
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO
CROMATOGRÁFICO PARA SEPARAÇÃO DE TRÊS ATIVOS
E SUAS RESPECTIVAS IMPUREZAS COM APLICAÇÃO DE
PLANEJAMENTO FATORIAL”**

Romero Moreira de Souza*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

*** Vínculo Empregatício: Libbs Farmacêutica LTDA**

São Carlos - SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Romero Moreira de Souza, realizada em 28/03/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Tiago Varão Silva (Libbs Farmacêutica)

Profa. Dra. Amanda Guiraldelli Mahr (U.S.Pharmacopeia)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedico este trabalho a minha amada esposa Nathalie que me conheceu desempregado e sem formação e me transformou em um profissional. Minha fonte de inspiração que me faz cada dia tentar ser uma pessoa melhor para quem sabe um dia ser merecedor de sua companhia.

Aos meus filhos Davi, Heitor e Júlia por seu amor incondicional.

Aos meus pais por todo sacrifício que fizeram para que seus filhos pudessem estudar dando o exemplo de dedicação e trabalho.

A meu irmão que sempre foi um exemplo de irmão mais velho e que honra o título de primogênito da família.

A todos os meus amigos da Libbs, especialmente ao Lucas Sponton, pela confiança e orientação ao longo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Edenir, meu orientador, pela disponibilidade, paciência e conselhos durante minha caminhada neste objetivo. Sempre disposto e confiante em cada momento.

À Libbs Farmacêutica, pela oportunidade e confiança, disponibilidade de materiais, tempo e equipamentos, fazendo com que este trabalho fosse executável. Em especial ao Lucas, Tiago Varão e Luis Felipe (Pipe), pelo auxílio e contribuição intelectual.

Aos meus colegas de trabalho do time pelo incentivo e apoio desde o início do projeto.

A todo o corpo técnico administrativo do Departamento de Química da UFSCar, pelo suporte oferecido.

Agradeço também aos professores pelos ensinamentos ao longo de todo o processo que ampliaram meu entendimento da química e ferramentas quimiométricas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ACRÔNIMOS

Anova - *Analysis of Variance*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Official Agricultural Chemists*

AQBD- *Analytical Quality By Design*

ATP – *Target Analytical Profile*

CDI – Centro de Desenvolvimento Integrado

CMA- *Critical Method Attributes*

DAD – Detector de arranjo de diodos

DPR – Desvio Padrão Relativo

FDA – *United States Food and Drug Administration*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

IC – Intervalo de confiança

ICH – *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IFA – Insumo farmacêutico ativo

GRMED - Gerência de Avaliação de Tecnologia de Registro de Medicamentos Sintéticos

LIBBS - Laboratório Industrial Brasileiro de Biologia e Síntese

MODR -*Method Operable Design Region*

MQEP – Média Quadrática do Erro Puro

MQFaj – Média Quadrática da Falta de ajuste

MQR – Média Quadrática da Regressão

MQres – Média Quadrática dos Resíduos

MQT – Média Quadrática Total

QBD- *Quality By Design*

R² – Coeficiente de determinação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SQEP – Soma Quadrática do Erro Puro

SQFaj - Soma Quadrática da Falta de ajuste

SQR – Soma Quadrática da Regressão

SQres – Soma Quadrática dos Resíduos

SQT – Soma Quadrática Total

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UPLC - *Ultra Pressure Liquid Chromatography*

U.R. – Umidade relativa

UV – Ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do cromatógrafo líquido convencional.....	8
Figura 2- Número de publicações científicas sobre AQbD.....	10
Figura 3: Representação gráfica do desenho espacial do estudo.....	18
Figura 4: Valores das médias quadráticas do modelo para resposta y1	19
Figura 5: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para resposta y1	20
Figura 6: Valores dos testes F1 e F2 do modelo para resposta y1	20
Figura 7: Gráficos dos valores experimentais <i>versus</i> previstos e resíduos do modelo para a resposta y1.....	21
Figura 8: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para as respostas y1	22
Figura 9: Valores das médias quadráticas do modelo para a resposta y2	22
Figura 10: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para a resposta y2.....	23
Figura 11: Valores do teste F1 e F2 do modelo para a resposta y2.....	23
Figura 12: Gráficos dos valores experimentais <i>versus</i> previstos e resíduos do modelo para a resposta y2.....	24
Figura 13: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para as respostas y2	25
Figura 14: Fórmula para cálculo da desejabilidade individual para maximizar a resposta	26
Figura 15: Valores das médias quadráticas do modelo para a desejabilidade global. .	28
Figura 16: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para a desejabilidade global.....	29
Figura 17: Valores do teste F1 e F2 do modelo para a desejabilidade global.....	29
Figura 18: Gráficos dos valores experimentais <i>versus</i> previstos e resíduos do modelo para desejabilidade global.....	30
Figura 19: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para a desejabilidade global	31
Figura 20: Valores das médias quadráticas do novo modelo para a desejabilidade global	32
Figura 21: Valores de R^2 e R^2 máximo do novo modelo para a desejabilidade global .	32
Figura 22: Valores do teste F1 e F2 do novo modelo para a desejabilidade global	33
Figura 23: Gráficos dos valores experimentais <i>versus</i> previstos e resíduos do novo modelo para desejabilidade global	33
Figura 24: Gráfico dos coeficientes de regressão do novo modelo para a desejabilidade global.....	34

Figura 25: Gráfico de superfície de resposta da desejabilidade em função do pH e do tempo de gradiente	35
Figura 26: Gráfico de contorno da desejabilidade em função do pH e do tempo de gradiente	35
Figura 27: Condição ideal calculada usando o programa Fusion.....	36
Figura 28: Cromatograma obtido com o método proposto com amostra construída....	38
Figura 29: Cromatograma com identificação dos picos com menor resolução cromatográfica (par crítico).....	39
Figura 30: Gráfico de superfície de resposta da resolução dos picos do par crítico em função do pH e do tempo de gradiente	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Legenda da codificação das variáveis.....	17
Tabela 2: Legenda da codificação das respostas	17
Tabela 3: Planejamento fatorial completo (face centrada) com ponto central (n=21) ..	18
Tabela 4: Valores dos coeficientes do modelo para a resposta y1	21
Tabela 5: Valores dos coeficientes do modelo para a resposta y2	24
Tabela 6: Desejabilidade individual das respostas y1 e y2 (n=21).....	27
Tabela 7: Planejamento fatorial completo com a Desejabilidade global (Dg) (n=21) ...	28
Tabela 8: Valores dos coeficientes do modelo para desejabilidade global	30
Tabela 9: Planejamento fatorial completo com os coeficientes significativos.....	31
Tabela 10: Valores dos coeficientes do novo modelo para desejabilidade global	33
Tabela 11: Condições cromatográficas do método	37
Tabela 12: Condições do gradiente do método.....	37
Tabela 13: Planejamento fatorial completo (face centrada) com ponto central (n=21)	40
Tabela 14: Valores dos coeficientes do modelo para a resolução do par crítico.....	40
Tabela 15: Resumo dos resultados de seletividade do método	42
Tabela 16: Resultados da Linearidade do Ativo 1	43
Tabela 17: Resultados da Linearidade do Ativo 2	44
Tabela 18: Resultados da linearidade do Ativo 3	44
Tabela 19: Resultados da exatidão do Ativo 1	45
Tabela 20: Resultados da exatidão do Ativo 2	46
Tabela 21: Resultados da exatidão do Ativo 3	47
Tabela 22: Resultados da precisão para o ativo 1	48
Tabela 23: Resultados da precisão para o Ativo 2	48
Tabela 24: Resultados da precisão para o Ativo 3.....	49

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA SEPARAÇÃO DE TRÊS ATIVOS E SUAS RESPECTIVAS IMPUREZAS COM APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL

Uma parte essencial da proposição de um novo medicamento é o desenvolvimento de métodos para determinar a concentração dos ativos e impurezas nos produtos durante a etapa de desenvolvimento e em toda sua vida útil, garantindo assim a qualidade do produto e segurança aos pacientes. O método analítico deve ser indicativo de estabilidade, ou seja, capaz de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância. Outras características importantes descrevem que são métodos específicos capazes de mensurar com exatidão a dosagem do insumo farmacêutico ativo (mg/comprimido), produtos de degradação (% de impureza) 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. Com a cromatografia é possível separar apropriadamente as substâncias presentes na formulação e quantificar vários analitos na mesma análise. Vários fatores interferem na separação dos componentes no método cromatográfico, se destacando o pH da fase móvel, o tipo de material da fase estacionária, o tipo de solvente e sua concentração na fase móvel. Desta forma, o objetivo foi utilizar a Quimiometria para explorar os princípios de separação de três fármacos e suas respectivas impurezas e desenvolver um método indicativo de estabilidade por HPLC-DAD. Os testes iniciais foram realizados em uma amostra construída com a presença dos três ativos e suas impurezas, que foram adicionadas ou geradas por meio de estresse da amostra. A separação cromatográfica foi avaliada em testes de triagem e otimização. A triagem foi realizada com uma ampla faixa de pH da fase móvel e diferentes colunas cromatográficas. Também foram avaliados diferentes solventes orgânicos e velocidades do aumento da concentração de solvente orgânico (tempo de gradiente) ao longo da análise cromatográfica. Os dados foram tratados utilizando os programas Fusion® e Octave. O método analítico indicativo de estabilidade para separação dos três ativos foi eficientemente desenvolvido e validado, apresentando seletividade, linearidade, exatidão e precisão. A quimiometria se mostrou eficiente para detectar as limitações do método e para a definição das variáveis para se obter o melhor desempenho (maior separação e menor tempo de análise).

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR SEPARATION OF THREE ASSETS AND THEIR RESPECTIVE IMPURITIES WITH APPLICATION OF FACTORIAL PLANNING

An essential part of the development of a new drug is the development of methods to analyze the products during the stage of development and throughout their useful life to ensure quality and safety for patients. The analytical method must be indicative of stability, that is, capable of detecting, over time, changes in the physical, chemical or microbiological properties of a substance. Other important characteristics describe that they are specific methods able of accurately measuring the dosage of the active pharmaceutical ingredient (mg/tablet), degradation products (% of impurity) and other components of interest, without interference. In order to identify and quantify different components of a product's formulation, chromatographic techniques are widely used. By means of this technique it is possible to properly separate the substances present in the formulation and quantify several analytes in the same analytical run. Several factors interfere in the separation of components in the chromatographic method, highlighting the pH of the mobile phase, the type of material in the stationary phase, the type of solvent and its concentration in the mobile phase, among others. The goal was to use chemometric tools to explore the principles of separation of three drugs and their respective impurities and to develop an indicative method of stability by HPLC-DAD. The initial tests were performed on a sample built with the presence of the three actives and their impurities, which were added or generated through sample stress. Chromatographic separation was evaluated in screening and optimization tests. Screening was performed with a wide range of mobile phase pH and different chromatographic columns. Different organic solvents and rates of increase in organic solvent concentration (gradient time) along the analytical run were also evaluated. Data were processed using Fusion and Octave software. The analytical method indicative of stability for the separation of the three actives was efficiently developed and validated, presenting itself as selective, linear, accurate and precise. The use of chemometric tools proved to be efficient to detect the limitations of the method and to define the variables to obtain the best performance (greater separation and shorter analysis time).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. CONTEXTO FARMACÊUTICO.....	2
1.2. MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	3
2. OBJETIVOS	5
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. HISTÓRICO DAS LEGISLAÇÕES.....	7
3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA(HPLC)	8
3.3. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	9
3.4. APLICAÇÃO DAS FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NO DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	9
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
4.1. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	16
5.1. VARREDURA.....	16
5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (FACE CENTRADA)	17
5.3. TRATAMENTO DOS DADOS NO OCTAVE	19
5.3.1. Cálculo da Regressão para a resposta y1 (número total de picos)	19
5.3.2. Cálculo da Regressão para a resposta y2 (número de picos com resolução maior que 1,5).....	22
5.3.3. Cálculo da regressão para a desejabilidade global	25
5.4. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	34
5.5. RESULTADOS DO PROGRAMA FUSION	36
5.6. DEFINIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO E VALIDAÇÃO DO MODELO	37
5.7. MODELO UTILIZANDO COMO RESPOSTA A RESOLUÇÃO DOS PICOS MAIS PRÓXIMOS (PAR CRÍTICO)	39
5.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	41

5.8.1. Especificidade/Seletividade	42
5.8.2. Linearidade	43
5.8.3. Exatidão.....	44
5.8.4. Precisão.....	47
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE	57

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO FARMACÊUTICO

O mercado farmacêutico brasileiro ultrapassou a marca de 100 bilhões de reais em 2019, representando um aumento de 11,4% em relação ao ano anterior. Apenas no segmento do varejo, o aumento foi de 53% quando comparado aos 4 anos anteriores. Esta alta é justificada pelo envelhecimento da população e oferta de novos tratamentos (Guia Interfarma, 2020).

As indústrias farmacêuticas desenvolvem e lançam a cada momento, novos medicamentos no mercado nacional. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é responsável, dentre outras atribuições, pelo registro do medicamento, que é o ato por meio do qual autoriza a comercialização de determinado produto. Essa autorização ocorre mediante “avaliação do cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionada com a eficácia, segurança e qualidade destes produtos”. Tais critérios são regulamentados pelo Decreto nº 3.961 de 10 de outubro de 2001, revogado pelo Decreto nº 8.077 de 14 de agosto de 2013. A análise da documentação referente à Tecnologia Farmacêutica de um processo de registro de medicamentos novos, genéricos ou similares é atribuição da Gerência de Avaliação de Tecnologia de Registro de Medicamentos Sintéticos – GRMED (ANVISA, 2022).

A LIBBS (Laboratório Industrial Brasileiro de Biologia e Síntese) é uma indústria farmacêutica privada 100% brasileira com mais de 60 anos de mercado. Ocupa a 13ª posição entre os laboratórios mais prescritos pelos médicos e a 8ª posição em valor no mercado farmacêutico de varejo. Com mais de 2900 colaboradores, a empresa produz mais de 50 milhões de unidades de medicamentos por ano e investe 10% do faturamento em pesquisa e inovação (Libbs, 2022).

O principal investimento da empresa concentra-se no lançamento de novos medicamentos. O registro de tais medicamentos, genéricos e similares, é regulamentado pela RDC nº 200, de 26 de dezembro de 2017 (RDC 200, 2017). Para o registro, é necessária uma série de documentos técnicos gerados durante o desenvolvimento do mesmo. Assim, é preparado dossiê que deve ser apresentado para avaliação. Dentre esses documentos, um estudo de estabilidade do produto precisa ser realizado seguindo critérios descritos na RDC 318 de 06 de novembro 2019 (RDC 318, 2019). Também é necessário que se conduzam ensaios de degradação forçada nos medicamentos, em

acordo com a RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015 (RDC 53, 2015), para obter um melhor entendimento das rotas de degradação do produto e os produtos gerados.

1.2. MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Um dos maiores desafios encontrados no processo de registro de um novo medicamento é o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade. Segundo a guia 4 da Anvisa (Guia 04, 2015), métodos indicativos de estabilidade devem possuir as seguintes características: são métodos analíticos quantitativos indicados para análise de amostras de estabilidade e devem ser validados. Além disso, devem ser capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância. Outras características importantes descrevem que são métodos específicos capazes de mensurar com exatidão a dosagem do insumo farmacêutico ativo (mg/comprimido), produtos de degradação (% de impureza) e outros componentes de interesse, sem interferência. A classificação de um método como indicativo de estabilidade depende da finalidade a qual ele é proposto. Um método pode ser indicativo de estabilidade somente para dosagem (mg/comprimido), sendo capaz de quantificar um IFA (Insumo farmacêutico ativo) em meio aos seus produtos de degradação. Além disso, o método não precisa quantificar todos os produtos de degradação relevantes; ou somente para produtos de degradação (% de impureza), sendo capaz de quantificar todos os produtos de degradação relevantes, mas não o IFA; ou ainda indicativo de estabilidade para ambos os aspectos, ou seja, para dosagem (mg/comprimido) e para produtos de degradação (% de impurezas) (Guia 04, 2015).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado profissional tem como objetivo apresentar os resultados do desenvolvimento e otimização de um método analítico indicativo de estabilidade para determinação de teor e substâncias relacionadas, utilizando ferramentas de planejamento experimental multivariado. O alvo do projeto é um medicamento de forma farmacêutica sólida com a presença de três princípios ativos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Construir um modelo para predição das principais variáveis do método analítico;
- Validar o modelo experimentalmente;
- Desafiar o método analítico para comprovar sua eficácia através da Linearidade, exatidão, precisão e seletividade.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. HISTÓRICO DAS LEGISLAÇÕES

Com o desenvolvimento de novos medicamentos no início do século XX, surgiram problemas relacionados ao seu uso devido à falta de regulamentação do segmento farmacêutico. Dentre esses incidentes destaca-se o caso da Talidomida, as quais muitas crianças nasceram com má formação (KIM e SCIALLI, 2011).

No intuito de garantir a segurança dos pacientes, vários órgãos sanitários de diversos países publicaram legislações e guias relacionados à segurança e eficácia dos medicamentos. Em um mundo globalizado, as indústrias estavam expandindo seus negócios e as diferentes exigências nos países dificultaram muitas vezes o lançamento de novas drogas em vários países simultaneamente, devido diferenças nestas exigências. Desta forma, ficou evidente a necessidade de harmonizar as legislações de diferentes países. Em 1990 o *International Council for Harmonization* (ICH) foi criado com o objetivo de harmonizar os requerimentos técnicos para medicamentos de uso humano (ICH, 2022). Inicialmente países da Europa, Estados Unidos e Japão faziam parte do ICH (ICH, 2022).

Vários guias começaram a ser publicados pelo ICH, particularmente em 1993 foi publicado o guia que tratava especialmente dos testes de estabilidade de medicamentos (*“Guideline on Stability Testing of new drugs substances and products”* - ICH Q1A) (ICH Q1A, 2003). Juntamente com outros guias, várias diretrizes relacionadas as impurezas encontradas nos fármacos e seus respectivos limites passaram a ser objeto de avaliação rigorosa nos registros dos medicamentos.

No Brasil, a ANVISA foi criada em 26 de janeiro de 1999 (Anvisa - Institucional). Em 2015 a ANVISA passou a fazer parte do ICH com o compromisso de harmonizar os seus guias e diretrizes (Anvisa - Institucional).

Uma série de resoluções vem sendo publicadas desde então. Destaca-se a RDC 53 de 2015, que “Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências” (RDC 53, 2015) e do guia 4 de 2015 (Guia 04, 2015), no qual enfatiza a importância do método indicativo de estabilidade para correta avaliação dos produtos de degradação dos medicamentos.

3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA(HPLC)

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação que passou a ser uma das técnicas analíticas instrumentais mais utilizadas para fins qualitativos e quantitativos. É baseada no equilíbrio dos componentes de interesse, entre duas fases imiscíveis: fase estacionária e móvel (ROUSSEAC e ROUSSEAC, 2007). A técnica tem sido usada mundialmente, como uma ferramenta de análise de rotina em laboratórios e, dessa forma, a busca por análises mais rápidas tornou-se cada vez necessária.

A Figura 1 ilustra um sistema cromatográfico convencional e seus módulos.

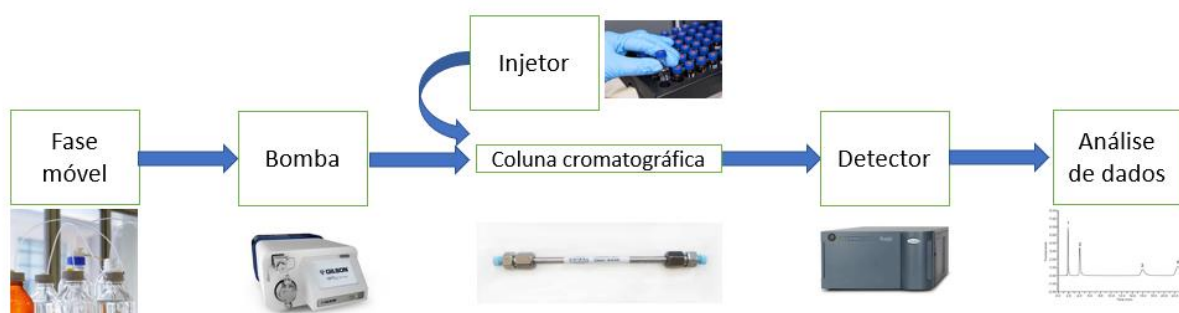


Figura 1: Esquema do cromatógrafo líquido convencional

Conforme observado na Figura 1, a fase móvel (composta por uma mistura de diferentes solventes) é bombeada através de uma fase estacionária (coluna cromatográfica) com o auxílio de uma bomba (peristáltica ou de pistão). Os analitos presentes na amostra se separam na fase estacionária de acordo com sua afinidade pela fase móvel e são identificados e quantificados ao passar pelo detector (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012) (AMORIM, 2019).

A composição da fase móvel pode ser constante durante toda a análise (eluição isocrática) ou sofrer alterações das proporções dos solventes ao longo da análise (eluição gradiente) (AMORIM, 2019) (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012).

Na análise cromatográfica busca-se a separação eficiente dos analitos presentes na amostra. Variáveis como a vazão da fase móvel, tipo de material da fase estacionária, tipos de solventes utilizados na fase móvel e suas concentrações, velocidade de aumento da concentração de solvente orgânico na fase móvel (na eluição gradiente) e pH da fase móvel interferem diretamente na eficiência da separação cromatográfica e conseqüentemente no resultado da análise (AMORIM, 2019) (SNYDER, KIRKLAND e GLAJCH, 2012).

3.3. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida pode ser utilizada uma abordagem tradicional ao alterar uma variável por vez, ou aplicar uma abordagem multivariada, também chamada de *Quality by design (QbD)* (BRYNN, 2012) (ARAUJO, ANDRADE, *et al.*, 2021).

Na abordagem tradicional a influência da variação de cada variável na separação é avaliada separadamente. Essa abordagem confere uma visão limitada da região experimental e não permite prever as respostas de condições não testadas. Além disso a interação entre as variáveis quando ambas são alteradas é desconsiderada (MURRAY, BELLANY, *et al.*, 2016).

Por outro lado, a abordagem quimiométrica utiliza métodos matemáticos e estatísticos para planejar os experimentos e obter um número maior de informações químicas na análise dos dados (MURRAY, BELLANY, *et al.*, 2016). Com esta abordagem é possível prever resultados em condições não testadas e definir o número total de experimentos a serem executados dentro de um limite definido.

3.4. APLICAÇÃO DAS FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS NO DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Devido a presença de muitas variáveis no desenvolvimento de um método analítico, o uso de ferramentas quimiométricas para definição e otimização das mesmas se apresenta como uma forma eficiente e robusta para o desenvolvimento.

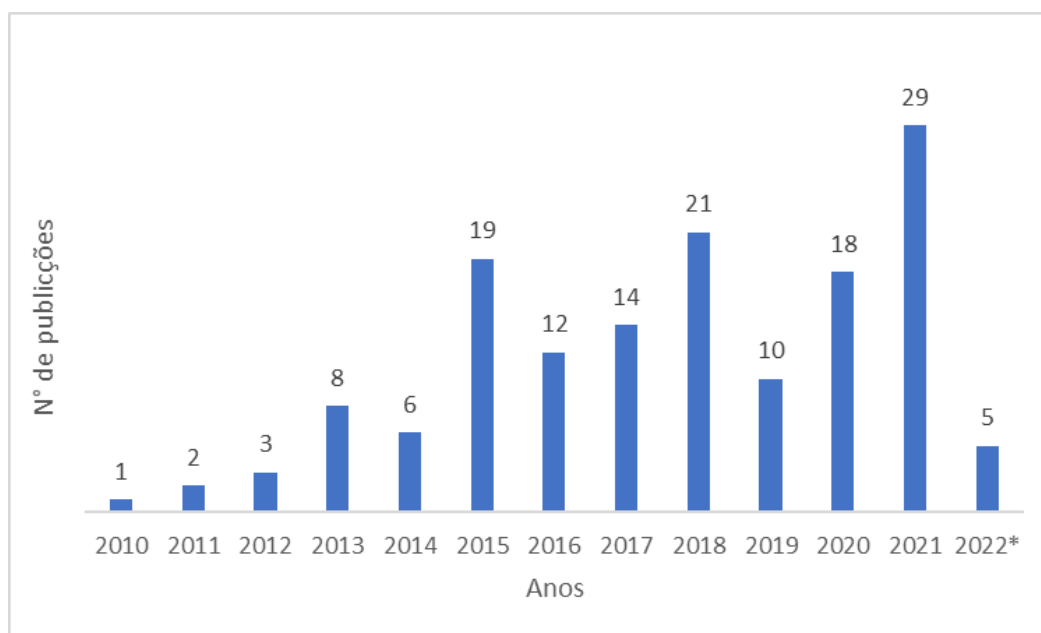
Bandeira, M. C., e Ferreira J.M. utilizaram um planejamento fatorial completo 2^3 para otimizar a extração da matéria prima insaponificável para determinação de colesterol em ração para ruminantes empregando um método de quantificação por cromatografia gasosa. Como resultado, foi obtido um método com exatidão e precisão satisfatórias, de fácil execução e utilizando pequenas quantidades de solventes (BANDEIRA e FERREIRA, 2008).

Aguirre-Gonzalez *et al.* otimizaram a técnica de micro extração em fase sólida acoplada a *headspace* para avaliação de subprodutos de desinfecção de cloro por cromatografia gasosa em água potável através de um planejamento fatorial completo 2^5 . Utilizando uma superfície de resposta foi possível determinar as variáveis que mais influenciam a técnica e determinar a condição de melhor resposta (AGUIRRE-GONZALEZ, TABORDA-OCAMPO, *et al.*, 2011).

T. Rakic *et al.* desenvolveram e otimizaram um método de cromatografia líquida para determinação de Fluconazol e suas impurezas. Quatro tipos de planejamentos fatoriais foram aplicados: completo em dois níveis, composto central, Box-Behnken e completo em três níveis. O objetivo era alcançar a separação máxima de todas as substâncias investigadas. Os planejamentos composto central e fatorial completo de três níveis foram os que proporcionaram os melhores modelos. O modelo composto central, por requerer um menor número de experimentos foi utilizado para o exame teórico do espaço experimental (RAKIC, KASAGIC-VUJANOVIC, *et al.*, 2014).

Já Lalit Kumar *et al* desenvolveram e otimizaram um método cromatográfico para análise de nanopartículas de Valsartana utilizando um planejamento fatorial completo. As respostas avaliadas foram área do pico, fator de cauda e número de pratos teóricos. Com o estudo realizado os autores identificaram os efeitos de cada variável nas respostas desejadas e obtiveram uma condição ideal com precisão da recuperação das nanopartículas de Valsartana entre 98,57 a 100,27% (KUMAR, REDDY, *et al.*, 2015).

Em um artigo de revisão de Tim Tomé *et al* de 2019 (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019) foi apresentada o número de publicações científicas sobre o tema *Analytical Quality bydesign (AQbD)* conforme mostrado na Figura 2.



*Até fevereiro de 2022

Figura 2- Número de publicações científicas sobre AQbD

Fonte: Dados até 2019 (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019) e os dados dos anos subsequentes foram inseridos pelo autor desta dissertação

Nesta revisão foi apresentado o conceito de AQbD como uma extensão do QbD que foi introduzido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e aprovado em 2005 pelo ICH. De acordo com o artigo, AQbD é uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de métodos, controlando todas as etapas do ciclo de vida do procedimento analítico. Inclui uma definição do perfil analítico do alvo (ATP), identificação de parâmetros ou fatores críticos do método e seleção de atributos críticos do método (CMAs) ou respostas. Desenhos experimentais de triagem e superfície de resposta permitem o reconhecimento de fatores significativos e sua otimização por análise estatística. A relação fator-resposta é descrita por um modelo matemático, capaz de prever a condição ótima. Combinações multivariadas de fatores que atendem aos requisitos do CMA são apresentadas no espaço de projeto ou região de projeto operável pelo método (MODR), onde o desempenho robusto do método é garantido (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019). Os métodos analíticos desenvolvidos por esta abordagem são mais robustos, facilmente validáveis, tem tempos de execução mais curtos e são capazes de determinar maior número de analitos em uma análise cromatográfica, resultando em ganho de tempo e economia de recursos (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019).

Os autores concluíram que um método analítico desenvolvido em uma abordagem tradicional onde se avalia o efeito da alteração de uma variável por vez pode levar a condições não otimizados sem qualquer conhecimento de sua robustez, o que acarretará em falhas durante sua execução. O planejamento fatorial representa uma parte crucial do AQbD, pois permite investigar os efeitos dos fatores e suas interações (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019).

Com base nas muitas publicações e pesquisas sobre a abordagem AQbD para o desenvolvimento de métodos analíticos e a introdução de uma nova diretriz do ICH (Q14) (ICH Q14, 2018) sobre o desenvolvimento de métodos analíticos, a aplicação do planejamento fatorial juntamente com a abordagem AQbD na indústria farmacêutica se tornará inevitável (TOME, ZIGARD, *et al.*, 2019).

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

Com o objetivo de proteger informações confidenciais dos produtos da Libbs farmacêutica, as identificações das substâncias utilizadas neste trabalho foram codificadas. O método foi desenvolvido para determinação do teor das substâncias relacionadas de um produto contendo três ativos, que serão mencionados neste documento como Ativo 1, Ativo 2 e Ativo 3. As impurezas também serão nomeadas como Impureza 1, Impureza 2 e assim sucessivamente.

4.1. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

Os ensaios para o desenvolvimento do projeto de pesquisa foram realizados nas instalações do centro de desenvolvimento integrado (CDI) da empresa Libbs farmacêutica localizado na cidade de Embu das Artes- SP. As instalações contam com uma grande variedade de equipamentos analíticos qualificados para oferecer dados confiáveis, rastreáveis e condições ideais para a realização do projeto.

O método foi desenvolvido e otimizado em equipamentos (HPLC e UPLC) das marcas Agilent® (Modelo 1290) e Waters® (Modelo Acquity H-Class), ambas reconhecidas internacionalmente. Os instrumentos estão equipados com detector de arranjo de diodos (DAD) para verificação da pureza cromatográfica dos picos. As colunas cromatográficas utilizadas foram Xterra RP8 (Waters), Eclipse XDB C18 (Agilent), Zorbax SB C18 (Agilent), Xterra RP18 (Waters). Além disso, foram empregados padrões analíticos de referência (farmacopeicos ou caracterizados) conforme preconiza a RDC 166/2017 (RDC 166, 2017). Os solventes orgânicos utilizados (Metanol e Acetonitrila) foram adquiridos da empresa Merck e a água ultrapura foi obtida do sistema milli-Q da Millipore.

Com o objetivo de obter uma amostra com todas as impurezas passíveis de serem formadas na vida útil do produto, foi preparada uma amostra contendo os três ativos do produto e a mesma foi submetida a temperatura e umidade controlada de 70°C/75% U.R. (Câmara Mecalor, Brasil) por 14 dias. Esta condição de degradação foi empregada com base na suscetibilidade das moléculas a este tipo de degradação que foi verificada através de uma avaliação *in silico*. Em seguida esta amostra foi contaminada com padrões de impurezas conhecidas dos ativos.

Inicialmente foi realizada uma varredura onde foram definidas as variáveis que mais impactam na separação e depois foi realizado um planejamento fatorial completo (face centrada) e por meio de um algoritmo destinado aos cálculos de regressão e análise de variância (Anova, *Analysis of Variance*), foram definidas e otimizadas as condições ideais para o método. Na realização dos cálculos foram utilizados os programas Octave (programa livre) e Fusion® (S-Matrix) para tratamento dos dados estatísticos.

As variáveis avaliadas foram:

- Composição da fase estacionária (diferentes colunas cromatográficas);
- Tipos de solventes (Metanol e Acetonitrila)
- pH da fase móvel
- Velocidade do aumento da concentração de orgânico ao longo da análise cromatográfica (tempo do gradiente)

As respostas avaliadas foram o número total de picos, e o número de picos com maior resolução cromatográfica (separação dos picos).



RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. VARREDURA

Nesta primeira parte foram realizadas análises exploratórias com as seguintes variáveis:

- Coluna cromatográfica: Foram testadas as colunas Xterra RP8 (Waters), Eclipse XDB C18 (Agilent), Zorbax SB C18 (Agilent), Xterra RP18.
- Tipos de solventes: Foram testados os solventes Acetonitrila e Metanol.
- pH da fase móvel: Foram testadas fases móveis com valores de pH de 2 e 5. Os valores de pH foram definidos com base no pKa das moléculas dos ativos, onde definiu-se que valores de pH acima de 5 favoreceriam a ionização das moléculas. Este fato diminuiria a interação das mesmas com a coluna cromatográfica, dificultando a retenção.
- Velocidade do aumento da concentração de orgânico ao longo da análise cromatográfica (tempo do gradiente): Foram testados gradientes de 30 e 50 minutos.

Os testes de varredura foram conduzidos com uma amostra construída conforme mencionado anteriormente. Avaliou-se como resposta o número total de picos e o número de picos com resolução cromatográfica (separação dos picos) maior que 1,5. O parâmetro 1,5 foi tomado como critério de seleção das condições, pois permite separação eficientemente dos picos.

O objetivo desta etapa era definir as variáveis que mais impactavam na separação e identificar qual coluna cromatográfica e solvente seriam utilizados nos experimentos subsequentes. Desta forma, foi possível seguir para o planejamento fatorial com um número reduzido de variáveis para construção do modelo matemático.

Após esta avaliação visual dos cromatogramas e dos valores de número total de picos e resolução, concluiu-se que a coluna cromatográfica com melhor separação e picos mais simétricos foi a Zorbax SB C18 e o melhor solvente para a análise era a acetonitrila. As variáveis que mais impactaram na separação dos picos foram o pH da fase móvel e a velocidade do aumento da concentração de orgânico da fase móvel ao longo da análise cromatográfica (tempo do gradiente).

A partir destas conclusões seguiu-se com o planejamento fatorial completo com as variáveis pH e tempo do gradiente.

5.2. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (FACE CENTRADA)

Com duas variáveis definidas (tempo de gradiente e valor de pH da fase móvel) o tipo de planejamento executado foi o de face centrada com ponto central. Para avaliar o erro aleatório foram preparadas cinco réplicas no ponto central e em duplicata nos demais pontos.

Com base nos resultados encontrados na fase de avaliação das variáveis, foram definidos os valores de pH da fase móvel de 2 a 4 e os tempos de gradiente de 30 e 50 minutos. As respostas foram mantidas as mesmas descritas anteriormente, ou seja, número total de picos e número de picos com resolução maior que 1,5.

As variáveis e as respostas foram codificadas conforme mostram as Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1: Legenda da codificação das variáveis

Níveis	Variáveis			
	Variável 1: Tempo de gradiente		Variável 2: pH da fase móvel	
	Valor codificado	Valor real (minutos)	Valor codificado	Valor real (unidade de pH)
Baixo	-1	30	-1	2,0
Central	0	40	0	3,0
Alto	1	50	1	4,0

Tabela 2: Legenda da codificação das respostas

Respostas	
y1	Número total de picos
y2	Número total de picos com resolução maior que 1,5

Na Tabela 3 está representada a matriz do planejamento fatorial completo face centrada com ponto central.

Tabela 3: Planejamento fatorial completo (face centrada) com ponto central (n=21)

Experimentos	Coeficiente linear	V1		V2		Coeficientes quadráticos	Coeficiente de interação	Respostas monitoradas	
		TEMPO	pH	b11	b22			y1	y2
	b0	b1	b2	b11	b22	b12	y1	y2	
1	1	-1	-1	1	1	1	11	10	
2	1	-1	-1	1	1	1	11	9	
3	1	1	-1	1	1	-1	10	9	
4	1	1	-1	1	1	-1	10	9	
5	1	-1	1	1	1	-1	10	9	
6	1	-1	1	1	1	-1	11	10	
7	1	1	1	1	1	1	11	8	
8	1	1	1	1	1	1	11	7	
9	1	-1	0	1	0	0	15	7	
10	1	-1	0	1	0	0	15	7	
11	1	1	0	1	0	0	16	7	
12	1	1	0	1	0	0	16	8	
13	1	0	1	0	1	0	9	6	
14	1	0	1	0	1	0	9	6	
15	1	0	-1	0	1	0	11	8	
16	1	0	-1	0	1	0	10	7	
17	1	0	0	0	0	0	10	7	
18	1	0	0	0	0	0	10	7	
19	1	0	0	0	0	0	10	7	
20	1	0	0	0	0	0	10	7	
21	1	0	0	0	0	0	10	7	

Na Figura 3 está representado graficamente o desenho espacial do estudo.

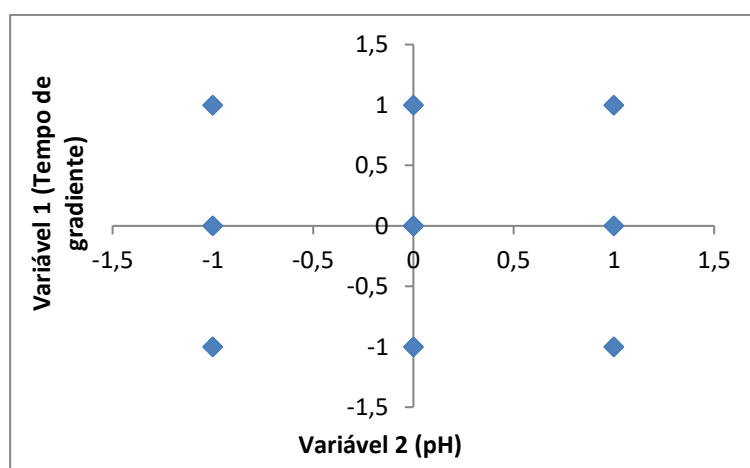


Figura 3: Representação gráfica do desenho espacial do estudo

Na Figura 3 podemos observar a abrangência do estudo e a região onde será possível identificar a melhor condição para as variáveis.

Como o programa Fusion já realiza o tratamento dos dados automaticamente e fornece as condições ideais para a análise, os dados foram tratados inicialmente no programa Octave.

Primeiramente foi aplicado um algoritmo de regressão (Tabela Anova) para construção de um modelo a partir dos coeficientes significativos. Depois definiu-se a condição ideal de cada variável através de uma superfície de resposta. Depois o modelo encontrado foi validado experimentalmente através de uma análise com a condição sugerida, onde se busca a melhor separação cromatográfica com maior frequência analítica e pureza satisfatória dos picos obtidos.

5.3. TRATAMENTO DOS DADOS NO OCTAVE

5.3.1. Cálculo da Regressão para a resposta y1 (número total de picos)

Após realizar os cálculos no Octave com o auxílio do algoritmo Regression2 (PEREIRA-FILHO, 2018) (PEREIRA-FILHO, 2012), obteve-se os seguintes dados demonstrados nas Figuras 4, 5 e 6.

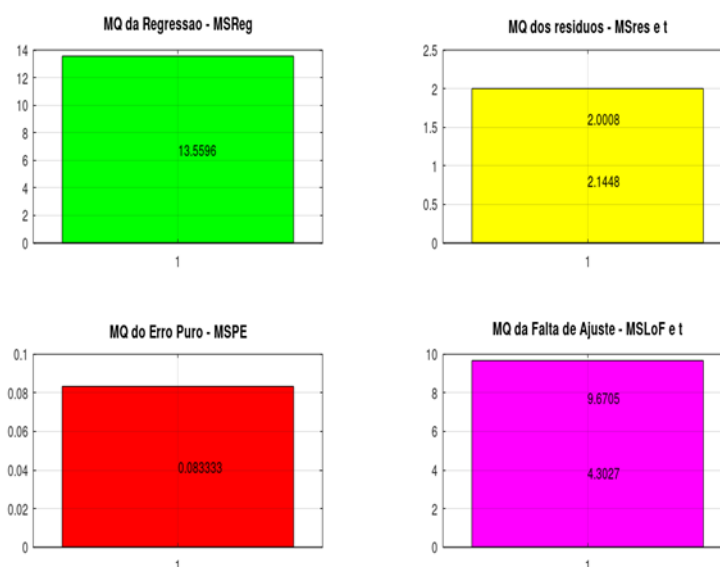


Figura 4: Valores das médias quadráticas do modelo para resposta y1

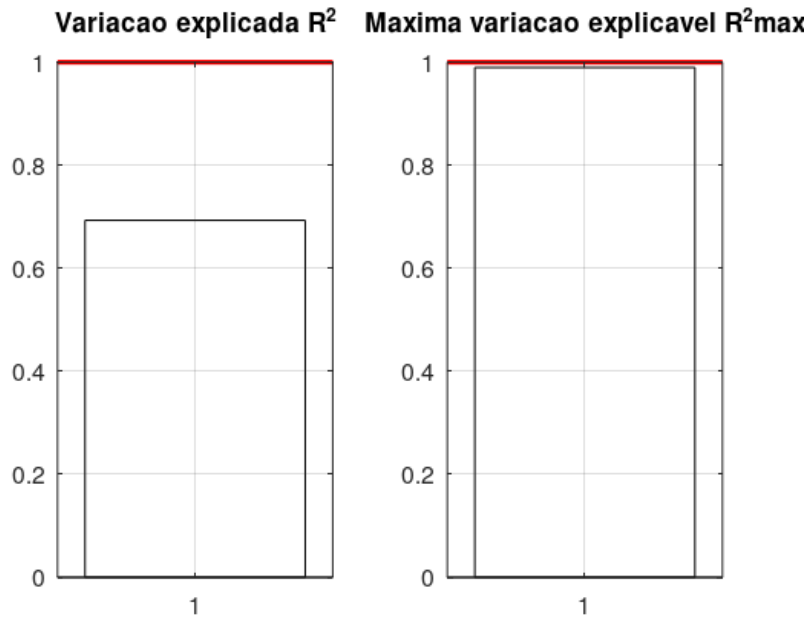


Figura 5: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para resposta y_1

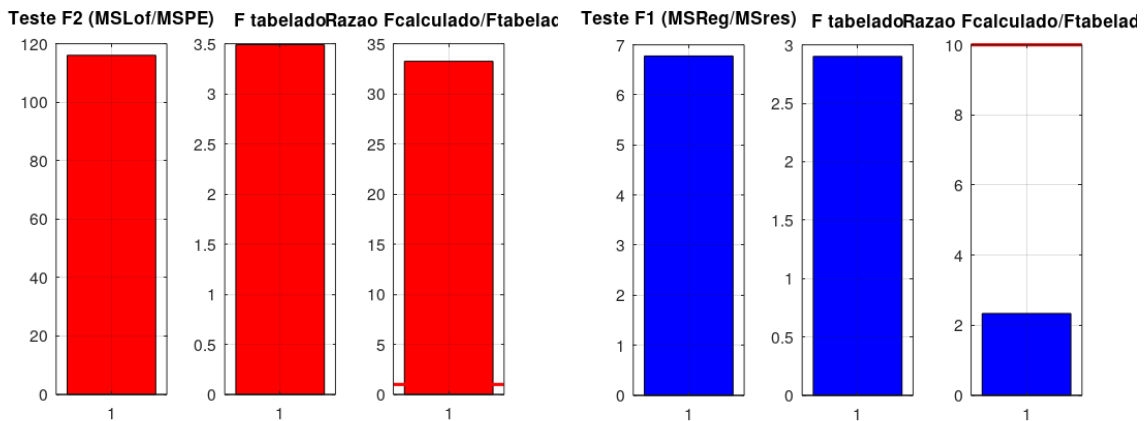


Figura 6: Valores dos testes F1 e F2 do modelo para resposta y_1

Como o modelo apresentou falta de ajuste (Figura 6), observado pelos valores da razão do F calculado pelo F tabelado (maior que 1) em F2 e menor que 10 em F1, foram utilizados os valores da média quadrática da falta de ajuste e seu respectivo valor de t para determinação dos erros e intervalo de confiança dos coeficientes da regressão. A Figura 7 apresenta os gráficos para os valores experimentais *versus* previstos e os resíduos da regressão. Já a Tabela 4 mostra os coeficientes, seus intervalos de confiança (IC) e as faixas (mínimo e máximo) de cada um deles.

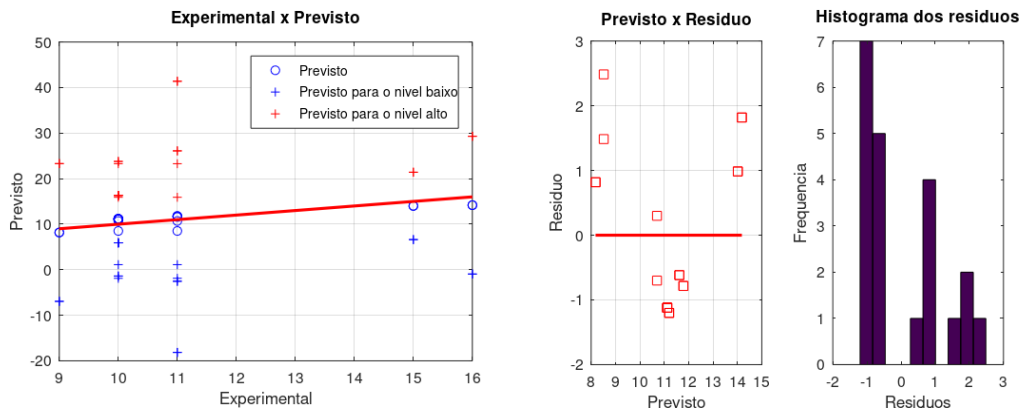


Figura 7: Gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e resíduos do modelo para a resposta y1

Tabela 4: Valores dos coeficientes do modelo para a resposta y1

	<i>Média</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>IC</i>
b0	11,12	5,91	16,33	5,21
b1	0,08	-3,78	3,94	3,87
b2	-0,17	-4,03	3,70	3,86
b11	2,98	-3,07	9,03	6,05
b22	-2,77	-8,82	3,28	6,05
b12	0,38	-4,36	5,11	4,73

Analisando os dados obtidos, verificamos que apenas o coeficiente b0 foi significativo para este modelo, pois é o único que não assume o valor de zero no intervalo de confiança, conforme podemos visualizar na Figura 8. É importante lembrar que o algoritmo utilizado (Regression2) emprega um nível de confiança de 95% (p-valor = 0,05) (PEREIRA-FILHO, 2018), (PEREIRA-FILHO, 2012).

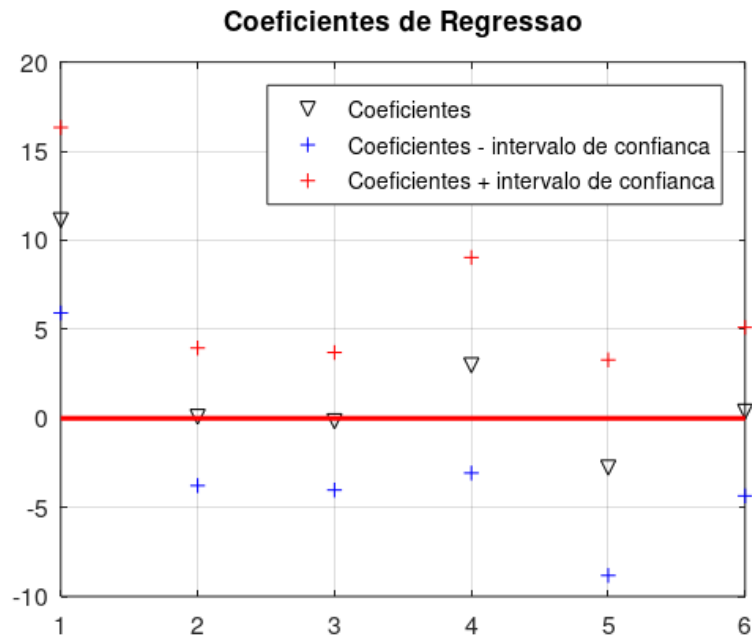


Figura 8: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para as respostas y1

5.3.2. Cálculo da Regressão para a resposta y2 (número de picos com resolução maior que 1,5)

Após realizar os cálculos no Octave (uso do algoritmo Regression2), obteve-se os seguintes dados mostrados nas Figuras 9, 10 e 11.

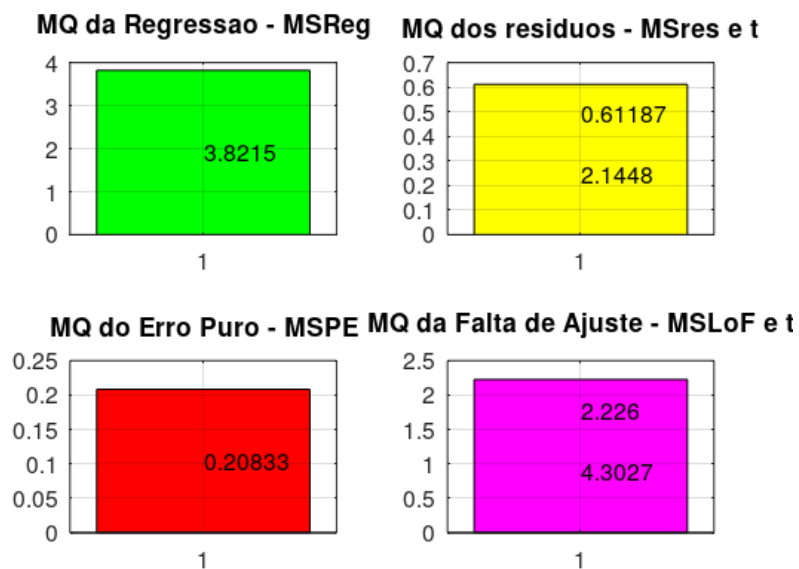


Figura 9: Valores das médias quadráticas do modelo para a resposta y2

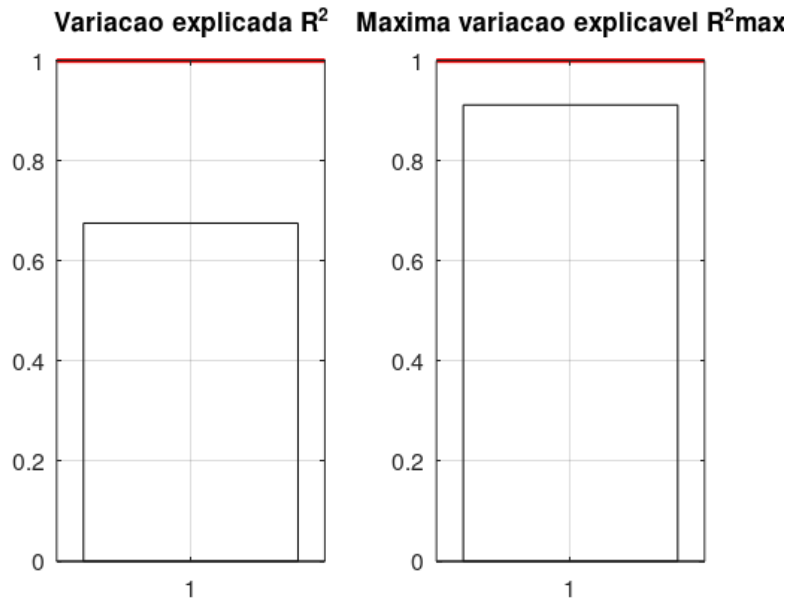


Figura 10: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para a resposta y_2

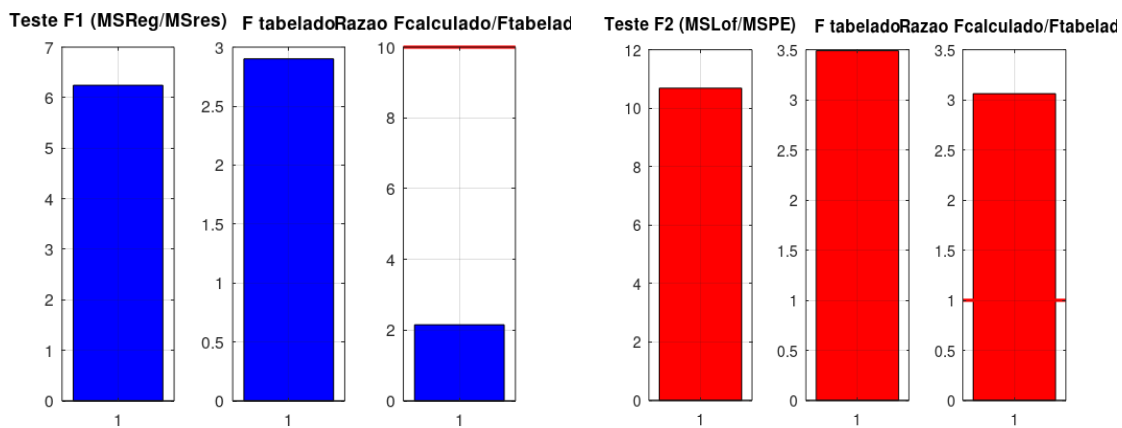


Figura 11: Valores do teste F1 e F2 do modelo para a resposta y_2

Semelhantemente ao modelo da resposta y_1 , o modelo para a resposta y_2 apresentou falta de ajuste, observado pelos valores da razão do F calculado pelo F tabelado (maior que 1) em F2 e menor que 10 em F1. Por esta razão foram utilizados os valores da média quadrática da falta de ajuste e seu respectivo valor de t para determinação dos coeficientes da regressão e dos resíduos. A Figura 12 apresenta os gráficos para os valores experimentais *versus* previstos e os resíduos da regressão para a resposta y_2 . Já a Tabela 5 mostra os coeficientes, seus IC e as faixas (mínimo e máximo) de cada um deles.

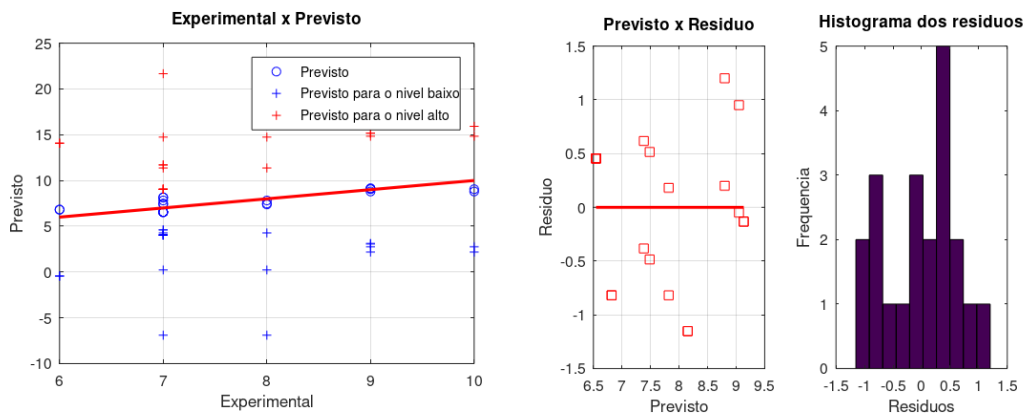


Figura 12: Gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e resíduos do modelo para a resposta y_2

Tabela 5: Valores dos coeficientes do modelo para a resposta y_2

	<i>Média</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>IC</i>
b_0	6,55	4,05	9,04	2,50
b_1	-0,33	-2,19	1,52	1,85
b_2	-0,50	-2,35	1,35	1,85
b_{11}	1,27	-1,63	4,18	2,90
b_{22}	0,77	-2,13	3,68	2,90
b_{12}	-0,38	-2,64	1,89	2,27

Analisando os dados obtidos, verificamos que de forma análoga ao modelo para a resposta y_1 , apenas o coeficiente b_0 foi significativo para este modelo, pois é o único que não assume o valor de zero no intervalo de confiança, conforme podemos visualizar na Figura 13.

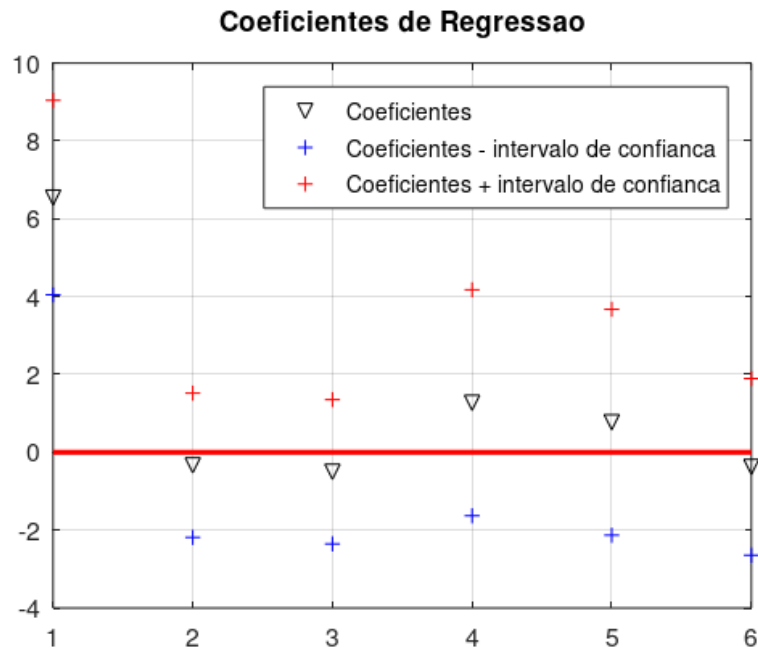


Figura 13: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para as respostas y2

5.3.3. Cálculo da regressão para a desejabilidade global

Com o objetivo de obter um modelo que atendesse as duas respostas de forma global, ou seja, um modelo que indicasse a melhor condição tanto para obter o maior número de picos quanto o maior número de picos com resolução maior que 1,5, foi calculada a desejabilidade para cada resposta e depois a desejabilidade global.

Para isso foi utilizada a função de desejabilidade de Derringer (CANDIOTI, DE ZAN, *et al.*, 2014) onde se calculou a desejabilidade individual (d_i) de cada resposta com o objetivo de obter o maior número (maximizar). A Figura 14 representa a fórmula utilizada para calcular.

$$di = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases}$$

Onde:
y = resposta
L = Menor valor aceitável
T = Valor alvo
s = peso

Se **s = 1**: a função é linear
 Se **s > 1**: maior importância é dada ao valores próximos do alvo (T)

Figura 14: Fórmula para cálculo da desejabilidade individual para maximizar a resposta

Aplicando-se a fórmula para as respostas temos um valor de desejabilidade variando de 0,00 a 1,00, onde o valor de desejabilidade igual a 0,00 é a resposta indesejável e o valor de desejabilidade igual a 1,00, a desejável. Na Tabela 6 são apresentados os valores calculados das desejabilidades individuais de cada uma das respostas (d1=desejabilidade da resposta y1 e d2=desejabilidade da resposta y2).

Tabela 6: Desejabilidade individual das respostas y1 e y2 (n=21).

N° de experimentos	Respostas		Desejabilidades	
	y1	y2	d1	d2
1	11	10	0,29	1,00
2	11	9	0,29	0,75
3	10	9	0,14	0,75
4	10	9	0,14	0,75
5	10	9	0,14	0,75
6	11	10	0,28	1,00
7	11	8	0,28	0,50
8	11	7	0,28	0,25
9	15	7	0,85	0,25
10	15	7	0,85	0,25
11	16	7	1,00	0,25
12	16	8	1,00	0,50
13	9	6	0,00	0,00
14	9	6	0,00	0,00
15	11	8	0,28	0,50
16	10	7	0,14	0,25
17	10	7	0,14	0,25
18	10	7	0,14	0,25
19	10	7	0,14	0,25
20	10	7	0,14	0,25
21	10	7	0,14	0,25

Após o cálculo das desejabilidades individuais das respostas foi determinada a desejabilidade global por meio da média geométrica dos resultados conforme a Equação 1:

$$D_g = \sqrt[m]{d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m}$$

Equação 1: Fórmula para o cálculo da desejabilidade global

Na Tabela 7 estão os resultados da desejabilidade global (Dg) com os quais foi construído e calculado um novo modelo no programa Octave por meio do algoritmo Regression2 (PEREIRA-FILHO, 2018) (PEREIRA-FILHO, 2012).

Tabela 7: Planejamento fatorial completo com a Desejabilidade global (Dg) (n=21)

Experimentos	Gradiente		pH		Resposta Dg
	Real	Cod	Real	Cod	
1	30	-1	2	-1	0,53
2	30	-1	2	-1	0,46
3	50	1	2	-1	0,33
4	50	1	2	-1	0,33
5	30	-1	4	1	0,33
6	30	-1	4	1	0,53
7	50	1	4	1	0,38
8	50	1	4	1	0,27
9	30	-1	3	0	0,46
10	30	-1	3	0	0,46
11	50	1	3	0	0,50
12	50	1	3	0	0,71
13	40	0	4	1	0,00
14	40	0	4	1	0,00
15	40	0	2	-1	0,38
16	40	0	2	-1	0,19
17	40	0	3	0	0,19
18	40	0	3	0	0,19
19	40	0	3	0	0,19
20	40	0	3	0	0,19
21	40	0	3	0	0,19

Após realizar os cálculos com a desejabilidade global (Dg) no Octave, obteve-se os seguintes dados nas Figuras 16, 17 e 18.

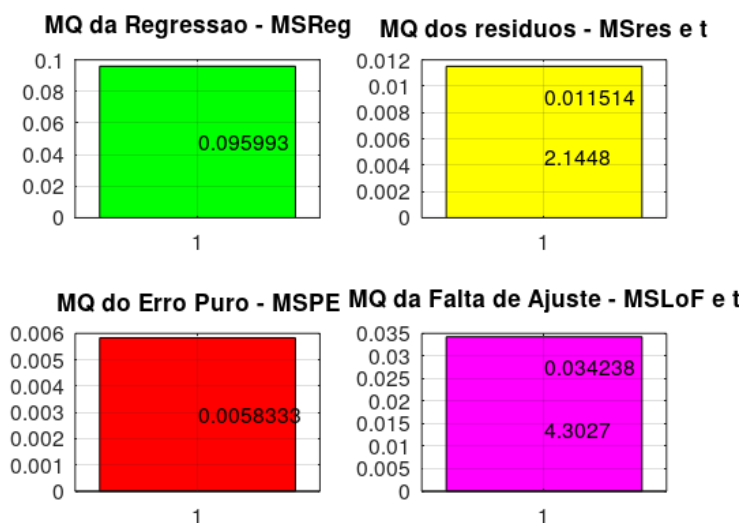


Figura 15: Valores das médias quadráticas do modelo para a desejabilidade global.

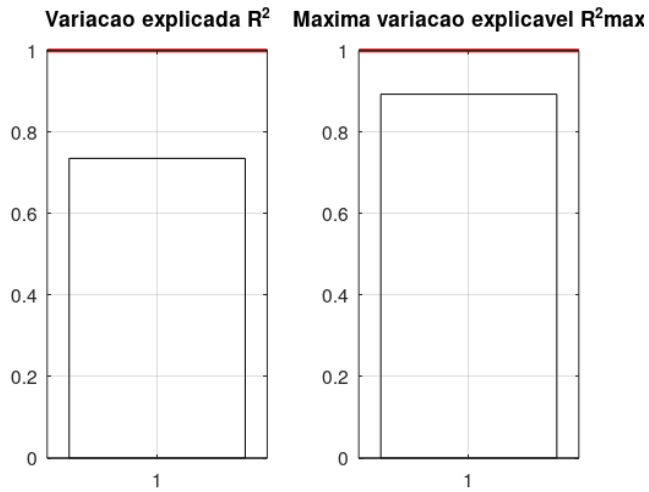


Figura 16: Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo para a desejabilidade global.

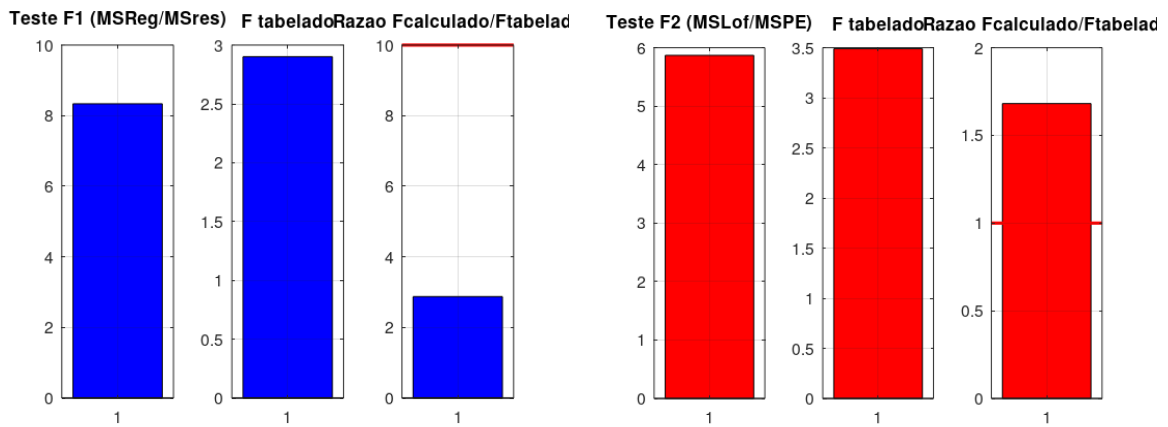


Figura 17: Valores do teste F1 e F2 do modelo para a desejabilidade global.

Calculando os coeficientes e os resíduos do modelo para a desejabilidade global obtivemos os resultados apresentados na Figura 18 e na Tabela 8.

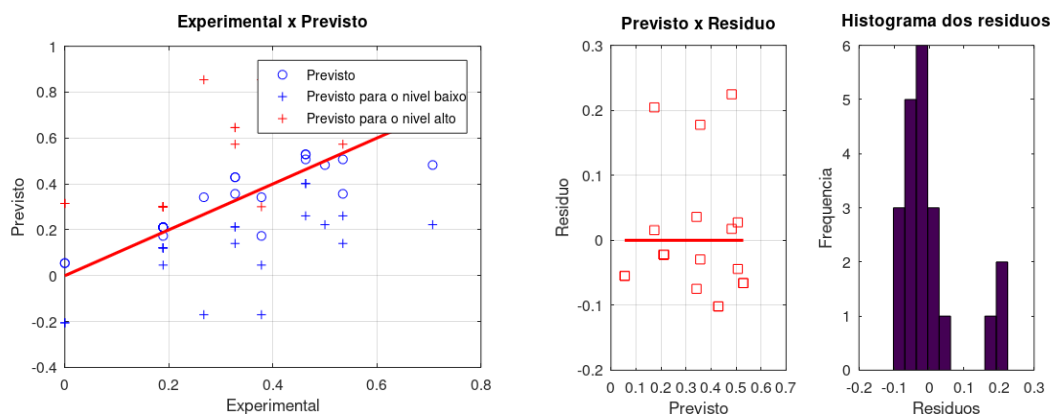


Figura 18: Gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e resíduos do modelo para deseabilidade global

Tabela 8: Valores dos coeficientes do modelo para deseabilidade global

	<i>Média</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>IC</i>
b0	0,21	0,12	0,30	0,09
b1	-0,02	-0,09	0,04	0,07
b2	-0,06	-0,13	0,01	0,07
b11	0,29	0,19	0,40	0,10
b22	-0,10	-0,20	0,01	0,10
b12	0,02	-0,07	0,10	0,08

Analisando os dados obtidos, verificamos que apenas os coeficientes b0 e b11 foram considerados significativos para este modelo, pois são os únicos que não assumem o valor de zero no intervalo de confiança, conforme ilustrado na Figura 19. É importante verificar também que o coeficiente b11 é positivo, ou seja, a concavidade do modelo proposto é voltada para cima.

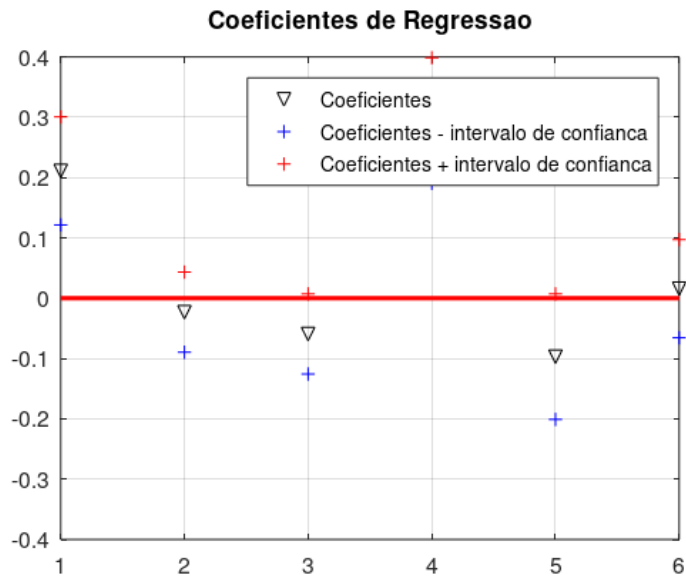


Figura 19: Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para a desejabilidade global

Diante dos resultados o modelo foi recalculado utilizando somente os coeficientes significativos (b_0 e b_{11}). A Tabela 9 indica os dados para a construção do modelo.

Tabela 9: Planejamento fatorial completo com os coeficientes significativos.

Exper.	b_0	b_{11}	D global
1	1	1	0,53
2	1	1	0,46
3	1	1	0,33
4	1	1	0,33
5	1	1	0,33
6	1	1	0,53
7	1	1	0,38
8	1	1	0,27
9	1	1	0,46
10	1	1	0,46
11	1	1	0,50
12	1	1	0,71
13	1	0	0,00
14	1	0	0,00
15	1	0	0,38
16	1	0	0,19
17	1	0	0,19
18	1	0	0,19
19	1	0	0,19
20	1	0	0,19
21	1	0	0,19

Com a eliminação dos coeficientes que não foram significativos a soma quadrática do erro puro (SQER) foi recalculada com 19 graus de liberdade. Após realizar os cálculos com os dados da Tabela 9 no Octave, obteve-se os seguintes dados representados nas Figuras 21, 22 e 23.

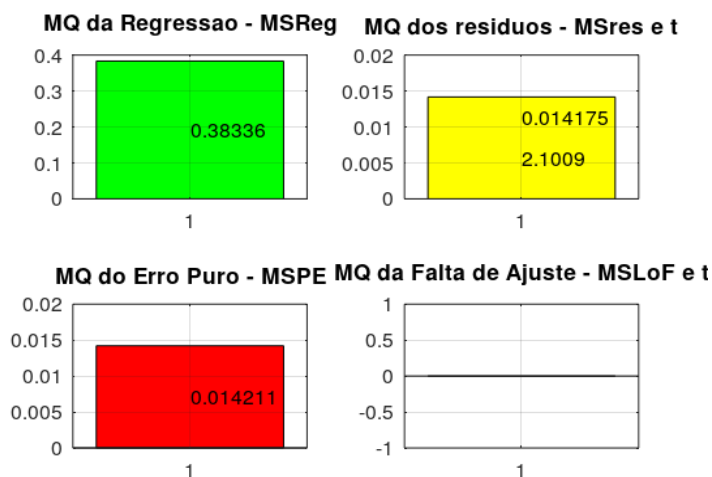


Figura 20: Valores das médias quadráticas do novo modelo para a desejabilidade global

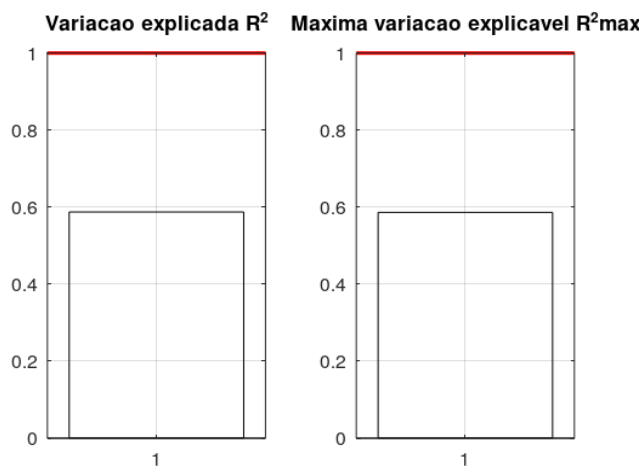


Figura 21: Valores de R^2 e R^2 máximo do novo modelo para a desejabilidade global

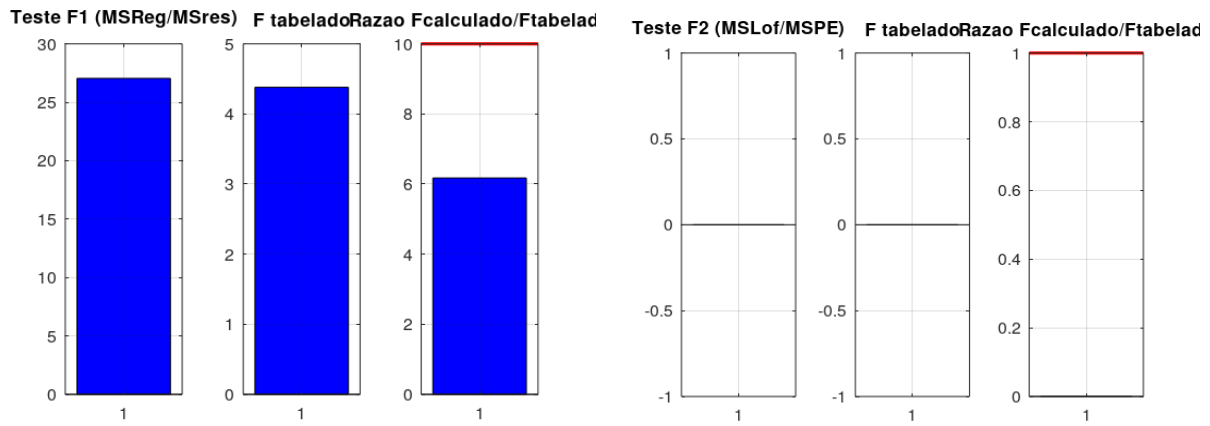


Figura 22: Valores do teste F1 e F2 do novo modelo para a desejabilidade global

Calculando os coeficientes e os resíduos do novo modelo para a desejabilidade global obtivemos os resultados apresentados na Figura 23 e na Tabela 10.

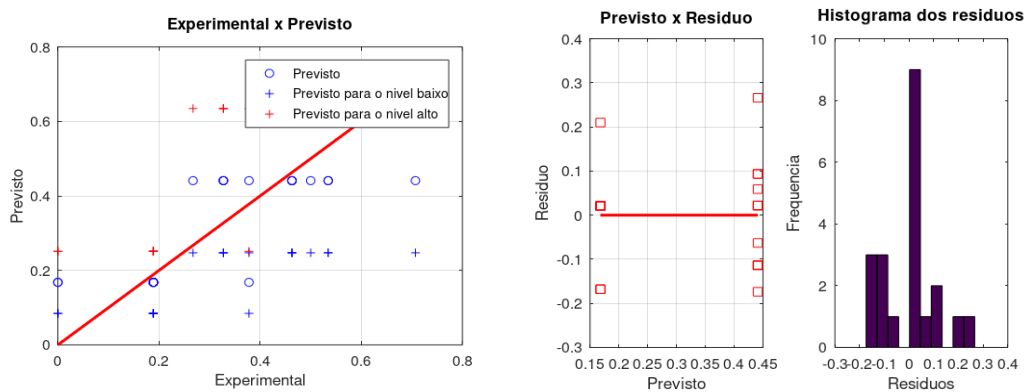


Figura 23: Gráficos dos valores experimentais *versus* previstos e resíduos do novo modelo para desejabilidade global

Tabela 10: Valores dos coeficientes do novo modelo para desejabilidade global

	<i>Média</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>IC</i>
b0	0,17	0,08	0,25	0,08
b11	0,27	0,16	0,38	0,11

Observamos na Tabela 10 que os coeficientes b0 e b11 se mantiveram significativos após o cálculo do modelo. Podemos visualizar graficamente na Figura 24.



Figura 24: Gráfico dos coeficientes de regressão do novo modelo para a desejabilidade global

5.4. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após definição dos coeficientes do modelo, foi possível preparar gráficos de superfície e de contorno no Excel (Figura 25 e Figura 26). Por meio dos gráficos é possível visualizar os valores das variáveis e determinar a melhor condição cromatográfica para o método analítico.

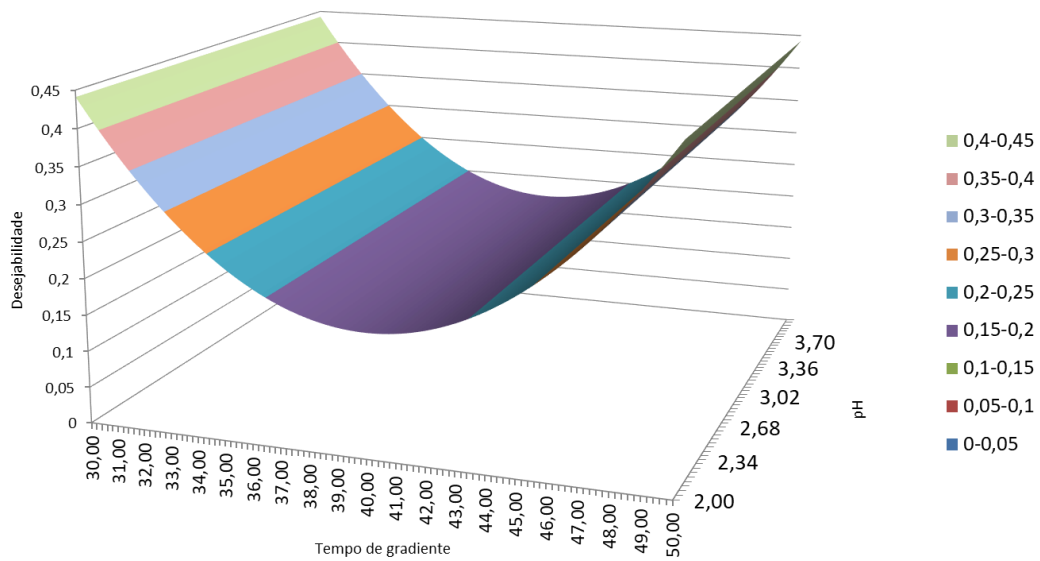


Figura 25: Gráfico de superfície de resposta da desejabilidade em função do pH e do tempo de gradiente

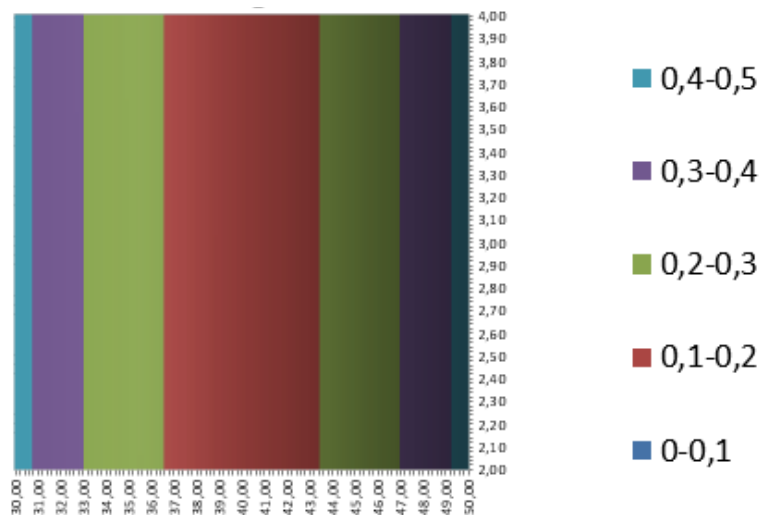


Figura 26: Gráfico de contorno da desejabilidade em função do pH e do tempo de gradiente

Analisando os gráficos das Figuras 26 e 27 observamos que a região de melhor resposta (desejabilidade) está em qualquer valor de pH testado(2 a 4). No caso do tempo de gradiente, os valores de desejabilidade são altos nos extremos (30 ou 50 minutos).

5.5. RESULTADOS DO PROGRAMA FUSION

Os dados também foram tratados utilizando o programa Fusion com o objetivo de comparar os resultados. A condição ideal proposta com o tratamento dos dados no Fusion está representada na Figura 27. O relatório completo do Fusion está no Apêndice deste documento.

Answer #1

Variable Settings

Variable	Level Setting
Gradient Time	50.0
pH	2.27

Predicted Results

Response	Goal	Predicted Result	Desirability	-2 Sigma Conf. Limit	+2 Sigma Conf. Limit
No. of Peaks	Maximize	12.0	1.0000	10.0	16.2
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution	Maximize	8.6	0.4297	6.7	10.5

Cumulative Desirability Target = 1.0000
Cumulative Desirability Result = 0.6556

Answer #2

Variable Settings

Variable	Level Setting
Gradient Time	30.0
pH	2.27

Predicted Results

Response	Goal	Predicted Result	Desirability	-2 Sigma Conf. Limit	+2 Sigma Conf. Limit
No. of Peaks	Maximize	12.0	1.0000	10.0	16.2
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution	Maximize	8.6	0.4297	6.7	10.5

Cumulative Desirability Target = 1.0000
Cumulative Desirability Result = 0.6556

Figura 27: Condição ideal calculada usando o programa Fusion

Conforme observamos na Figura 27 a condição ideal calculada pelo Fusion indica um pH de 2,27 e um tempo de gradiente de 50 minutos (Proposta de resultado 1 do software) ou 30 minutos (Proposta de resultado 2 do software). Com isso concluímos que os dados tratados pelos dois diferentes programas nos indicam a mesma condição.

5.6. DEFINIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO E VALIDAÇÃO DO MODELO

Depois de analisar todos os dados anteriormente descritos, foi possível determinar e propor um método analítico para a determinação dos três ativos do medicamento e suas impurezas.

O pH selecionado foi de 2,0, devido a facilidade de preparo e o tempo de gradiente de 30 minutos, buscando uma maior frequência analítica. O método analítico foi estabelecido conforme Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Condições cromatográficas do método

Coluna	=	Zorbax SB C18, 150 x 4,6 mm 5 µm PN 883975-902
Temperatura da coluna	=	40°C;
Detector	=	UV-Visível 237 nm / Band width 4,0 / Reference OFF;
Célula de fluxo	=	10mm
Fase móvel	=	Gradiente (conforme Tabela 12)
Temperatura do amostrador	=	25°C
Fluxo	=	1,0 mL/min;
Solução de lavagem da agulha	=	Diluyente
Volume de injeção	=	25 µL;
Tempo de análise	=	60 minutos
Fase Móvel A	=	Ácido Trifluoroacético 0,1% em água (pH = 2,0)
Fase Móvel B	=	Acetonitrila grau HPLC

Tabela 12: Condições do gradiente do método

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	80	20
2	80	20
32	20	80
45	20	80
45	10	90
50	10	90
51	80	20
60	80	20

Tendo sido definidos os parâmetros analíticos, foi realizada uma análise nas condições propostas com uma amostra construída com os três ativos e oito impurezas dos mesmos. Tais impurezas possuem maior potencial de serem formadas ao longo da vida útil do produto. Como resultado obteve-se o cromatograma representado na Figura 28.

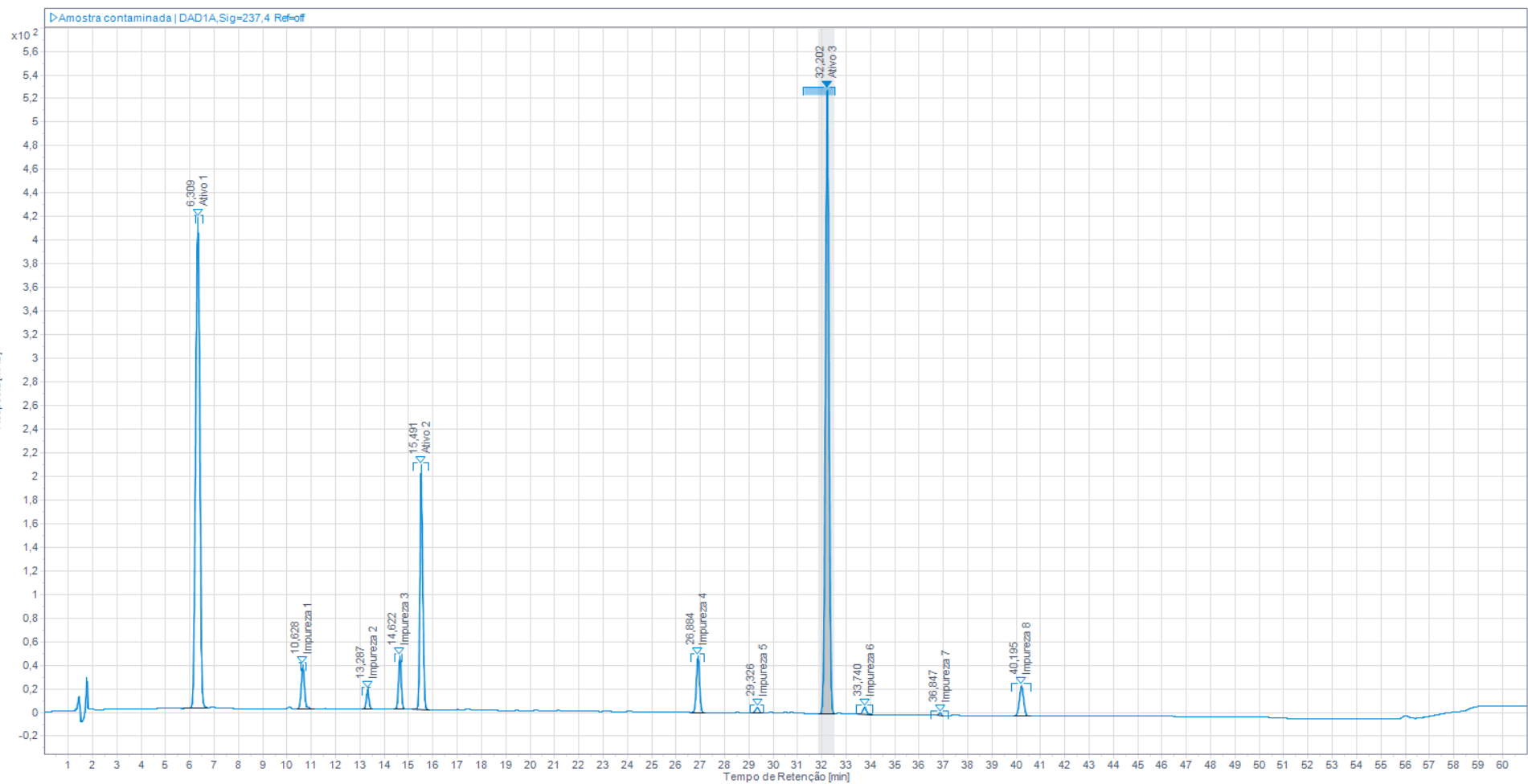


Figura 28: Cromatograma obtido com o método proposto com amostra construída

Podemos observar na Figura 28 que o método se mostrou eficaz na separação dos picos com ótima resolução cromatográfica. Com isso conseguiu-se validar o modelo proposto e apresentar um método cromatográfico para identificação e quantificação dos três ativos do produto e suas respectivas impurezas.

5.7. MODELO UTILIZANDO COMO RESPOSTA A RESOLUÇÃO DOS PICOS MAIS PRÓXIMOS (PAR CRÍTICO)

Após avaliação do cromatograma apresentado na figura 28, foi observado que os picos da Impureza 3 (tempo de retenção de 14,62 minutos) e Ativo 2 (tempo de retenção de 15,49 minutos) apresentam a menor resolução (Figura 29), sendo, portanto, os picos com maior probabilidade de interferência do método analítico (par crítico).

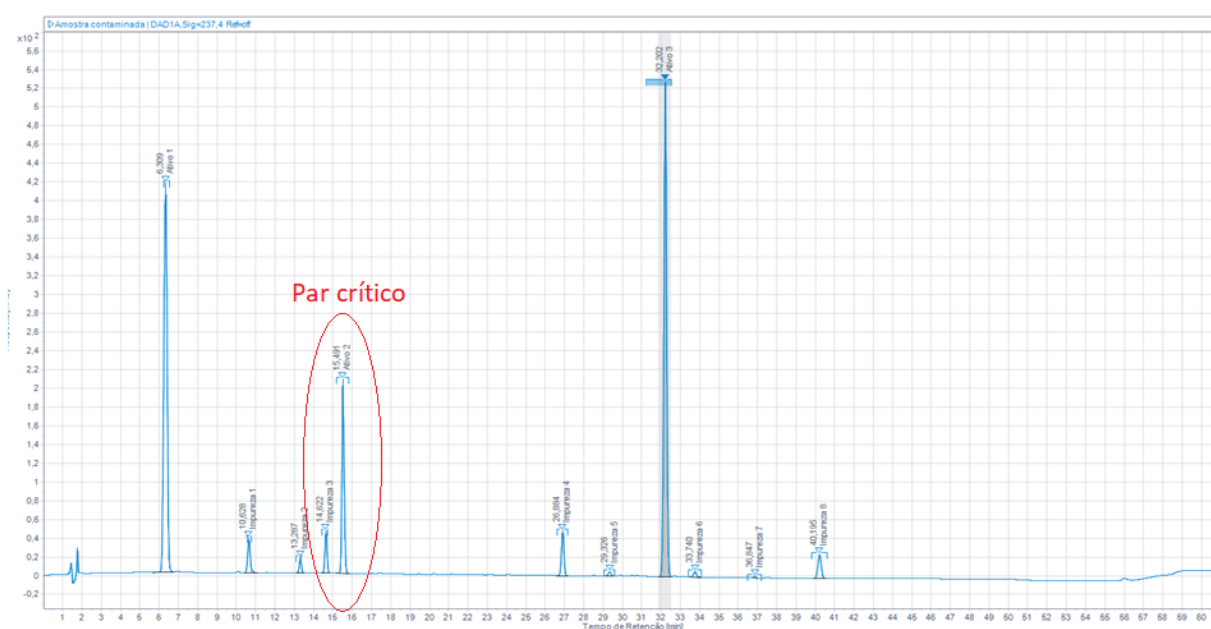


Figura 29: Cromatograma com identificação dos picos com menor resolução cromatográfica (par crítico)

Com o objetivo de garantir estar trabalhando na melhor condição de cada variável do método, foi construído um modelo no Octave usando como resposta a resolução entre estes dois picos (Impureza 3 e Ativo 2).

Na Tabela 13 está representada a matriz do planejamento fatorial completo face centrada com ponto central.

Tabela 13: Planejamento fatorial completo (face centrada) com ponto central (n=21)

Experimentos	Coeficiente linear	V1	V2	Coeficientes quadráticos		Coeficiente de interação	Resposta monitorada
		TEMPO	pH	b11	b22		
	b0	b1	b2	b11	b22	b12	y
1	1	-1	-1	1	1	1	3,1
2	1	-1	-1	1	1	1	3,1
3	1	1	-1	1	1	-1	3,0
4	1	1	-1	1	1	-1	3,0
5	1	-1	1	1	1	-1	2,8
6	1	-1	1	1	1	-1	2,8
7	1	1	1	1	1	1	2,5
8	1	1	1	1	1	1	2,5
9	1	-1	0	1	0	0	2,9
10	1	-1	0	1	0	0	2,9
11	1	1	0	1	0	0	2,7
12	1	1	0	1	0	0	2,7
13	1	0	1	0	1	0	2,5
14	1	0	1	0	1	0	2,5
15	1	0	-1	0	1	0	2,9
16	1	0	-1	0	1	0	2,9
17	1	0	0	0	0	0	2,8
18	1	0	0	0	0	0	2,8
19	1	0	0	0	0	0	2,8
20	1	0	0	0	0	0	2,8
21	1	0	0	0	0	0	2,8

Após o cálculo na rotina de regressão obteve-se um modelo com os coeficientes significativos apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores dos coeficientes do modelo para a resolução do par crítico

	<i>Média</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>IC</i>
b0	2,76	2,73	2,79	0,03
b1	-0,10	-0,13	-0,07	0,03
b2	-0,20	-0,23	-0,17	0,03
b11	0,08	0,04	0,12	0,04
b12	-0,05	-0,08	-0,02	0,03

O modelo calculado não apresentou falta de ajuste e obteve um R^2 satisfatório com valor acima de 0,9. Os resíduos ficaram distribuídos aleatoriamente em torno do zero e com o histograma de uma distribuição normal.

Plotando os dados em um gráfico de superfície foi possível observar a melhor condição para a resolução entre os picos avaliados (Figura 30).

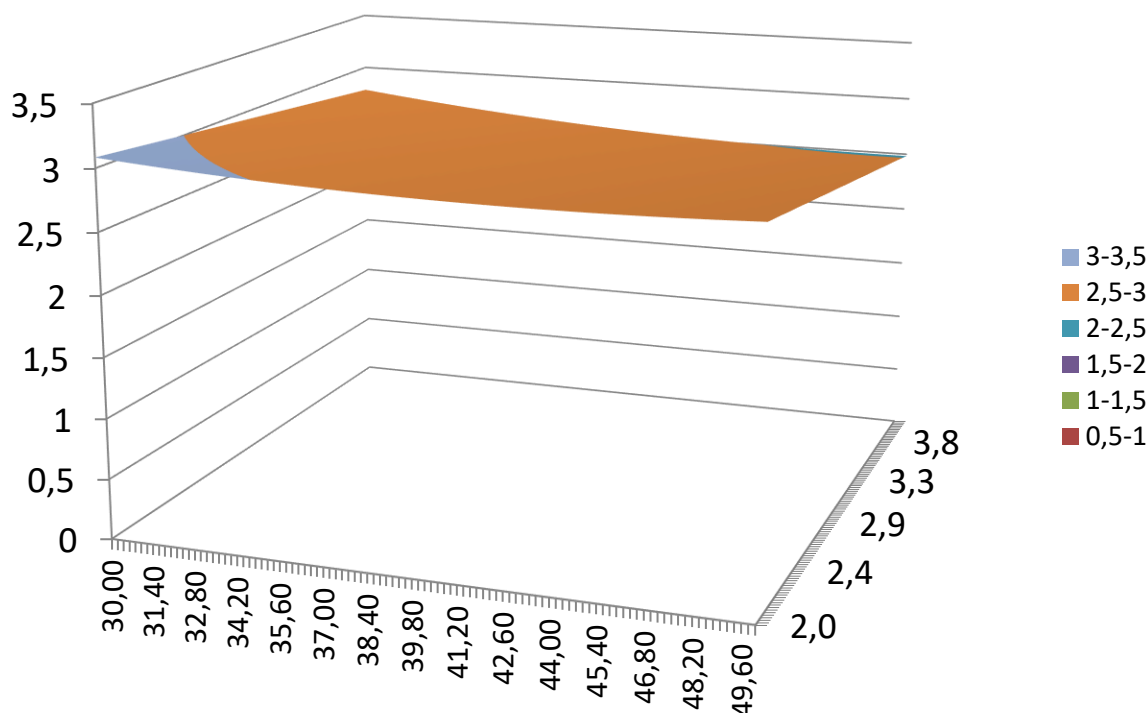


Figura 30: Gráfico de superfície de resposta da resolução dos picos do par crítico em função do pH e do tempo de gradiente

Analisando os dados do gráfico da Figura 30, observamos que a melhor condição para a resolução entre os picos do par crítico do método é a mesma condição calculada pelo modelo da deseabilidade global, ou seja, pH mais baixo (2,0) e tempo de gradiente menor (30 minutos).

5.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

De acordo com o capítulo II da RDC 166 da Anvisa (RDC 166, 2017) o objetivo da validação analítica é demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

Com este propósito foi realizada uma validação do método desenvolvido para garantir sua eficácia. Nesta etapa foram realizados os testes de Especificidade/Seletividade, Linearidade, Exatidão e Precisão para os três ativos do produto a ser analisado.

Segundo a AOAC International Official Methods of Analysis – Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F (AOAC - Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F, 2016) o critério de aceitação para esta validação, levando em consideração a concentração de trabalho do analito, é de 90 % a 107 % para recuperação e de até 5,3 % de desvio padrão relativo(DPR).

A Exatidão e Linearidade foram calculadas utilizando a faixa de 80% a 120% da concentração de trabalho dos ativos, ou seja, 0,20 a 0,30 mg/mL para o Ativo 1, 0,08 a 0,12 mg/mL para o ativo 2 e 0,256 a 0,384 mg/mL para o Ativo 3.

5.8.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (RDC 166, 2017). A Tabela 13 apresenta o resumo dos resultados da seletividade do método.

Tabela 15: Resumo dos resultados de seletividade do método

Teste	Resultados
Similaridade	Os picos dos ativos 1, 2 e 3 na solução amostra apresentaram o mesmo tempo de retenção dos picos da solução padrão.
Interferência	Nenhum pico dos interferentes apresentou o mesmo tempo de retenção dos ativos
Pureza cromatográfica das soluções que contenham o analito	Os picos dos ativos apresentaram espectro DAD com pureza cromatografica ≥ 990 . (99,0 % de similaridade espectral)

A Pureza cromatográfica foi calculada pelo programa Open Lab CDS (Agilent®) através da comparação das varreduras espectrais de vários pontos do pico cromatográfico com a varredura do centro do pico. Um resultado acima de 990 (que

representa 99,0% de similaridade) é considerado satisfatório devido a sensibilidade da técnica.

Como base nos resultados apresentados verificamos que o método apresenta seletividade.

5.8.2. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais a concentração de um analito em uma amostra (RDC 166, 2017).

O teste de linearidade foi realizado para os três ativos e obtiveram-se os resultados apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 16: Resultados da Linearidade do Ativo 1

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0,9998$ que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos

Tabela 17: Resultados da Linearidade do Ativo 2

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9998 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Detectamos 0 pontos extremos em relação ao resíduo padronizado.

Tabela 18: Resultados da linearidade do Ativo 3

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9999 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não detectamos pontos extremos

Ao avaliarmos os resultados apresentados, concluímos que o método apresenta linearidade satisfatória na faixa de trabalho proposta para os três ativos.

5.8.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (RDC 166, 2017).

A exatidão foi verificada a partir de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível conforme determina a legislação (RDC 166, 2017).

Os resultados para os três ativos são apresentados nas tabelas 17, 18 e 19.

Tabela 19: Resultados da exatidão do Ativo 1

Nível	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)	Média das Recuperações (%)	DPR (%)
80%	0,20016	100,9	101,2	0,2
	0,20016	101,2		
	0,20012	101,2		
100%	0,24996	100,8	100,6	0,2
	0,24976	100,4		
	0,24992	100,6		
120%	0,30004	100,0	99,9	0,1
	0,30076	99,9		
	0,30044	99,8		
Média (%)			100,6	
Desvio Padrão			0,6	
Desvio Padrão Relativo (%)			0,6	
Intervalo de confiança 95%		Faixa -	99,9	
		Faixa +	101,2	

Tabela 20: Resultados da exatidão do Ativo 2

Nível	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)	Média das Recuperações (%)	DPR (%)
80%	0,079829	98,2	98,2	0,2
	0,080175	98,6		
	0,080059	98,2		
100%	0,099786	98,9	98,9	0,0
	0,099844	98,9		
	0,099902	98,9		
120%	0,120003	98,8	98,6	0,1
	0,120407	98,6		
	0,120003	98,5		
Média (%)			98,6	
Desvio Padrão			0,3	
Desvio Padrão Relativo (%)			0,3	
Intervalo de confiança 95%		Faixa -	98,2	
		Faixa +	98,9	

Tabela 21: Resultados da exatidão do Ativo 3

Nível	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)	Média das Recuperações (%)	DPR (%)
80%	0,25628	100,2	100,0	0,1
	0,25656	100,0		
	0,25596	100,0		
100%	0,32004	99,8	99,7	0,2
	0,31992	99,5		
	0,32040	99,7		
120%	0,38412	99,4	99,2	0,2
	0,38444	99,2		
	0,38448	99,0		
Média (%)			99,6	
Desvio Padrão			0,4	
Desvio Padrão Relativo (%)			0,4	
Intervalo de confiança 95%		Faixa -	99,2	
		Faixa +	100,0	

De acordo com os resultados apresentados concluímos que o método é exato para os três ativos, pois todos os resultados estão de acordo com os critérios da tabela da AOAC (AOAC - Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F, 2016).

5.8.4. Precisão

O objetivo da precisão é avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado (RDC 166, 2017). A precisão foi determinada por meio da determinação em 6 (seis) réplicas a 100% da concentração do teste preparadas individualmente.

Os resultados são demonstrados nas Tabelas 20, 21 e 22.

Tabela 22: Resultados da precisão para o ativo 1

Amostras	%
Amostra 1	99,8
Amostra 2	99,3
Amostra 3	100,1
Amostra 4	99,3
Amostra 5	100,5
Amostra 6	101,1
Média	99,9
Desvio Padrão	0,7
Desvio Padrão Relativo (DPR)	0,7

Tabela 23: Resultados da precisão para o Ativo 2

Amostras	%
Amostra 1	100,0
Amostra 2	99,6
Amostra 3	100,2
Amostra 4	100,2
Amostra 5	100,8
Amostra 6	101,0
Média	100,2
Desvio Padrão	0,5
Desvio Padrão Relativo (DPR)	0,5

Tabela 24: Resultados da precisão para o Ativo 3

Amostras	%
Amostra 1	101,4
Amostra 2	101,6
Amostra 3	101,2
Amostra 4	101,1
Amostra 5	101,2
Amostra 6	101,2
Média	101,2
Desvio Padrão	0,2
Desvio Padrão Relativo (DPR)	0,2

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que o método é preciso para a determinação dos três ativos.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A ferramenta quimiométrica DOE permitiu o desenvolvimento de um método linear, exato, seletivo e preciso em um período inferior ao método de variação de cada variável por vez.

O projeto proporcionou para um desenvolvimento robusto para o método analítico e ganho de tempo e economia de reagentes e padrões durante a etapa de desenvolvimento. Como os três ativos e suas impurezas serão analisados em uma única análise cromatográfica, haverá economia de tempo e recursos na liberação lote a lote do produto no controle de qualidade.

Um método analítico otimizado permitirá a redução do retrabalho, aumentando a velocidade de liberação dos medicamentos no controle de qualidade, reduzindo custos e aumentando o rendimento esperado das vendas do medicamento.

Somente na fase de desenvolvimento foi possível estimar a economia de cerca de 80000,00 mil reais, sendo 40000,00 reais em mão de obra (hora/homem), 20000,00 reais em colunas cromatográficas, 20000,00 reais em matérias analíticas (padrões, reagentes, etc.). Ainda existem outras economias como tempo de equipamentos, agilidade na liberação de resultados entre outros que não foram contabilizados.

O uso do planejamento fatorial no desenvolvimento do método forneceu evidências científicas da escolha dos parâmetros cromatográficos do método analítico, aumentando a robustez da documentação da empresa a ser apresentada ao órgão regulador, reforçando assim a confiabilidade da documentação e reduzindo o risco de recebimento de exigências regulatórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-GONZALEZ, M. et al. Optimization of the HS-SPME technique by using response surface methodology for evaluating chlorine disinfection by-products by GC in drinking water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 12, p. 2330-2336, 2011.

AMORIM, A. F. V. D. **Métodos Cromatográficos**. 1^a. ed. Fortaleza: EdUECE, 2019.

ANVISA - Institucional. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/institucional>>. Acesso em: 03 fevereiro 2022.

ANVISA , 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

AOAC - Guidelines for Standard Method Performance Requirements – Appendix F, 2016. Disponível em: <http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf>. Acesso em: 07 fevereiro 2022.

BANDEIRA, C. M.; FERREIRA, J. M. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1422-1426, 2008.

BRYNN, H. D. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 910, p. 2-13, 2012.

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014.

GUIA 04, 2015. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-rdc-53-2015-e-guia-04-2015.pdf/view>>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

GUIA Interfarma, 2020. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/app/uploads/2020/12/2020_VD_JAN.pdf>. Acesso em: 02 fevereiro 2021.

ICH , 2022. Disponível em: <<https://www.ich.org/page/history>>. Acesso em: 03 fevereiro 2022.

ICH Q14, 2018. Disponível em: <<https://www.ich.org/page/quality-guidelines>>. Acesso em: 04 fevereiro 2022.

ICH Q1A, 2003. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1a-r2-stability-testing-new-drug-substances-drug-products>>. Acesso em: 03 fevereiro 2022.

KIM, J. H.; SCIALLI, A. R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 1-6, 2011.

KUMAR, L. et al. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 5, p. 549-555, 2015.

LIBBS , 2022. Disponível em: <<https://www.libbs.com.br/sobre-nos/quem-somos/>>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

MURRAY, P. M. et al. A aplicação da otimização de reação de design de experimentos (DoE) e seleção de solvente no desenvolvimento de nova química sintética. **Org. Biomol. Química**, v. 14, n. 8, p. 2373-2384, 2016.

PEREIRA-FILHO, E. R. Canal Youtube Edenir Rodrigues Pereira Filho. **Youtube**, 2012. Disponível em: <<https://www.youtube.com/c/EdenirPereiraFilho/playlists>>. Acesso em: 20 Fevereiro 2022.

PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento Fatorial em Química - Maximizando a obtenção dos resultados**. 1ª. ed. São Carlos: EdUFSCar, v. I, 2018.

RAKIC, T. et al. Comparação de Projeto Fatorial Completo, Projeto Composto Central e Projeto Box-Behnken no Desenvolvimento de Método Cromatográfico para a Determinação de Fluconazol e suas Impurezas. **Analítico Cartas**, v. 47, n. 8, p. 1334-1347, 2014.

RDC 166, 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 04 fevereiro 2022.

RDC 200, 2017. Disponível em:
<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3836387/%283%29RDC_200_2017_COM.PDF/6316bee6-095d-426b-9398-6b1f659078b5>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

RDC 318, 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

RDC 53, 2015. Disponível em:
<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COM.PDF/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892>. Acesso em: 02 fevereiro 2022.

ROUSSEAC, F.; ROUSSEAC, A. Chemical Analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques. **University of Le Mans**, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.

TOME, T. et al. Desenvolvimento e Otimização de Métodos Analíticos de Cromatografia Líquida Usando Princípios AQbD: Visão Geral e Avanços Recentes. **Pesquisa e Desenvolvimento de Processo Orgânico**, v. 23, n. 9, p. 1784-1802, 2019.

APÊNDICE

APÊNDICE

Name:
Administrator
Company: Libbs
Project:
Tripla_final
Date: February 4, 2021 10:21:52 AM GMT-03:00 [GMT-03:00]



Instrument Report

Instrument Data

System

Waters Empower

Instrument Name

Fusion Demo UPLC - H-Class

Instrument Definition

Waters ACQUITY H-Class Quaternary Pump
Waters ACQUITY H-Class Sample Manager -
FTN Waters ACQUITY H-Class Column
Manager Waters ACQUITY PDA Detector

Pump: Waters ACQUITY H-Class Quaternary Pump

Flow

Line: A

Flow

Line: B

Flow

Line: C

Accessory Solvent Switching Valve: D

Reservoir: D

Autosampler: Waters ACQUITY H-Class Sample Manager - FTN

Tray: Two Trays of 48 2-mL vials

First Vial: 1:A,1

Last Vial: 2:F,8

Oven: Waters ACQUITY H-Class Column Manager

Column Switching Valve: 6 Position Column Switching Valve

Detector: Waters ACQUITY PDA Detector

Channel: Channel 1

Name:
Administrator
Company: Libbs
Project:
Tripla_final
Date: February 4, 2021 10:21:52 AM GMT-03:00 [GMT-03:00]



Experiment Design - Experiment 1

Reservoir Assignments

Reservoir B	Level
Acetonitrile	---
Reservoir D-1	Level
Weak Solvent 1	---
pH	2.00
Reservoir D-2	Level
Weak Solvent 1	---
pH	3.00
Reservoir D-3	Level
Weak Solvent 1	---
pH	4.00

Column Assignments

Column Valve Position	Column Level	Pump Flow Rate	Condition Column Time	pH Upper Bound
Valve Position 3	Zorbax SB C18	1.00	2.0	14.00

Experiment Constants

Constant Name	Constant Value	Units
Column Type	Zorbax SB C18	*
Gradient Curve	6	
Equilibration Time	2.0	min
Initial Hold Time	2.0	min
Initial Hold % Organic	20.0	%
Final Hold Time	10.0	min
Final Hold % Organic	80.0	%
Ramp Up to Wash Time	0.5	min
Column Wash Time	5.0	min
Column Wash % Organic	90.0	%
Ramp Down from Wash Time	2.0	min
Re-equilibration Time	10.0	min
Re-equilibration % Organic	20.0	%

Experiment Design Matrix

Run No.	Gradient Time (min)	pH (*)
Condition Column - 1	2.0	2.00

1	30.0	2.00
2	50.0	2.00
3	40.0	2.00
Condition Column - 2	2.0	3.00
4	30.0	3.00
5	50.0	3.00
6	40.0	3.00
7	40.0	3.00
8	40.0	3.00
Condition Column - 3	2.0	4.00
9	30.0	4.00
10	50.0	4.00
11	40.0	4.00
Condition Column - 4	2.0	2.00
12	30.0	2.00
13	50.0	2.00
14	40.0	2.00
Condition Column - 5	2.0	3.00
15	30.0	3.00
16	50.0	3.00
17	40.0	3.00
18	40.0	3.00
Condition Column - 6	2.0	4.00
19	30.0	4.00
20	50.0	4.00
21	40.0	4.00
Condition Column - 7	2.0	4.00

Name:
Administrator
Company: Libbs
Project:
Tripla_final
Date: February 4, 2021 10:21:52 AM GMT-03:00 [GMT-03:00]



Experiment Setup - Experiment 1

Experiment Phase: Method Development
Experiment Type: General Optimization

Global Sample Settings

No. of Preparation Replicates per Sample: 1
No. of Injections per Preparation Replicate: 1
Obtain all injection repeats from the same vial: Checked
Sample Preparation Mode: Online Mixing
Method Type: Gradient
No. of Gradient Mobile Phases: 2

Study Variable Settings

Name	Units	Type	Range/Level(s)
Gradient Time	(min)	P N	30.0 <= Gradient Time <= 50.0
pH	(*)	P D	2.00, 3.00, 4.00

Design Wizard Settings

Design Type: User-
customized
Design Model:
Quadratic
Number of
Design Runs: 21

Replicate Group	Run No.
1	1
	12
2	2
	13
3	3
	14
4	4
	15
5	5
	16
6	6
	7
	8
	17
	18
7	9

	19
8	10 20
9	11 21

Design Statistics - Experiment 1

Default Model Form: Quadratic

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

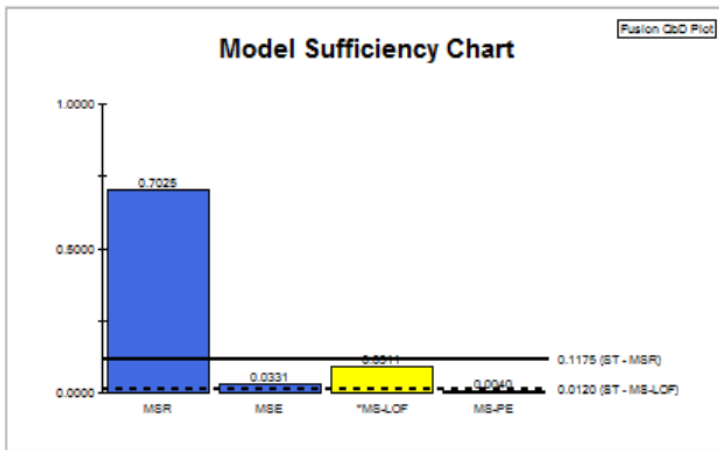
Included Model Term Statistics

Included Term	VIF	Aliased Terms
A	1.00	
B	1.00	
(A) ²	1.05	
(B) ²	1.05	
A*B	1.00	

Scaled Prediction Variance Statistics

Run No.	Scaled Variance of Predicted Response	
1	8.35	Largest Value
2	8.35	
3	5.41	
4	5.41	
5	5.41	
6	3.18	Smallest Value
7	3.18	
8	3.18	
9	8.35	
10	8.35	
11	5.41	
12	8.35	
13	8.35	
14	5.41	
15	5.41	
16	5.41	
17	3.18	
18	3.18	
19	8.35	
20	8.35	
21	5.41	

Analysis Summary Report: No. of Peaks



* - The model LOF is statistically significant (P-value < 0.0500)

Regression Statistic	Computed Value	Scaled Value
R Square	0.7025	
Adj. R Square	0.6695	
Model Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.0014	
Untransformed Model Error (+/- 1 Std. Dev.)	1.1422	
Expt. Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.0005	
Untransformed Expt. Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.2887	
MSR	0.0000	0.7025
MSE	0.0000	0.0331
MSR/MSE F-ratio	21.2562	
MSR Significance Threshold	0.0000	0.1175
*MS-LOF	0.0000	0.0911
MS-PE	0.0000	0.0040
MS-LOF/MS-PE F-ratio	22.6826	
MS-LOF Significance Threshold	0.0000	0.0120

MSR Significance Threshold:

Scaled Value is the 0.0500 probability value for statistical significance. MSR is statistically significant when \geq this value.

Modeling Goal: MSR value \geq Significance Threshold.

MS-LOF Significance Threshold:

Scaled Value is the 0.0500 probability level for statistical significance. MS-LOF is statistically significant when \geq this value. Modeling Goal: MS-LOF value \leq Significance Threshold.

Experimental Error Analysis: No. of Peaks

Overall Error Statistics

Error Statistic	Computed Value	Transformed Value
Error%	1.70	4.02
Error Variance	0.083	2.5E-07
Expt. Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.289	0.001
95% Confidence Limits (+/-)	0.629	0.001

Replicate Group Error Statistics

Group Run No.	Observed Value	Transformed Value	Group Std. Dev.	P-Value	
				F-Ratio	P-Value
1	11.0	0.008	0.000	<0.0001	1.0000
12	11.0	0.008			
2	10.0	0.010	0.000	<0.0001	1.0000
13	10.0	0.010			
3	11.0	0.008	0.001	11.0000	0.0069
14	10.0	0.010			
4	15.0	0.004	0.000	<0.0001	1.0000
15	15.0	0.004			
5	16.0	0.004	0.000	<0.0001	1.0000
16	16.0	0.004			
6	10.0	0.010	0.000	<0.0001	1.0000
7	10.0	0.010			
8	10.0	0.010			
17	10.0	0.010			
18	10.0	0.010			
9	10.0	0.010	0.001	11.0000	0.0069
19	11.0	0.008			
10	11.0	0.008	0.000	<0.0001	1.0000
20	11.0	0.008			
11	9.0	0.012	0.000	<0.0001	1.0000
21	9.0	0.012			

Regression Analysis: No. of Peaks

Transformed General Regression Statistics

Regression Statistic	Computed Value
R Square	0.7025
Adj. R Square	0.6695
Standard Error (+/-)	0.001
Observations	21

Regression ANOVA Statistics

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Regression	0.0001	2	0.0000	21.2562	<0.0001
Residual	<0.0001	18	<0.0001		
Lack-of-Fit	0.0000	6	0.0000	22.6826	<0.0001
Pure Error	0.0000	12	0.0000		
Total	0.0001	20			

PRESS = 0.0001

Coded Variable Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Stepwise Regression Summary Statistics

Dropped Model Term	F-Ratio	Resulting Adj. R Square	Resulting Standard Error (+/-)	Resulting p
---	---	(original) 0.6595	(original) 0.001	(original) 6
A	0.0170	0.6804	0.001	5
B	0.9185	0.6819	0.001	4
A*B	1.7051	0.6695	0.001	3

F to Remove = 4

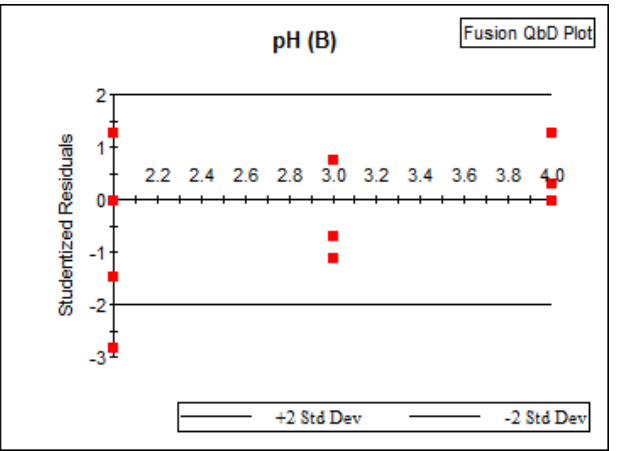
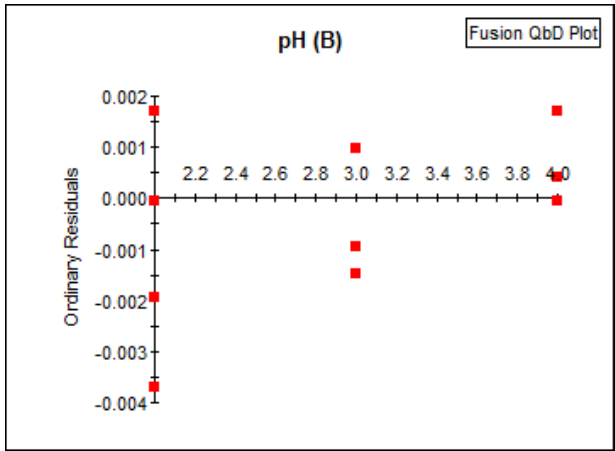
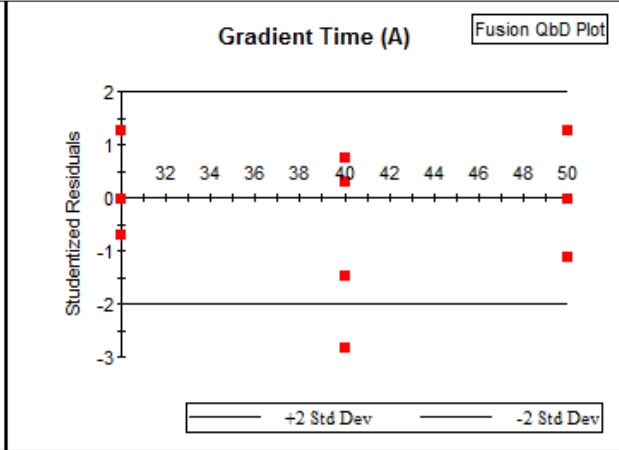
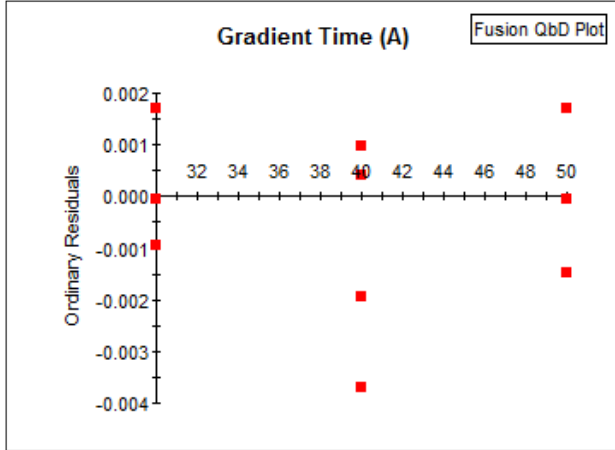
Residuals Data: No. of Peaks

Residuals Table

Run No.	Current Transformed Data Model Statistics								Back-transformed	
	Transformed Observed	Transformed Predicted	Ordinary Residuals	Studentized Residuals	R-student Residuals	Leverage	Cook's Distance	PRESS Residuals	Observed	Predicted
1	0.008	0.008	-4.5E-05	-0.0328	-0.0319	0.1061	0.0000	0.0000	11.000	10.970
2	0.010	0.008	1.7E-03	1.2445	1.2651	0.1061	0.0613	0.0019	10.000	10.970
3	0.008	0.012	-3.7E-03	* -2.8233	-3.6758	0.1742	0.5607	-0.0045	11.000	9.147
4	0.004	0.005	-9.4E-04	-0.7224	-0.7124	0.1742	0.0367	-0.0011	15.000	13.624
5	0.004	0.005	-1.5E-03	-1.1345	-1.1442	0.1742	0.0905	-0.0018	16.000	13.624
6	0.010	0.009	9.7E-04	0.7327	0.7229	0.1515	0.0320	0.0011	10.000	10.523
7	0.010	0.009	9.7E-04	0.7327	0.7229	0.1515	0.0320	0.0011	10.000	10.523
8	0.010	0.009	9.7E-04	0.7327	0.7229	0.1515	0.0320	0.0011	10.000	10.523
9	0.010	0.008	1.7E-03	1.2445	1.2651	0.1061	0.0613	0.0019	10.000	10.970
10	0.008	0.008	-4.5E-05	-0.0328	-0.0319	0.1061	0.0000	0.0000	11.000	10.970
11	0.012	0.012	3.9E-04	0.3019	0.2942	0.1742	0.0064	0.0005	9.000	9.147
12	0.008	0.008	-4.5E-05	-0.0328	-0.0319	0.1061	0.0000	0.0000	11.000	10.970
13	0.010	0.008	1.7E-03	1.2445	1.2651	0.1061	0.0613	0.0019	10.000	10.970
14	0.010	0.012	-2.0E-03	-1.4943	-1.5516	0.1742	0.1571	-0.0024	10.000	9.147
15	0.004	0.005	-9.4E-04	-0.7224	-0.7124	0.1742	0.0367	-0.0011	15.000	13.624
16	0.004	0.005	-1.5E-03	-1.1345	-1.1442	0.1742	0.0905	-0.0018	16.000	13.624
17	0.010	0.009	9.7E-04	0.7327	0.7229	0.1515	0.0320	0.0011	10.000	10.523
18	0.010	0.009	9.7E-04	0.7327	0.7229	0.1515	0.0320	0.0011	10.000	10.523
19	0.008	0.008	-4.5E-05	-0.0328	-0.0319	0.1061	0.0000	0.0000	11.000	10.970
20	0.008	0.008	-4.5E-05	-0.0328	-0.0319	0.1061	0.0000	0.0000	11.000	10.970
21	0.012	0.012	3.9E-04	0.3019	0.2942	0.1742	0.0064	0.0005	9.000	9.147

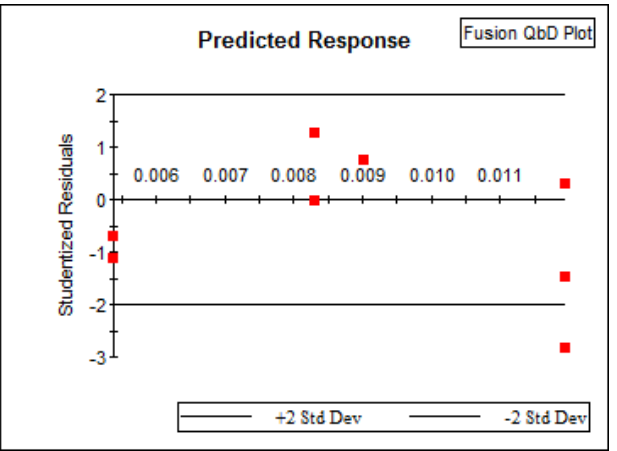
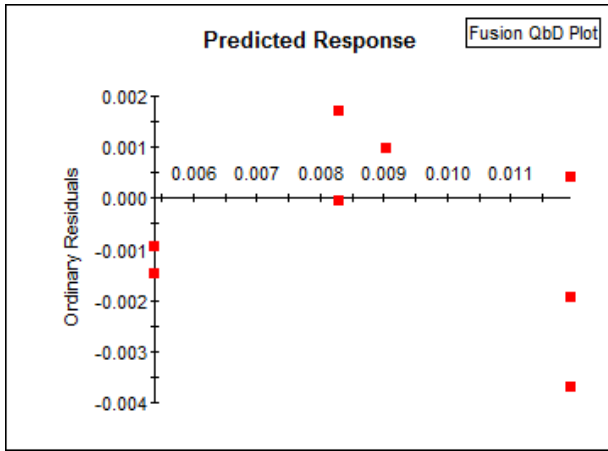
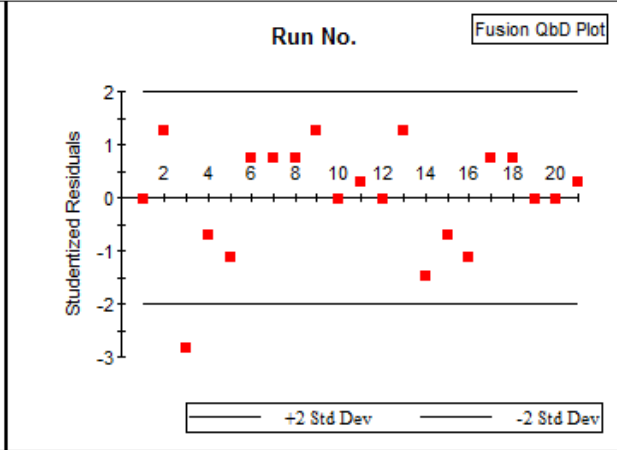
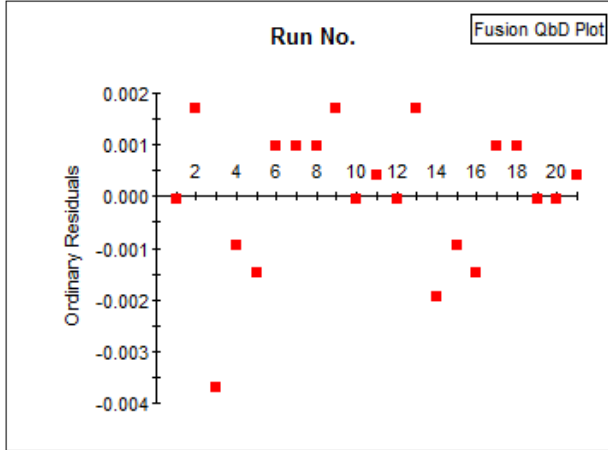
Ordinary Residuals Plots

Studentized Residuals Plots

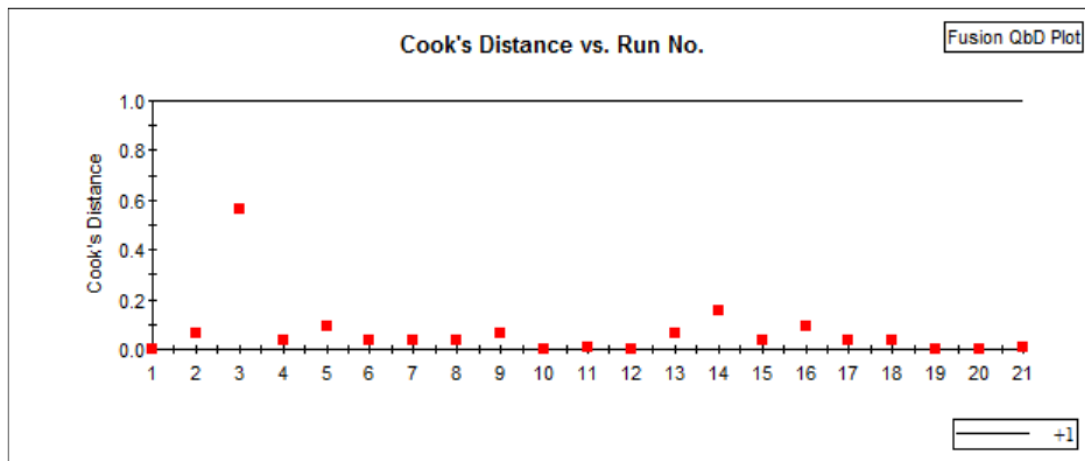
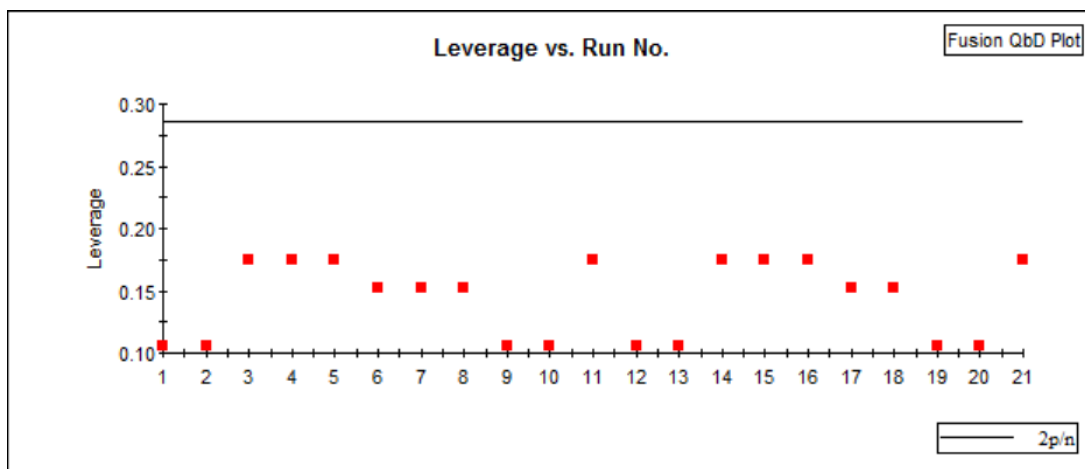
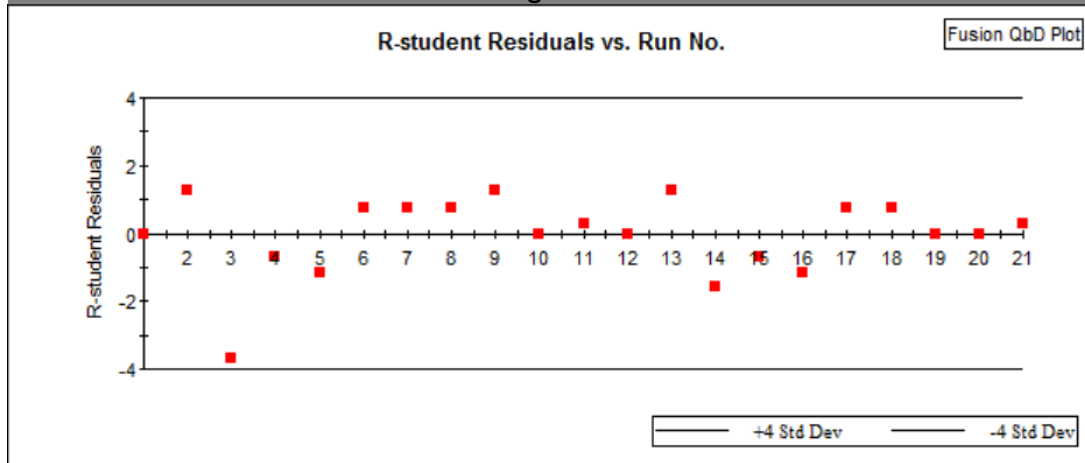


Ordinary Residuals Plots

Studentized Residuals Plots



Outlier / Leverage / Influence Plots

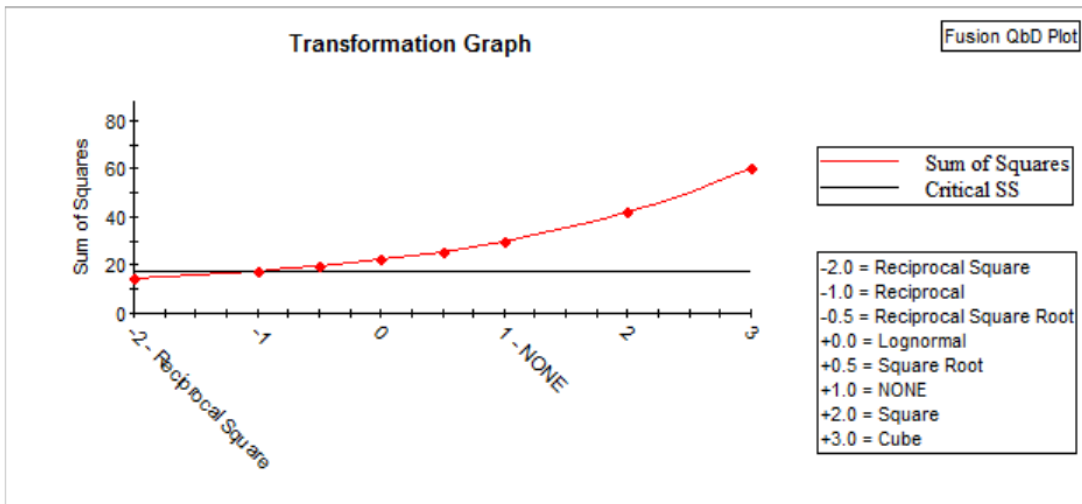


Transformation Analysis: No. of Peaks

Transformation Settings / Statistics

Response Measurement Limit Settings	
Absolute Upper Limit	NONE
Absolute Lower Limit	0.000

Data Transformations	Lambda	Sum of Squares
Equivalent		
Reciprocal Square	-2	14.5881
Reciprocal	-1	17.5353
Critical SS		17.5769
Not Recommended		
Reciprocal Square Root	-0.5000	19.6770
Natural Log	0	22.3824
Natural Log - LL	---	22.4686
Square Root	0.5000	25.7742
Linear - Inverse	---	29.8708
NONE	1	30.0114
Square	2	41.9067
Cube	3	60.5635
Recommended Transformation		Reciprocal Square
Selected Transformation		Reciprocal Square



Extra Sum of Squares Statistics: No. of Peaks

Sequential Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	Sequential F-Test F-Ratio	Sequential F-Test Prob. > F
Mean	0.002	1	0.002	---	---
Linear	0.000	2	0.000	0.1400	0.8730
Quadratic	0.000	3	0.000	14.2900	<0.0001
Residual	0.000	15	0.000		
Total	0.002	21			

Model Lack of Fit Statistics

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	Test F F-Ratio	Test F Prob. > F
Linear	0.000	6	0.000	79.7400	<0.0001
Quadratic	0.000	3	0.000	38.3800	<0.0001
Pure Error	0.000	12	0.000		

Model ANOVA Statistics

Model	Standard Error (+/-)	R Square	Adjusted R Square	Predicted R Square	PRESS
Linear	0.003	0.0150	-0.0945	-0.3081	0.0002
Quadratic	0.001	0.7446	0.6595	0.4953	0.0001

Coefficients Table and Models: No. of Peaks

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Model Coefficients Table

Coded Name	Coefficient Value	Coefficient Standard Error	Coefficient t Statistic	P-Value	F-Ratio	Lower 95% Conf. Limit	Upper 95% Conf. Limit
Constant	0.009	---	---	---	---	0.008	0.010
(A) ²	-0.004	0.001	-5.6041	<+/- 0.0001	31.4054	-0.005	-0.002
(B) ²	0.003	0.001	4.4947	0.0003	20.2027	0.002	0.004

F to Remove = 4.0

<u>Transformed Coded Variable Model</u>	<u>Transformed Natural Variable Model</u>
(No. of Peaks) ['] = + 0.009 - 0.004(A) ² + 0.003(B) ²	(No. of Peaks) ['] = - 0.022955 + 0.002914(Gradient Time) - 0.017528(pH) - 0.000036(Gradient Time) ² + 0.002921(pH) ²

Response Backtransformation Formula

No. of Peaks = (No. of Peaks)[']^{-1/2}

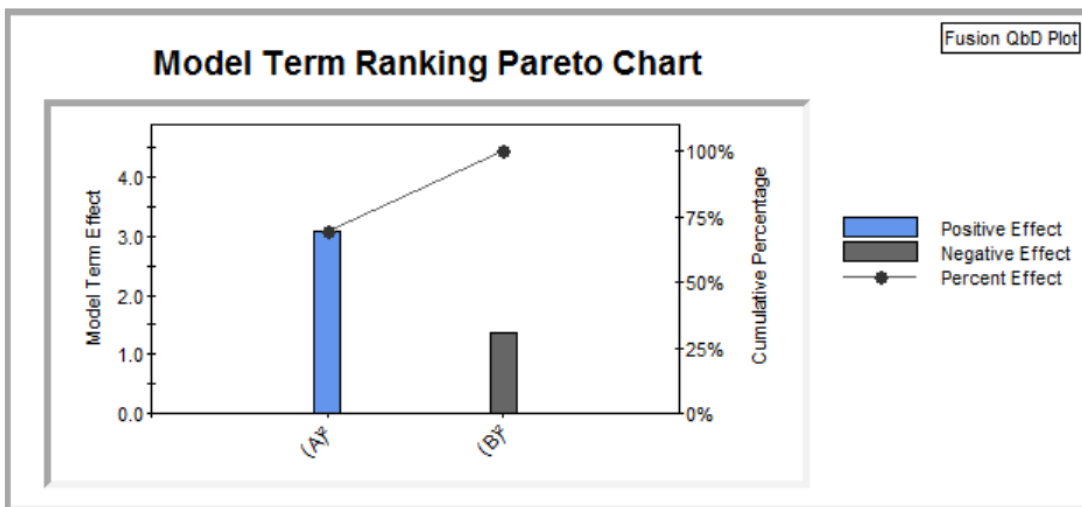
Model Term Pareto Ranking: No. of Peaks

Study Variable Code Name Key

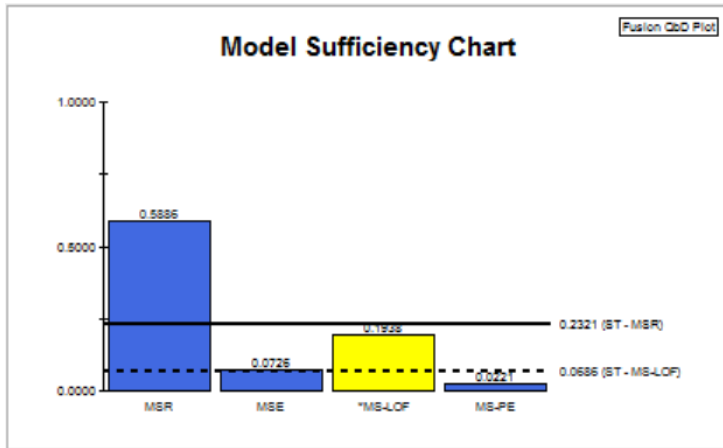
Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Mean Effects Ranking Table

Model Term	Model Term Range	Coefficient Value	Transformed Model Term Effect	Backtransformed Effect	Percent of Cumulative Effect
(A) ²	1.0000	-0.004	-0.004	3.100	69.26
(B) ²	1.0000	0.003	0.003	-1.376	30.74



Analysis Summary Report: No. of Peaks ≥ 1.50 - USPResolution



* - The model LOF is statistically significant (P-value < 0.0500)

Regression Statistic	Computed Value	Scaled Value
R Square	0.5886	
Adj. R Square	0.5160	
Model Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.8273	
Expt. Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.4564	
MSR	5.5498	0.5886
MSE	0.6845	0.0726
MSR/MSE F-ratio	8.1079	
MSR Significance Threshold	2.1882	0.2321
*MS-LOF	1.8273	0.1938
MS-PE	0.2083	0.0221
MS-LOF/MS-PE F-ratio	8.7709	
MS-LOF Significance Threshold	0.6471	0.0686

MSR Significance Threshold:

Scaled Value is the 0.0500 probability value for statistical significance. MSR is statistically significant when \geq this value.

Modeling Goal: MSR value \geq Significance Threshold.

MS-LOF Significance Threshold:

Scaled Value is the 0.0500 probability level for statistical significance. MS-LOF is statistically significant when \geq this value.

Modeling Goal: MS-LOF value \leq Significance Threshold.

Experimental Error Analysis: No. of Peaks ≥ 1.50 - USPResolution

Overall Error Statistics

Error Statistic	Computed Value
Error %	14.73
Error Variance	0.208
Expt. Error (+/- 1 Std. Dev.)	0.456
95% Confidence Limits (+/-)	0.994

Replicate Group Error Statistics

Group Run No.	Observed Value	Group Std. Dev.	F-Ratio	P-Value
1 12	10.0 9.0	0.707	2.7500	0.1255
2 13	9.0 9.0	0.000	0.0000	1.0000
3 14	8.0 7.0	0.707	2.7500	0.1255
4 15	7.0 7.0	0.000	0.0000	1.0000
5 16	7.0 8.0	0.707	2.7500	0.1255
6 7 8 17 18	7.0 7.0 7.0 7.0 7.0	0.000	0.0000	1.0000
9 19	9.0 10.0	0.707	2.7500	0.1255
10 20	8.0 7.0	0.707	2.7500	0.1255
11 21	6.0 6.0	0.000	0.0000	1.0000

Regression Analysis: No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution

General Regression Statistics

Regression Statistic	Computed Value
R Square	0.5886
Adj. R Square	0.5160
Standard Error (+/-)	0.827
Observations	21

Regression ANOVA Statistics

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Regression	16.6494	3	5.5498	8.1079	0.0014
Residual	11.6364	17	0.6845		
Lack-of-Fit	9.1364	5	1.8273	8.7709	0.0011
Pure Error	2.5000	12	0.2083		
Total	28.2857	20			

PRESS = 18.0558

Coded Variable Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Stepwise Regression Summary Statistics

Dropped Model Term	F-Ratio	Resulting Adj. R Square	Resulting Standard Error (+/-)	Resulting p
---	---	(original) 0.5674	(original) 0.782	(original) 6
A*B	1.8386	0.5447	0.802	5
A	2.0706	0.5160	0.827	4

F to Remove = 3

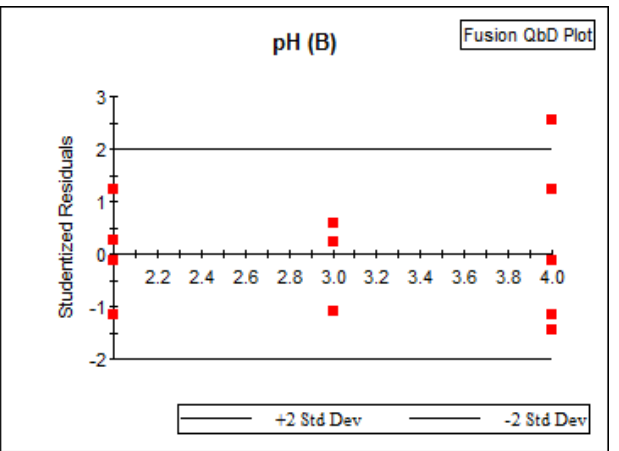
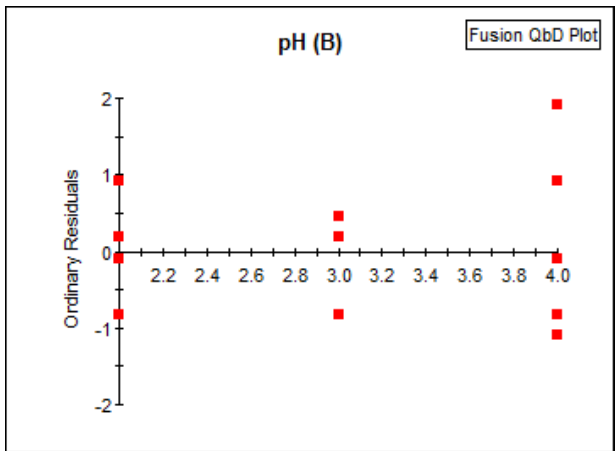
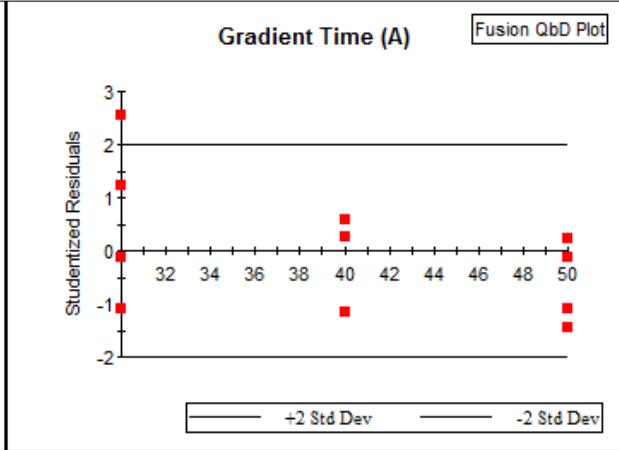
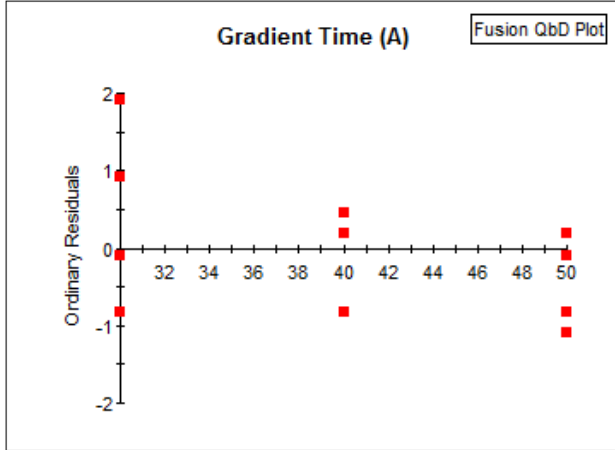
Residuals Data: No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution

Residuals Table

Current Transformed Data Model Statistics								
Run No.	Observed	Predicted	Ordinary Residuals	Studentized Residuals	R-student Residuals	Leverage	Cook's Distance	PRESS Residuals
1	10.0	9.091	0.909	1.2204	1.2396	0.1894	0.0870	1.1215
2	9.0	9.091	-0.091	-0.1220	-0.1185	0.1894	0.0009	-0.1121
3	8.0	7.818	0.182	0.2551	0.2479	0.2576	0.0056	0.2449
4	7.0	7.818	-0.818	-1.0883	-1.0946	0.1742	0.0625	-0.9908
5	7.0	7.818	-0.818	-1.0883	-1.0946	0.1742	0.0625	-0.9908
6	7.0	6.545	0.455	0.5964	0.5848	0.1515	0.0159	0.5357
7	7.0	6.545	0.455	0.5964	0.5848	0.1515	0.0159	0.5357
8	7.0	6.545	0.455	0.5964	0.5848	0.1515	0.0159	0.5357
9	9.0	8.091	0.909	1.2204	1.2396	0.1894	0.0870	1.1215
10	8.0	8.091	-0.091	-0.1220	-0.1185	0.1894	0.0009	-0.1121
11	6.0	6.818	-0.818	-1.1477	-1.1593	0.2576	0.1143	-1.1020
12	9.0	9.091	-0.091	-0.1220	-0.1185	0.1894	0.0009	-0.1121
13	9.0	9.091	-0.091	-0.1220	-0.1185	0.1894	0.0009	-0.1121
14	7.0	7.818	-0.818	-1.1477	-1.1593	0.2576	0.1143	-1.1020
15	7.0	7.818	-0.818	-1.0883	-1.0946	0.1742	0.0625	-0.9908
16	8.0	7.818	0.182	0.2418	0.2350	0.1742	0.0031	0.2202
17	7.0	6.545	0.455	0.5964	0.5848	0.1515	0.0159	0.5357
18	7.0	6.545	0.455	0.5964	0.5848	0.1515	0.0159	0.5357
19	10.0	8.091	1.909	* 2.5629	3.1741	0.1894	0.3837	2.3551
20	7.0	8.091	-1.091	-1.4645	-1.5199	0.1894	0.1253	-1.3458
21	6.0	6.818	-0.818	-1.1477	-1.1593	0.2576	0.1143	-1.1020

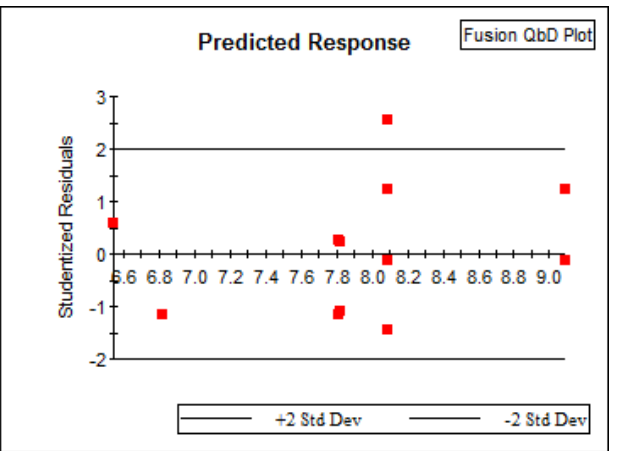
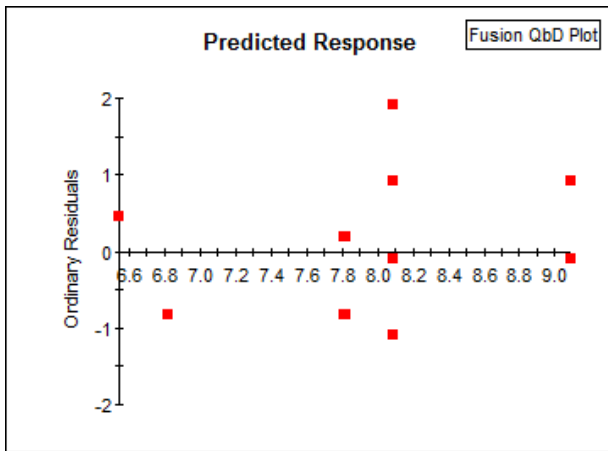
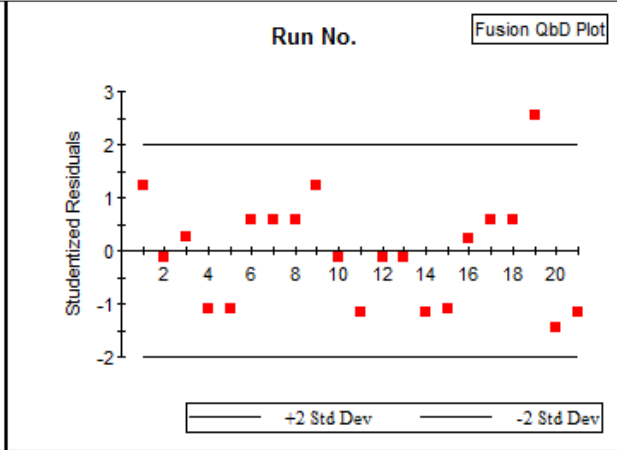
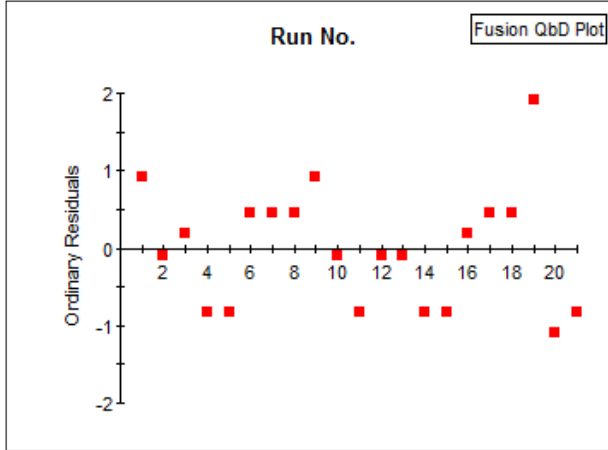
Ordinary Residuals Plots

Studentized Residuals Plots

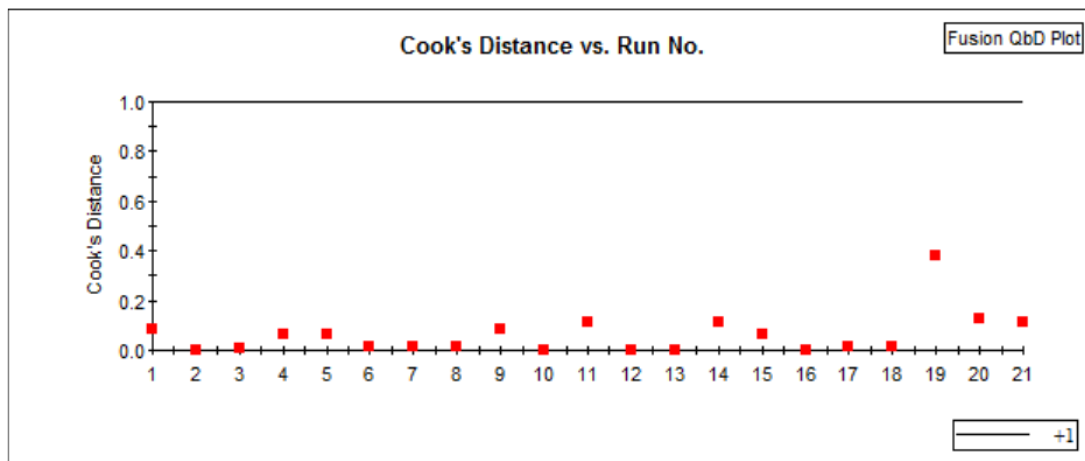
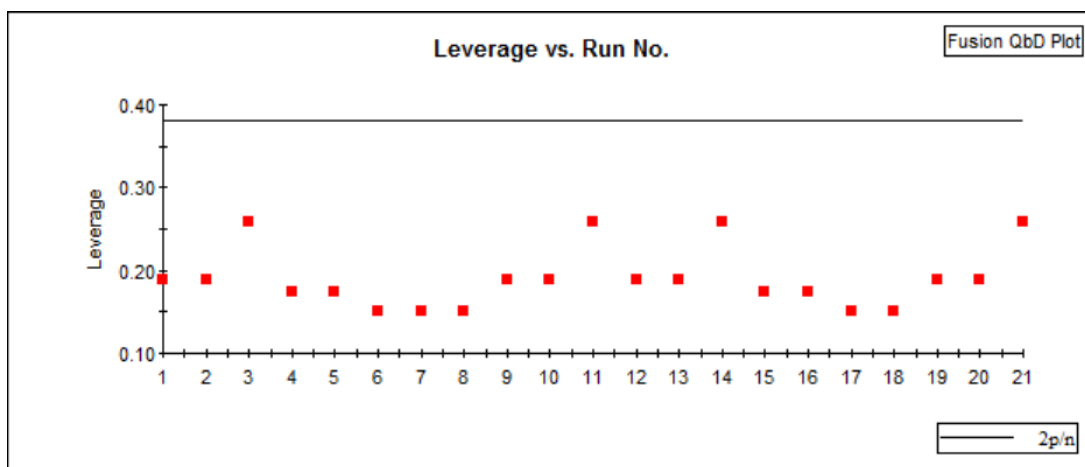
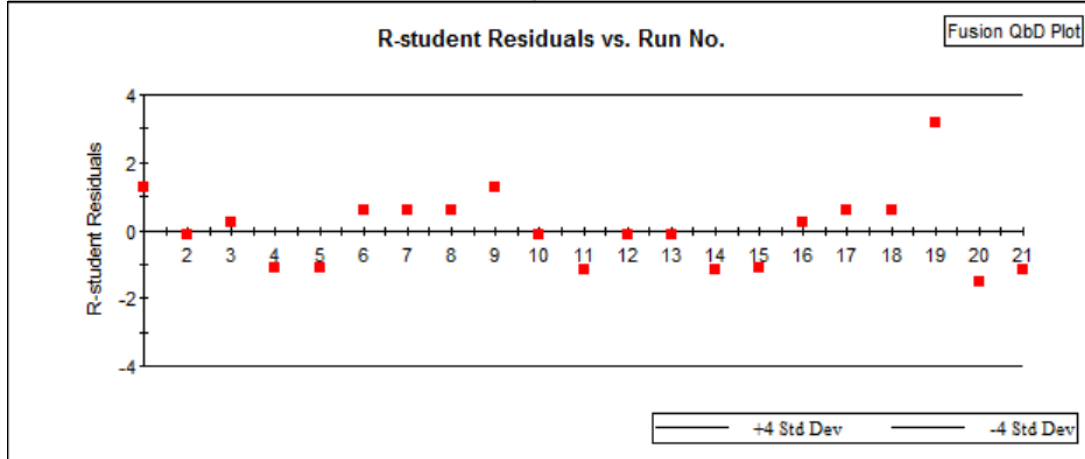


Ordinary Residuals Plots

Studentized Residuals Plots



Outlier / Leverage / Influence Plots

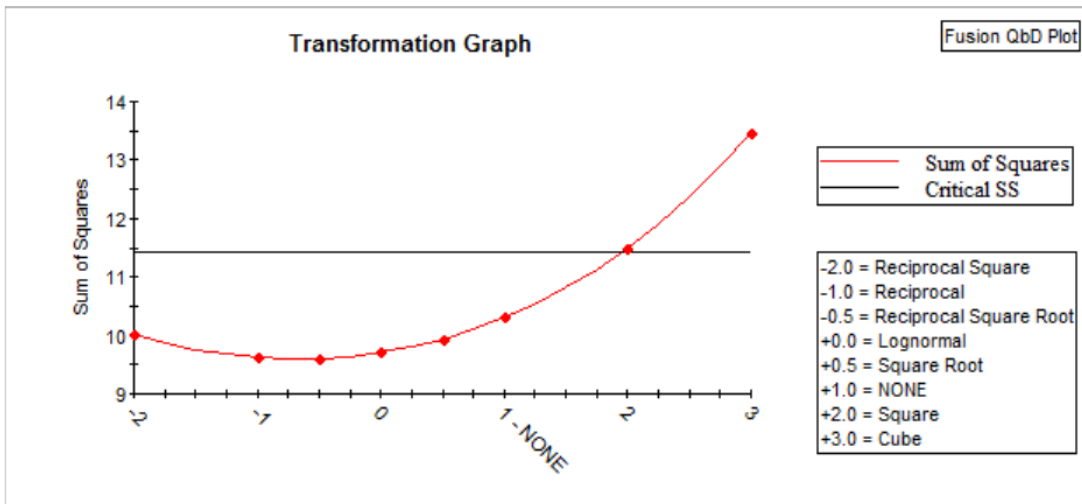


Transformation Analysis: No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution

Transformation Settings / Statistics

Response Measurement Limit Settings	
Absolute Upper Limit	NONE
Absolute Lower Limit	0.000

Data Transformations	Lambda	Sum of Squares
Equivalent		
NONE	1	10.3030
Reciprocal Square Root	-0.5000	9.6006
Reciprocal	-1	9.6199
Natural Log	0	9.7045
Natural Log - LL	---	9.7094
Square Root	0.5000	9.9359
Reciprocal Square	-2	10.0297
Linear - Inverse	---	10.2738
Critical SS	---	11.4296
Not Recommended		
Square	2	11.4996
Cube	3	13.4593
Recommended Transformation		NONE
Selected Transformation		NONE



Extra Sum of Squares Statistics: No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution

Sequential Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	Sequential F-Test F-Ratio	Sequential F-Test Prob. > F
Mean	1,249.714	1	1,249.714	---	---
Linear	4.333	2	2.167	1.6300	0.2240
Quadratic	14.774	3	4.925	8.0500	0.0020
Residual	9.178	15	0.612		
Total	1,278.000	21			

Model Lack of Fit Statistics

Source	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	Test F F-Ratio	Test F Prob. > F
Linear	21.452	6	3.575	17.1600	<0.0001
Quadratic	6.678	3	2.226	10.6800	0.0010
Pure Error	2.500	12	0.208		

Model ANOVA Statistics

Model	Standard Error (+/-)	R Square	Adjusted R Square	Predicted R Square	PRESS
Linear	1.154	0.1532	0.0591	-0.2498	35.3518
Quadratic	0.782	0.6755	0.5674	0.3285	18.9938

Coefficients Table and Models: No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Model Coefficients Table

Coded Name	Coefficient Value	Coefficient Standard Error	Coefficient t Statistic	P-Value	F-Ratio	Lower 95% Conf. Limit	Upper 95% Conf. Limit
Constant	6.545	---	---	---	---	5.866	7.225
B	-0.500	0.239	-2.0935	0.0516	4.3828	-1.004	0.004
(A) ²	1.273	0.374	3.4014	0.0034	11.5694	0.483	2.062
(B) ²	0.773	0.374	2.0651	0.0545	4.2648	-0.017	1.562

F to Remove = 3.0

<u>Coded Variable Model</u>	<u>Natural Variable Model</u>
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution = + 6.545 - 0.500(B) + 1.273(A) ² + 0.773(B) ²	No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution = + 35.363636 - 1.018182(Gradient Time) - 5.136364(pH) + 0.012727(Gradient Time) ² + 0.772727(pH) ²

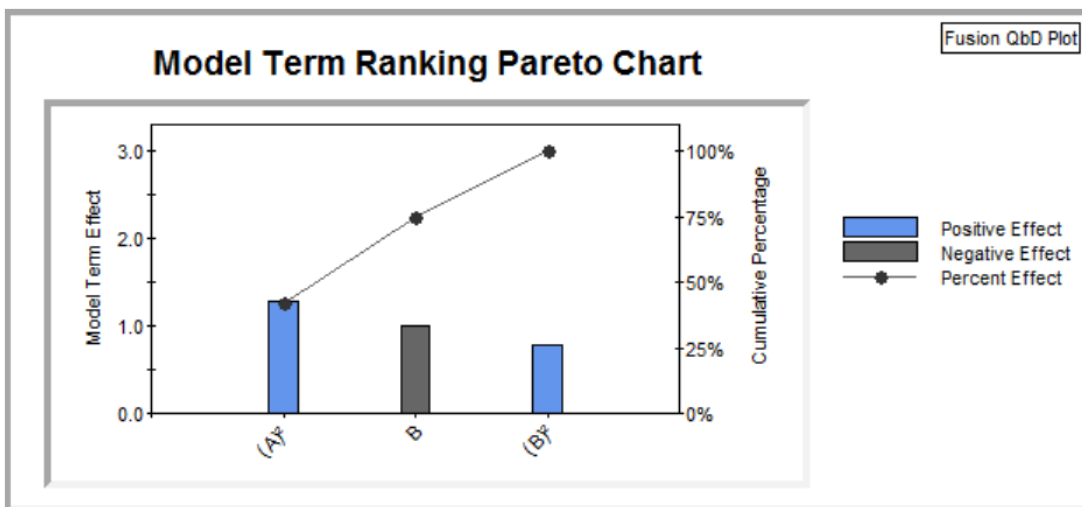
Model Term Pareto Ranking: No. of Peaks \geq 1.50 - USPResolution

Study Variable Code Name Key

Study Variable	Code Name
Gradient Time	A
pH	B

Mean Effects Ranking Table

Model Term	Model Term Range	Coefficient Value	Model Term Effect	Percent of Cumulative Effect
(A) ²	1.0000	1.273	1.273	41.79
B	2.0000	-0.500	-1.000	32.84
(B) ²	1.0000	0.773	0.773	25.37



Best Answer Search - Numerical Search 1

Answer #1

Variable Settings

Variable	Level Setting
Gradient Time	50.0
pH	2.27

Predicted Results

Response	Goal	Predicted Result	Desirability	-2 Sigma Conf. Limit	+2 Sigma Conf. Limit
No. of Peaks	Maximize	12.0	1.0000	10.0	16.2
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution	Maximize	8.6	0.4297	6.7	10.5

Cumulative Desirability Target = 1.0000
Cumulative Desirability Result = 0.6556

Answer #2

Variable Settings

Variable	Level Setting
Gradient Time	30.0
pH	2.27

Predicted Results

Response	Goal	Predicted Result	Desirability	-2 Sigma Conf. Limit	+2 Sigma Conf. Limit
No. of Peaks	Maximize	12.0	1.0000	10.0	16.2
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution	Maximize	8.6	0.4297	6.7	10.5

Cumulative Desirability Target = 1.0000
Cumulative Desirability Result = 0.6556

Reservoir Assignments - Sequence 1

Reservoir B	Level
Acetonitrile	---
Reservoir D-1	Level
Weak Solvent 1	---
pH	2.27

Column Assignments - Sequence 1

Column Valve Position	Column Level	Pump Flow Rate
ValvePosition_3	Zorbax SB C18	1

Constant Name	Constant Value	Units
Column Type	Zorbax SB C18	*
Gradient Curve	6	
Equilibration Time	2.0	min
Initial Hold Time	2.0	min
Initial Hold % Organic	20.0	%
Final Hold Time	10.0	min
Final Hold % Organic	80.0	%
Ramp Up to Wash Time	0.5	min
Column Wash Time	5.0	min
Column Wash % Organic	90.0	%
Ramp Down from Wash Time	2.0	min
Re-equilibration Time	10.0	min
Re-equilibration % Organic	20.0	%

Variable Search Settings

Variable	Units	Type	Range / Levels
Gradient Time	min	P N	30.0 <= Gradient Time <= 50.0
pH	*	P D	2.00 <= pH <= 4.00

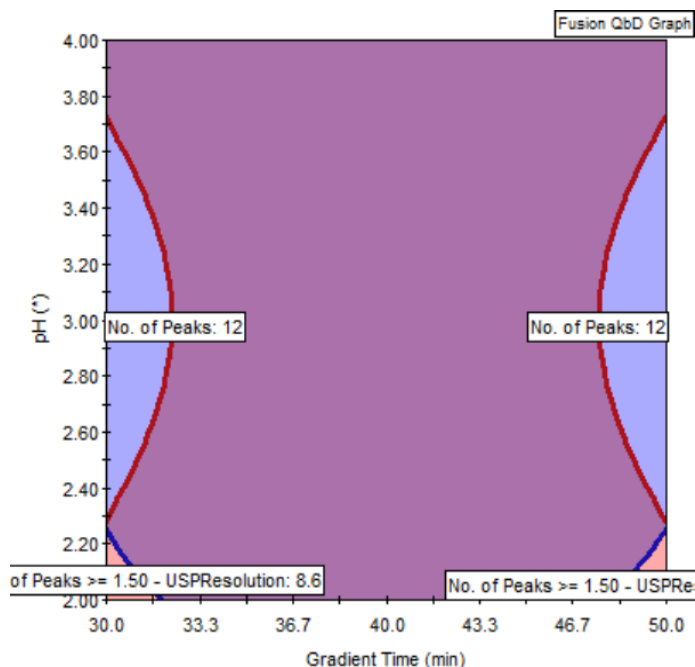
Response Goal Settings

Response	Goal	Lower Bound	Target	Upper Bound	Relative Rank
No. of Peaks	Maximize	0.0		12.0	0.8
No. of Peaks >= 1.50 - USPResolution	Maximize	0.0		20.0	1

Company:
 Libbs Project:
 Tripla_final
 Date: February 8, 2021 2:02:51 PM GMT-03:00 [GMT-03:00]



Overlay Graph 1



Response Variable Goals

Name	Units	Goal	Lower Bound	Upper Bound	Color
No. of Peaks	(*)	Maximize	12.0	---	Red
No. of Peaks >= 1.50 - USPRResolution	(*)	Maximize	8.6	---	Blue

Graph Variable Settings

Name	Units	Graph Setting	Range/Level(s)
Gradient Time	(min)	X Axis Variable	30.0 <= Gradient Time <= 50.0
pH	(*)	Y Axis Variable	2.00 <= pH <= 4.00

Experiment Constants

Constant Name	Constant Value	Units
Column Type	Zorbax SB C18	*
Gradient Curve	6	
Equilibration Time	2.0	min
Initial Hold Time	2.0	min
Initial Hold % Organic	20.0	%
Final Hold Time	10.0	min

Final Hold % Organic	80.0	%
Ramp Up to Wash Time	0.5	min
Column Wash Time	5.0	min
Column Wash % Organic	90.0	%
Ramp Down from Wash Time	2.0	min
Re-equilibration Time	10.0	min
Re-equilibration % Organic	20.0	%