricos (menor que 2000), reprovação em pureza de picos (dava abaixo de 80%), picos do analito muito largos e quebrando e baixa recuperação do analito. Além disso apresentava tempo de corrida muito alto (35 minutos). A nova metodologia (otimizada), apresentou picos do analito com assimetria média de 1,30, recuperação média de 100,12%, pureza de pico maior que 99,5%, número de pratos maior que 2800 e tempo de corrida de 16 minutos.

Foi possível mostrar como é feito um desenvolvimento de uma metodologia mais segura sob o ponto de vista ambiental e relacionado a saúde do analista, pois foi retirado da fase móvel substâncias tóxicas e voláteis, TEA e ácido fórmico. Além de ser volátil o ácido fórmico provoca queimaduras quando em contato com pele. Essas substâncias foram substituídas por

acetato de sódio e ácido acético diluído. O ácido acético traz menos riscos de acidentes que o ácido fórmico, embora os dois sejam voláteis.

A avaliação de gráficos e dados estatísticos também foi abordada mostrando como dados brutos são tratados e avaliados de forma adequada.

Quanto ao aspecto regulatório, a utilização do AQbD, permite uma maior flexibilidade regulatória pois alterações dentro do MODR, não são vistas como alterações pós-registro. Além disso é possível fazer alterações necessárias dentro do MODR durante o ciclo de vida da metodologia analítica possibilitando uma melhoria contínua ao invés de um método engessado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Juliana Caldeira. **Desenvolvimento de Método Indicativo de Estabilidade para Bromoprida e seus Produtos de Degradação Aplicando os Princípios de *Analytical Quality by Design***. São Paulo, 2020. Dissertação de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo. Página 29.

ALMEIDA, Felipe Carelli de. OLIVEIRA, Elcio Cruz de. **Análise da Influência do Fator do Medidor na Incerteza da Malha de Vazão de Óleo Fiscal Utilizando Medidores Ultrassônicos**. Conference: 5º Congresso de Instrumentação, Controle e Automação da Petrobras – 5º CICAP. 2017. Página 3.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Gerenciamento de Riscos da Qualidade**, Guia n°62/2023, versão 1. Página 11.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 53 de 4 de Dezembro de 2015**. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº166, de 24 de julho de 2017**. 2017.

BEG, Sarwar *et al*. **Handbook of Analytical Quality by Design**. Elsevier, London 2021. Páginas 7, 10, 11, 12, 57, 58 e 194.

BEG, Sarwar. Design of Experiments for Pharmaceutical Product Developmente V: 1, Basic and Fundamentals Principles. **Springer Nature**, Singapure Pte, 2021. Páginas 74, 59, 51, e 31.

BENTO, Maria João Marques. **Quality by design no desenvolvimento de métodos analíticos para o doseamento de vitaminas em suplementos alimentares**. Lisboa, 2019. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Farmacêutica. Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa. Páginas 8, 11 e 14.

BREITKREITZ, Márcia C. GOICOECHEA Hector C. Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development. AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. EUA 2023. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. Springer. Páginas 24, 25, 26, 34 e 53.

CHAVES, Juliana Alvim Paixão. **Aplicação do princípio de Quality by Design no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade**. Rio de Janeiro, 2017 Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz. Páginas 3, 17, 18, e 19.

CHEMICALIZE. **Software de aceso *on line***.

DA SILVA, Fernando Antunes. **Desenvolvimento e Otimização de Método Indicativo de Estabilidade utilizando a abordagem de *Quality by Design* (QbD) na determinação de Etinilestradiol e Levonorgestrel em contraceptivos orais comercializados em território brasileiro**. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo – Diadema, 2021. Página 24.

DEAN, Angela et al. Design and Analysis of Experiment. 2nd edition, 2017. **Springer International Publishing** AG 2017. Switzerland. Páginas 3 e 17.

DEAN, Angela et al. Handbook of Design and Analysis of Experiments. **CRC Press**. London 2015. Páginas 8, 9 e 41.

DIEGO, Giovanna Cristina Marcelino. **Desenvolvimento e otimização de método analítico por Analytical Quality by Design (AQbD) para determinação de teor do produto acabado Succinato de Solifenacina.Diadema**, 2021 Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de São Paulo. Páginas 19, 20, 27 e 29.

DOLAN, John. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Solutions. **ACE HPLC Columns. Scotland**, 2005. Páginas 10 e 11.

FANALI, Salvatore *et al.* Hand Book in Science Separation, Liquid Chromatography. **Fundamentals and Instrumentation**. Elsevier- Italy, Third Edition 2023. V. 1, p. 51, 52, 53, 151, 152, 153 e 154.

GOOS, Peter. JONES, Bradley. Optimal Design of Experiments,A Case Study Approach. 2011 **John Wiley & Sons**, Ltd 2012. United Kingdom. Página 29 e 56.

HPLC troubleshooting Guide, **Waters American Laboratory** 2002. Páginas: 60 e 61.

ICH Q10 - **Pharmaceutical Quality System. 2015**. Página 4, 5 e 6.

ICH Q11 - **Development And Manufacture Of Drug Substances (Chemical Entities And Biotechnological/Biological Entities).** 2012. Página 4.

ICH Q12 - **Grenciamento do ciclo de vida do produto.** Páginas 6 a 10.

ICH Q2 (R2) - **Validation of Analytical Procedures**. 2023. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf Acesso em: 01 fevereiro. 2024. Páginas 4.

ICH Q3B (R2) – **Ipurities In New Drug Products**, 2006. Página 7.

ICH Q8 (R2) - **Pharmaceutical Development, International Conference On Harmonisation,** IFPMA, Geneva (Switzerland). Páginas 5 e 6.

ICH. Q14 - **Analytical Procedure Development**. 2022. Páginas 4, 5, 6, 12, 17 e 18.

ICH. Q9 (R1) - **Quality Risk Management**. 2023. Páginas 6, 7, 12, 13, 14 e 15.

JIJU, Antony. **Design of Experiments for Engineers and Scientists**. 3th Edition. Elsevier. Amsterdam 2023. Páginas 12, 13, 14, 125 e 126.

MARANHO, Rafael Finocchiaro. **Desenvolvimento de um Método Indicativo de Estabilidade para Ondansetrona**. São Paulo, 2017. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Pag. 34.

MINETO, Alexandre Rolim (Org.). **A abordagem quality by design no desenvolvimento de produtos farmacêuticos: conceitos, elementos e exemplos de aplicação**. Porto Alegre,

2021 Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Farmácia. Pag. 9 e 10.

MONTGOMERY, Douglas C. et al. **Design and Analysis of Experiments**. 8th Edition, 2010. John Wiley & Sons, Inc. EUA. Pag. 56.

MOREIRA, Camila dos Santos. **Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos.** São Paulo, 2019 Dissertação para obtenção do título de mestre – Universidade de São Paulo. Acesso em: 15 de fevereiro de 2024. Páginas 5, 9 e 10.

NETO, Benício de Barros et al. **Como fazer experimentos**. 4 ed. 2010. Bookman. Porto Alegre-Brasil. Páginas 67,68, 81, 82, 127, 129, 130 e 131.

SNYDER, L, R. KIRKLAND, J, J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd Edition, **John Wiley & Sons**, Inc.1979. United States of América. Páginas 423 e 424.

SOBRAL, Ana Margarida da Silva. **Aplicação da abordagem Quality-by-Design no Desenvolvimento de um Método Analítico Preditivo de Estabilidade de uma Formulação Semi-sólida.** Lisboa, 2020 Dissertação de Mestrado em Engenharia Farmacêutica – Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia. Páginas 7 a 16.

SUGIMOTO, Yvan Pelicer. **Aspectos Gerais de Quality by Design em Indústrias Farmacêuticas Nacionais.** Diadema 2020. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Paulo. Página 20.

SUPORTE AO MINITAB®, disponível em: https://support.minitab.com/pt-br/minitab/ Acesso em 08 de agosto de 2024.

WELTER, Sinara Queli. **Extração e Quantificação de Cafeína em Energéticos Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrofotometria**. Pato Branco-Paraná, 2011. Trabalho de Conclusão de Curso para a Obtenção do Título de Bacharel em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Páginas 16 e 17.

WHO. **Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparationswho Technical Report Series 929**. Geneva 2005. Páginas 139 e 140.