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

**“UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTO DOEHLERT
PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE
ANTIBIÓTICO PARA USO VETERINÁRIO”**

Luiz Americo Verginio Bonamichi*

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: Ouro Fino Saúde Animal**

**São Carlos – SP
2023**



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 Luiz Américo Vergínio Bonamichi, realizada em 15/06/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Oloruntoba Bankole (FCFRP/USP)

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes (UESB)

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 família, primeiramente àqueles que já se foram. Meus avôs Ana, Francisco, Filomena e Arlindo que onde estiverem, estão felizes pela minha conquista.

O meu amado pai que já se foi também, que sonhava em ver seu filho formado, e pelo sacrifício que fez juntamente com a minha mãe para que seus filhos pudessem estudar, esse dia chegou.

A minha mãe e irmã que sempre me apoiam e me cobram novos conhecimentos e desafios, são as minhas maiores fontes de inspiração.

E Por fim, minha amada noiva Nathalia, por nunca me deixar desistir, e sempre querer que eu seja o melhor profissionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ouro Fino Saúde Animal, pela oportunidade proporcionada de crescimento profissional e do aprendizado e retorno dessa pesquisa, e pela confiança, além da disponibilidade de materiais, tempo e equipamentos. Em especial, ao Alex, Mirian e Denise, pela colaboração desde início e até o fim deste projeto.

A todo o departamento da pós de Química da UFSCar, pelo suporte oferecido e pelo programa de mestrado profissional.

E ao Victor pelo compartilhamento dos conhecimentos e companheirismo diário no setor de Estabilidade.

Professor Edenir, meu orientador, pela disponibilidade, paciência e conselhos durante minha caminhada neste projeto. Pelos conselhos e chamadas de atenção, não me deixando desistir deste objetivo.

Agradeço também aos docentes na qual tive as disciplinas, pelos ensinamentos ao longo desta caminhada, disciplinas que ampliaram meu conhecimento em química e principalmente em quimiometria.

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

Por fim, a todas as pessoas e amigos que de alguma forma ajudaram com este projeto e meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

CQ – Controle de Qualidade

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DoE – *Design of Experiments*

LC – *Liquid Chromatography*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

ICH – Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MQFaj – Média Quadrática da Falta de Ajuste

MQReg – Média Quadrática da Regressão

MQres – Média Quadrática do Resíduo

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PE – Polietileno

PEE – Programa de Estudos de Estabilidade

PIB – Produto Interno Bruto

QbD – *Quality by design*

SQEP – Soma Quadrática do Erro Puro

SQfaj – Soma Quadrática Referente da Falta de Ajuste

SQReg – Soma Quadrática da Regressão

SQres – Soma Quadrática dos Resíduos

SQT - Soma Quadrática Total

UR – Umidade Relativa

USP – Farmacopeia Americana

US-FDA – Administração de Alimentos e Medicamento dos Estados Unidos

UV – Ultravioleta

UV-visível – Ultravioleta na região do visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da separação Cromatográfica de dois componentes representados por círculos vermelhos (A) e verdes (B).....	7
Figura 2. Polaridade dos Solventes da Fase Móvel empregadas em HPLC.....	9
Figura 3. Desenho esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência....	9
Figura 4. Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Tempo <i>versus</i> Temperatura.....	15
Figura 5. Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Tempo <i>versus</i> Volume Morto.....	15
Figura 6. Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Volume Morto <i>versus</i> Temperatura.....	16
Figura 7. Estrutura do antibiótico objeto de estudo nesta dissertação de mestrado.....	17
Figura 8. Cromatograma do Padrão e Amostra do Antibiótico.....	23
Figura 9. Valores das médias quadráticas do modelo calculado.....	27
Figura 10. Valores de R ² e R ² máximo do modelo calculado.....	28
Figura 11. Valores do teste F1 do modelo calculado.....	29
Figura 12. Valores do teste F2 do modelo calculado.....	29
Figura 13. Gráfico dos valores experimentais <i>versus</i> previstos do modelo calculado.....	30
Figura 14. Gráfico dos resíduos do modelo calculado.....	30
Figura 15. Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para o modelo calculado.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Visão geral dos experimentos em escala real e codificado.....	13
Tabela 2. Planejamento Doehlert em escala real e codificada (Pereira-Filho, 2018).....	13
Tabela 3. Gradiente Cromatográfico empregado nas determinações	20
Tabela 4. Planejamento Doehlert em escala real e codificada: Resultados do Antibiótico.....	24
Tabela 5. Planejamento Doehlert com os coeficientes que foram calculados.....	25
Tabela 6. Valores dos coeficientes do modelo.....	31

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE PLANEJAMENTO DOEHLERT PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ANTIBIÓTICO PARA USO VETERINÁRIO. Antes do produto farmacêutico veterinário chegar ao seu cliente final para comercialização, diversos aspectos da cadeia produtiva devem ser realizados para garantir sua qualidade. Essas etapas abrangem o processo de fabricação, como insumo farmacêutico, embalagem, distribuição e comercialização. Antes de serem utilizados na etapa de fabricação de produtos veterinários, os insumos farmacêuticos são avaliados pelos parâmetros de qualidade da empresa, com o objetivo de garantir que estejam aptos para uso na formulação, sem comprometer a qualidade do produto final. Atualmente, as empresas buscam um entendimento mais profundo sobre a estabilidade dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs), que são os excipientes que fornecem as propriedades medicinais aos produtos farmacêuticos. Nesta etapa inicial de desenvolvimento do produto é aplicado o conceito de *Quality by Design* (QbD), a fim de entender os pontos críticos que afetam a estabilidade desses insumos evitando problemas no processo produtivo. Assim, para estudar a estabilidade do antibiótico utilizado na empresa, foi empregada a técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Com a cromatografia é possível separar e quantificar as substâncias presentes nas matérias-primas. O método analítico utilizado neste projeto foi desenvolvido e validado pela própria empresa. Com o auxílio da Quimiometria, foi realizado um planejamento experimental para explorar o entendimento da estabilidade do antibiótico em relação a três variáveis: tempo, temperatura e oxidação pelo ar atmosférico (volume morto). Os dados foram processados usando os programas LcSolution e Octave. O antibiótico estudado mostrou-se estável no modelo experimental, e as variáveis investigadas apresentaram efeitos insignificantes. Além disso, o planejamento de experimentos (DoE) foi eficiente e crucial para chegar a essa conclusão.

ABSTRACT

USE OF DOEHLERT PLANNING FOR EVALUATING THE STABILITY OF VETERINARY ANTIBIOTICS. Before a veterinary pharmaceutical product reaches its final customer for commercialization, several regulated production chain must be performed to guarantee its quality. These steps encompass manufacturing process, such as pharmaceutical input, packaging, distribution, and commercialization. Before being used in the manufacturing stage of veterinary products, pharmaceutical inputs are evaluated through the company's quality parameters, with the goal of ensuring that they are suitable for use in the formulation without compromising the quality of the final product. Nowadays, companies seek a deeper understanding of the stability of active pharmaceutical ingredients (APIs), which are the excipients that provide the medicinal properties to pharmaceutical products. In this initial stage of product development, the concept of Quality by Design (QbD) is applied, to understand the critical points that affect the stability of these inputs avoiding issues in the production process. Thus, to study the stability of the antibiotic used in the company, the analytical technique of high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed. With chromatography, it is possible to separate and quantify the substances present in the raw material. The analytical method used in this project was developed and validated by the company itself. With the assistance of Chemometrics, an experimental design was carried out to explore the understanding of antibiotic stability in relation to three variables: time, temperature, and oxidation by the atmospheric air (dead volume). The data was processed using the LCSolution and Octave programs. The studied antibiotic was stable in the experimental model, and the variables investigated presented negligible effects. In addition, the design of experiments (DoE) was efficient and crucial in reaching this conclusion.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	2
2.	OBJETIVOS.....	5
2.1	JUSTIFICATIVAS.....	5
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	7
3.2	REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO.....	11
3.3	ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	11
3.4	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS (DoE).....	12
3.5	PLANEJAMENTO DOEHLERT.....	14
3.6	VARIÁVEIS (tempo, temperatura e Volume Morto).....	16
3.7	ANTIBIÓTICO.....	16
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	19
4.1	PROCEDIMENTOS E MATERIAIS.....	19
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
5.1	RESULTADOS – PLANEJAMENTO DO TIPO DOEHLERT.....	23
5.2	TRATAMENTO DOS DADOS NO OCTAVE.....	26
5.2.1	Cálculo da Regressão para a resposta do antibiótico.....	26
6.	CONCLUSÕES.....	34
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Ouro Fino Saúde Animal foi fundada em 1987 e sua atividade inicial era voltada para a distribuição de medicamentos veterinários. Ao longo dos anos estabeleceu a produção dos seus próprios produtos, possuindo atualmente um portfólio de 102 medicamentos. De acordo com o levantamento do ano de 2022 realizado pela Great Place to Work, a Ouro Fino está hoje entre as melhores empresas para se trabalhar no Brasil. A linha de produtos da Ouro Fino Saúde Animal é abrangente e inclui aqueles destinados as aves, bovinos, equinos, animais domésticos e suínos, dando destaque para os animais de produção. Este último é responsável pela maior parte do faturamento da empresa e pelo expressivo crescimento do mercado para os animais de companhia.

O setor agropecuário é um dos mais relevantes no Brasil, representando mais de 25% do PIB nacional (Produto Interno Bruto). A economia brasileira teve um crescimento expressivo nos anos de 2021 e 2022 faturando acima de R\$ 1 trilhão e grande parte desta contribuição no PIB brasileiro se deve ao agronegócio (CEPEA e ESALQ/USP, 2022).

Na Ouro fino Saúde Animal os antibióticos representam cerca de 20% do portfólio da empresa e por isso o entendimento do seu manuseio para as formulações farmacêuticas da empresa é de suma importância, refletindo na qualidade do produto para o consumidor.

A unidade fabril situada em Cravinhos-SP é responsável pelas formulações desde início do projeto até o processo de regulamentação nos órgãos governamentais. O projeto deve cumprir as seguintes etapas: formulação e produção, pesquisa pré-clínica, triagem, investigação, pesquisa clínica e pesquisa pós-comercialização. Para que o produto seja comercializado, ele deverá ser registrado de acordo com a legislação sanitária vigente. Para esse processo, a Ouro Fino deverá apresentar à agência reguladora, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) os resultados de todas as fases pré-clínicas e estudos clínicos juntamente com a descrição dos processos de produção do medicamento. O MAPA avalia diversos fatores, tais como qualidade, eficácia e segurança do medicamento. Assim, caso todos os requisitos sejam atingidos, a autorização para lançamento e comercialização é concedida. Desta forma, o novo medicamento estará disponível, assim como descrito na instrução normativa nº23,

de dezembro de 2016 sobre critérios e procedimentos necessários para registro de produtos farmacêuticos.

Uma das etapas do registro farmacêutico é a apresentação dos estudos de estabilidade da formulação. Tais estudos são descritos no guia nº318/2019 e tem como objetivo fornecer evidências sobre como a qualidade de um medicamento ou IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) varia ao longo do tempo, quando sob a influência de diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz. Na indústria farmacêutica, a aplicação de um Programa de Estudos de Estabilidade (PEE) é primordial para assegurar que os medicamentos desenvolvidos mantenham sua qualidade durante o ciclo de desenvolvimento e fabricação, obedecendo aos critérios de estabilidade determinados pela legislação. Esses estudos fazem parte das exigências para o registro do fármaco junto ao órgão regulador, e, portanto, o PEE tem como finalidade determinar a cinética de degradação do fármaco, definindo o prazo de validade e a melhor embalagem para acondicionamento. As condições de armazenamento e transporte aos quais o produto pode ou não ser submetido também são verificados e certificados para assegurar sua qualidade.

Na indústria, em especial no desenvolvimento de projetos, na maioria das vezes é necessário o estudo minucioso para obter informações sobre produtos e processos. Experimentos são empregados para resolver problemas de fabricação, como a análise entre diferentes processos; diferentes conceitos de produto, entendimento da influência de determinados fatores, entre outros. O Planejamento de Experimentos (*Design of Experiments*, DoE) é uma técnica utilizada para planejar experimentos, ou seja, definir quais variáveis, em que quantidade e em quais condições devem ser coletados durante um determinado experimento, buscando, basicamente, satisfazer dois grandes objetivos: qualidade estatística no modelo matemático obtido e o menor custo. É, portanto, uma técnica de extrema importância para a indústria, pois seu emprego permite resultados mais confiáveis economizando recursos financeiros e tempo. O DoE hoje é uma das ferramentas utilizadas no conceito de *quality by design* (QbD). Para o QbD, o uso de DoE inclui vantagens por não exigir conhecimento detalhado do sistema, definição do número de experimentos a serem realizados e modelagem de dados para geração de funções matemáticas empíricas que geralmente são lineares ou quadráticas (Pereira-Filho, 2018).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O Principal objetivo dessa dissertação de mestrado profissional é estudar a estabilidade de um antibiótico (IFA) durante 4 meses utilizando planejamento de experimentos e cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC). Por questões de confidencialidade, a identificação do antibiótico não será revelada e pretende-se verificar qual(is) variável(is) tem mais influência na sua degradação. Desta forma, o projeto visa também evitar tais condições durante o uso desse antibiótico no processo de fabricação. Além disso, as ferramentas relacionadas ao DoE possibilitarão uma maior compreensão dos produtos da empresa, refletindo assim em mais qualidade.

2.1 JUSTIFICATIVAS

A Ouro Fino Saúde Animal tem como propósito “reimaginar a saúde animal, e para isso desafiar o pensamento convencional para liderar a evolução e o crescimento sustentável do ecossistema de saúde animal”. Assim, é muito importante que a empresa esteja conectada com as novas ferramentas que o avanço tecnológico, os meios científicos e analíticos oferecem. Desta forma, além de cuidar e aumentar a qualidade dos produtos, a empresa procura sempre atuar na vanguarda do conhecimento. A Ouro Fino Saúde Animal possui hoje 3 pilares: jogar para ganhar, cuidar de pessoas e conectar com o mundo. A empresa sempre incentivou os seus colaboradores a buscarem novos desafios e aprendizados, e, dessa forma, pode-se considerar que a aproximação da empresa com a Universidade também é outra motivação que justifica a realização dessa dissertação.

Uma prática adotada pela empresa é o aprimoramento contínuo, que visa atingir resultados cada vez melhores, aumentando a qualidade e reduzindo desperdícios, gerando uma vantagem competitiva para empresa.

Dessa forma, a empresa busca um melhor entendimento sobre a degradação de um produto, visando o Tempo, Temperatura e Volume Morto do IFA estudado, que é um excipiente desta formulação, ou se a degradação é proveniente da própria formulação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A técnica analítica utilizada neste trabalho é a cromatografia líquida (Liquid Chromatography, LC). A LC é sem dúvida, uma das técnicas analíticas mais utilizadas nos laboratórios em todo mundo, pois apresenta grande confiabilidade em seus resultados. Como mencionado por Mcpolin, “A cromatografia é uma técnica que separa componentes de uma mistura dependendo da diferença de tempo que cada um deles apresenta para atravessar uma fase estacionária, quando é transportado por uma fase móvel” (Mcpolin, 2009). A Figura 1 exemplifica o processo de cromatografia descrito anteriormente.

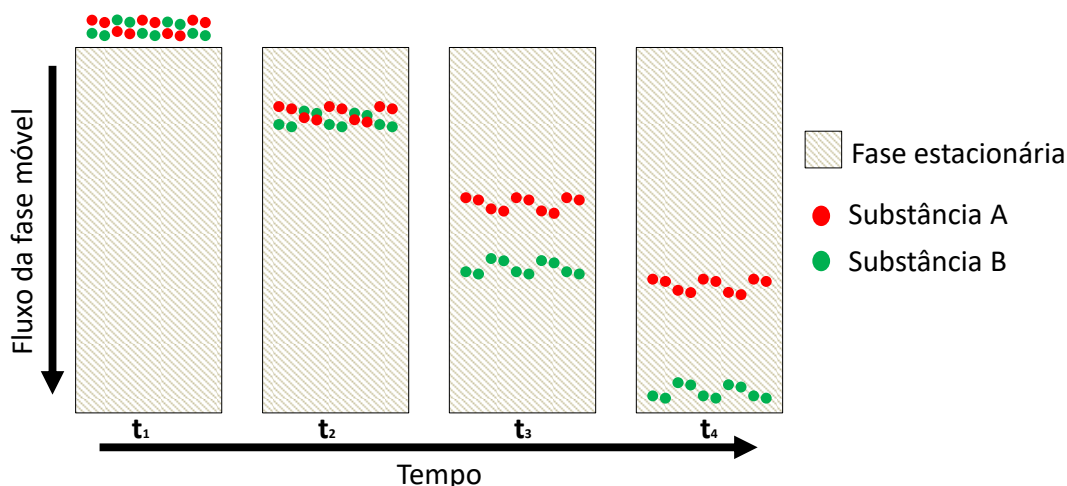


Figura 1 – Ilustração da separação Cromatográfica de dois componentes representados por círculos vermelhos (A) e verdes (B).

A Figura 1 representa um processo de separação de uma mistura dos componentes A e B (círculos vermelhos e verdes, respectivamente) que são introduzidos numa fase móvel e eluem com o mesmo fluxo. No tempo t₁ eles encontram a fase estacionária e aderem a esta. Dependendo da afinidade com a fase móvel ou estacionária, os componentes migram ou não, e a afinidade está relacionada com duas propriedades da molécula: "Adsorção" e "Solubilidade". A adsorção é a propriedade em que um componente da mistura adere à fase estacionária, quanto maior for a adsorção à fase estacionária, mais lentamente a molécula se moverá pela coluna. Já a solubilidade é a propriedade em que um

componente da mistura se dissolve na fase móvel, quanto maior for a solubilidade na fase móvel, mais rapidamente a molécula se moverá pela coluna. A substância A tem maior afinidade com a fase estacionária do que a B e, por isso desloca-se mais lentamente, começando a separar-se no tempo t_2 . No t_3 elas estão completamente separadas, mas são arrastadas até o t_4 , atingindo o tempo de retenção da substância B, ou seja, o tempo necessário para que a substância B saia da coluna (Mcpolin, 2009).

A LC é classificada de duas formas, e depende do tipo de interações que o analito estabelece com a fase estacionária e da polaridade da fase móvel. Originalmente a cromatografia líquida surgiu como cromatografia de “*Normal Phase*” (fase normal) onde são empregados adsorventes altamente polares (CaCO_3 , Sílica) com uma fase móvel não polar. Posteriormente, foi introduzida uma fase estacionária quimicamente modificada onde os grupos polares foram protegidos e cobertos com carbono e depois ligados a cadeias alquila, dando origem à Cromatografia de “*Reversed phase*” (fase reversa), onde a fase estacionária é apolar (hidrocarbonetos), e a fase móvel é polar (água, metanol e acetonitrila).

Ao longo do tempo foram implementadas inovações, tais como a tecnologia de empacotamento com esferas de vidro que possuem superfícies mais porosas, facilitando a transferência de massa entre a fase líquida e a superfície da fase estacionária. Quando o tamanho das partículas das esferas de vidro atingiu um diâmetro entre 3 e $10\mu\text{m}$ surgiu então a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-HPLC, onde demandou-se equipamentos mais resistentes a elevadas pressões. As fases estacionárias da HPLC são em forma de coluna de aço inoxidável com enchimento de partículas de tamanho reduzido, descritas através do tipo do seu empacotamento, tamanho, altura e diâmetro da partícula e do poro. Já a fase líquida (móvel) da HPLC é uma fase que flui através da estacionária transportando o analito. Os solventes mais utilizados em HPLC são listados na Figura 2 por ordem crescente de polaridade.

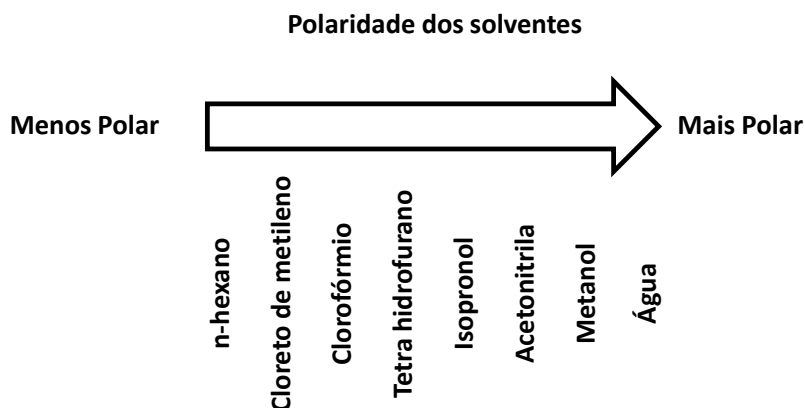


Figura 2 – Polaridade dos Solventes da Fase Móvel empregadas em HPLC.

A Figura 3 apresenta uma descrição sucinta de um cromatógrafo líquido de alta eficiência comumente empregado em análises químicas.

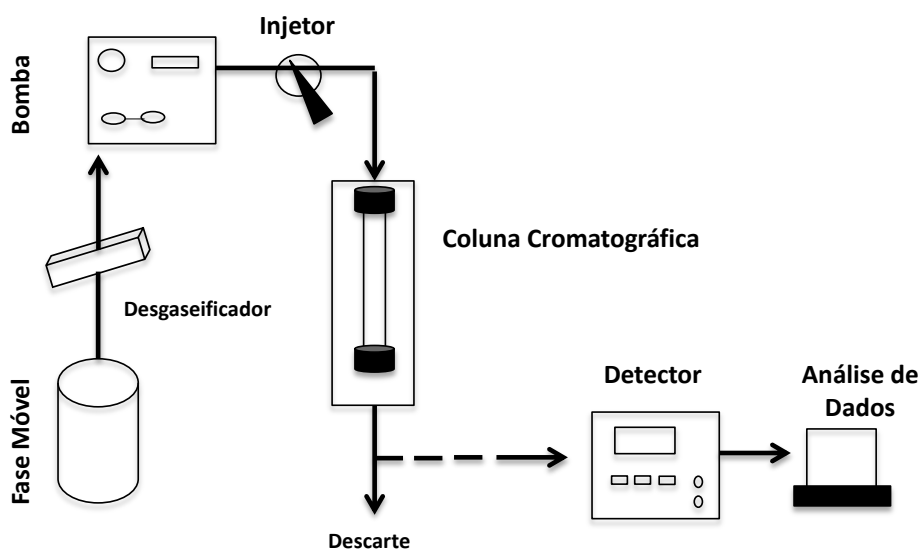


Figura 3 – Desenho esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

O reservatório da fase móvel é o local onde ficam armazenados os solventes para alimentar o sistema, que pode ser equipado com um sistema de desgaseificação e com filtros especiais para isolar o solvente da influência ambiental. A bomba do instrumento permite uma vazão contínua e constante da fase móvel através do sistema. O Injetor permite a introdução da mistura de analitos no fluxo da fase móvel antes de entrarem na coluna. A coluna cromatográfica é o dispositivo onde a fase móvel entra em contato com a estacionária levando à separação dos analitos da mistura. O Detector procede ao

registro das propriedades físicas-químicas do analito na coluna, os detectores mais usados em análises farmacêuticas são o de Ultravioleta (UV). Análise de dados é o sistema computadorizado que controla todos os parâmetros operacionais (composição da fase móvel, sequência de injeção, entre outros) e registra os dados provenientes do detector.

O método analítico é um procedimento laboratorial que tem como objetivo determinar uma característica de uma matéria-prima, de uma substância ou de um produto acabado. A validação do procedimento analítico consiste no processo de demonstração de que esse método é confiável e adequado ao seu propósito. Todos os métodos utilizados durante a formulação e o desenvolvimento de uma substância necessitam ser validados. Embora os requisitos de validação estejam claramente documentados pelas entidades reguladoras como, a ICH (Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano), USP (Farmacopeia Americana) e US-FDA (Administração de Alimentos e Medicamento dos Estados Unidos), a validação é aberta a interpretação. A validação de um método que emprega HPLC é relacionada com testes de identificação, ensaios de quantificação e testes de controle de substâncias relacionadas e ensaios quantitativos do princípio ativo nas matérias-primas e no produto final. A validação de um método analítico utilizado em análises de rotina é estabelecida através da evidência documentada que demonstra a exatidão, precisão, linearidade, seletividade e robustez.

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante do método e asseguram o desempenho adequado do sistema cromatográfico. Os parâmetros normalmente utilizados para avaliar o desempenho da coluna são (US-FDA,1994): retenção, repetibilidade, pratos teóricos/eficiência, *tailing*/simetria e resolução.

As estratégias de calibração mais usadas em análises farmacêuticas com HPLC são a do padrão externo. É o tipo de calibração mais confiável e consiste na preparação de um padrão de concentração conhecida que é analisado ao lado das amostras. A resposta ao padrão é comparada com a do analito na amostra e assim pode ser determinada a concentração. Quando é usado este tipo de calibração deve-se considerar que será necessário a utilização de um padrão de referência de pureza conhecida ou até mesmo um padrão de referência certificado e que a amostra deve ter uma concentração similar à do padrão.

3.2 REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO

A HPLC tem sido largamente utilizada para a determinação de fármacos, e um dos detectores mais empregados é o ultravioleta visível (UV-Visível). Entretanto, alguns fármacos não absorvem na região do UV-Visível, devido à baixa estabilidade e ausência de grupos cromóforos. Desse modo, reações de derivatização possibilitam que esses compostos sejam determinados por HPLC com esse detector. Um dos reagentes mais usados nas reações de derivatização é o-ftalaldeído (I.MOLNÁR-PERL, 2005).

3.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade de produtos farmacêuticos está entre os parâmetros mais importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentro dos objetivos do estudo de estabilidade está a previsão do prazo de validade para formas farmacêuticas e é utilizado para determinar condições particulares de armazenamento e sugerir instruções que serão apresentadas no rótulo. Além de garantir a manutenção da qualidade, segurança e eficácia do produto em todo o prazo de validade. Esses estudos são conduzidos segundo as diretrizes emitidas pelos órgãos regulatórios governamentais.

Os estudos de estabilidade são usados para testar o medicamento por períodos mais longos sob variação de condições de temperatura e Umidade Relativa (UR). Estudos de estabilidade de longa duração são realizados para testar a amostra em intervalos de tempo específicos e condições de parâmetros externos são alteradas em conformidade. O objetivo principal deste estudo é determinar a vida útil do medicamento. Os estudos de estabilidade são divididos em três tipos, estabilidade de longa duração, estabilidade acelerada e estudos de estabilidade em uso (MAPA, Instrução Normativa nº 15, para testes de Estabilidade de Produto Farmacêutico, de 12 de maio de 2005).

Estabilidade de Longa duração: estudo realizado em condições controladas de armazenamento em intervalo de tempo igual ou superior ao estimado para o prazo de validade do produto, em embalagem intacta (primária e/ou secundária).

Estabilidade Acelerada: Estudo realizado em condições forçadas de armazenamento em intervalo relativamente curto de tempo, com o objetivo de estimar o prazo de validade do produto nas condições preconizadas para armazenamento, em embalagem intacta (primária e/ou secundária).

Estabilidade em Uso: Intervalo de tempo durante o qual um produto multidoso, reconstituído, pode ser utilizado mantendo sua estabilidade.

3.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS (DoE)

O planejamento fatorial é uma das primeiras etapas a ser realizada quando o experimentador deseja identificar, dentre um número elevado de variáveis, aquela ou aquelas que apresentam maior importância ou efeito sobre a resposta em questão. Com uso de planejamento fatorial é possível:

- Observar interações sinérgicas ou antagônicas entre variáveis;
- Prever a resposta do sistema em estudo em uma condição que não foi testada experimentalmente;
- Conhecer antecipadamente quantos experimentos deverão ser realizados para alcançar determinado objetivo; e
- Gerar menos resíduos químicos ao efetuar um número reduzido de experimentos, o que contribui para os princípios de química verde e economia de tempo. (Pereira-Filho, 2018).

Em planejamento fatorial no qual são testadas três variáveis em dois níveis, são realizados $2^3 = 8$ experimentos, assim o número de experimentos aumenta exponencialmente com o número de variáveis, porém para este trabalho foi escolhido o planejamento Doehlert (Ferreira et al, 2004) já que o conhecimento sobre os fatores (temperatura, tempo e volume morto) que influenciam no sistema é alto. A resposta que foi monitorada é a concentração do antibiótico em %p/p, e os níveis máximo (alto) e mínimo (baixo) determinado pelo operador para cada variável em escala real e codificado são aqueles mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Visão geral dos experimentos em escala real e codificado

Nível Real e (Codificado)	Variáveis	Temperatura (°C)	Tempo (Dias)	Volume Morto (%Preenchimento)
Baixo		-20 (-1)	1 (-0,866)	25 (-0,817)
Intermediários		-5 (-0,5)	21 (-0,577)	62,5 (0)
		10 (0)	41 (-0,289)	
			61 (0)	
			80 (0,289)	
		25 (0,5)	100 (0,577)	
Alto		40 (1)	120 (0,866)	100 (0,817)

É necessário trabalhar na escala codificada já que temperatura, tempo e volume morto são variáveis que tem unidades diferentes.

O planejamento do tipo Doehlert para as 3 variáveis segundo a literatura é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento Doehlert em escala real e codificada (Pereira-Filho, 2018)

Experimento	Temperatura (°C)		Tempo (dias)		Volume Morto (%preenchimento)	
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.
1	10	0	61	0	62,5	0
2	10	0	61	0	62,5	0
3	10	0	61	0	62,5	0
4	40	1	61	0	62,5	0
5	25	0,5	120	0,866	62,5	0
6	25	0,5	80	0,289	100	0,817
7	-20	-1	61	0	62,5	0
8	-5	-0,5	1	-0,866	62,5	0
9	-5	-0,5	41	-0,289	25	-0,817
10	25	0,5	1	-0,866	62,5	0
11	25	0,5	41	-0,289	25	-0,817
12	-5	-0,5	120	0,866	62,5	0
13	10	0	100	0,577	25	-0,817
14	-5	-0,5	80	0,289	100	0,817
15	10	0	21	-0,577	100	0,817

3.5 PLANEJAMENTO DOEHLERT

A matriz Doehlert é uma ferramenta quimiométrica usada para estimar pontos críticos. Esta foi desenvolvida em 1970 quando proposta por David H. Doehlert. Desde a sua descoberta, a matriz Doehlert vem sendo usada como importante ferramenta de planejamento de experimentos (HAIR, 2009)

O planejamento Doehlert pode descrever vários tipos de domínios. A quantidade e forma desses domínios dependem do número de variáveis envolvidas no processo. Para três variáveis, apresenta-se em formato esférico. Quanto aos números de experimentos, é denotado de grande eficiência e pode ser determinado pela expressão $N = k^2 + k + PC$. Sendo N o número de experimentos necessários, PC é o número de réplicas do ponto central e k é o número de variáveis.

O planejamento Doehlert apresenta algumas vantagens, dentre estas, está o número reduzido de experimentos para sua aplicação, o qual está atrelado à quantidade de variáveis que se deseja estudar. Para duas variáveis, a matriz Doehlert consiste de um ponto central e mais seis outros pontos formando um hexágono regular. Uma matriz Doehlert envolvendo três fatores, apresenta três diferentes possibilidades oriundas de um cubo octaedro, podendo ser uma projeção sobre uma face triangular, uma projeção sobre uma face quadrada e uma projeção sobre um vértice, possibilitando o estudo das variáveis em maior e menor significância (BEZERRA, 2008).

O planejamento Doehlert deste estudo, por exemplo, a variável tempo foi estudada em sete níveis (1, 21, 41, 61, 80, 100, 120 dias), temperatura em cinco níveis (-20, -5, 10, 25, 40 °C) e volume morto em três níveis (25, 62,5, 100 % preenchimento). As Figuras 4, 5 e 6 apresentam graficamente o desenho espacial do estudo tendo em conta a projeção das variáveis tempo x temperatura, tempo x volume morto e volume morto x temperatura, respectivamente.

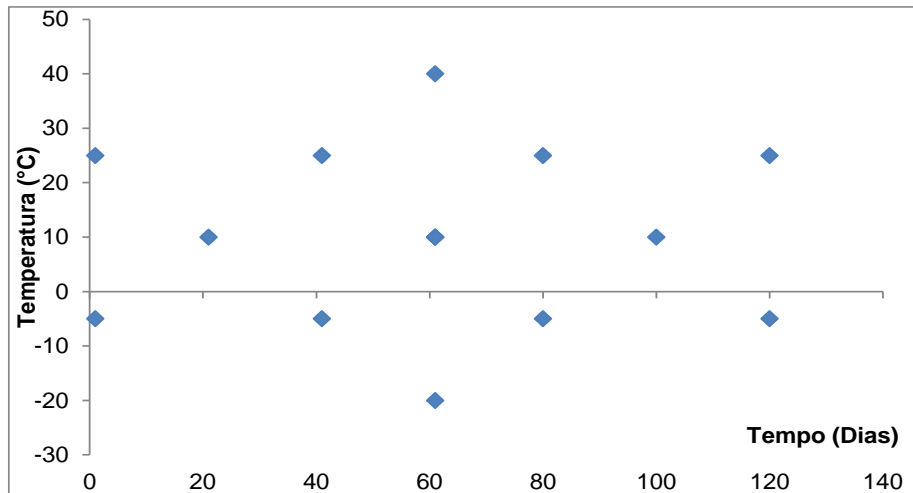


Figura 4. Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Tempo *versus* Temperatura.

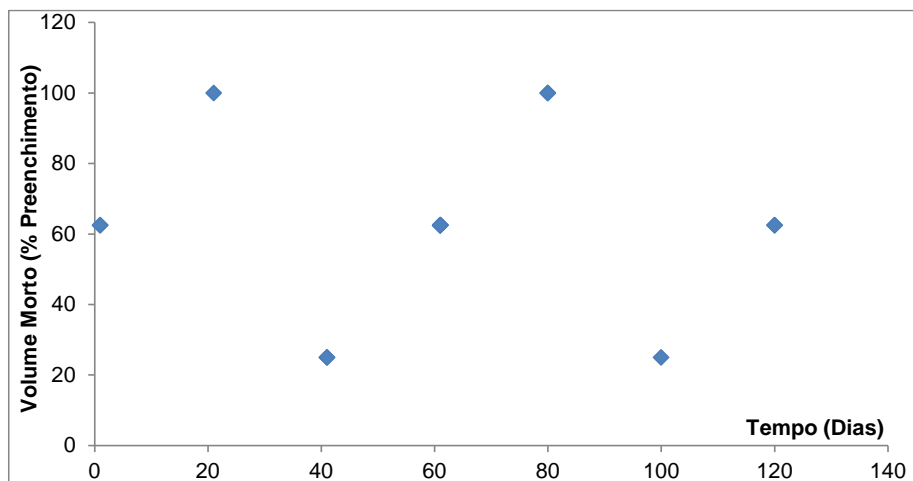


Figura 5. Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Tempo *versus* Volume Morto.

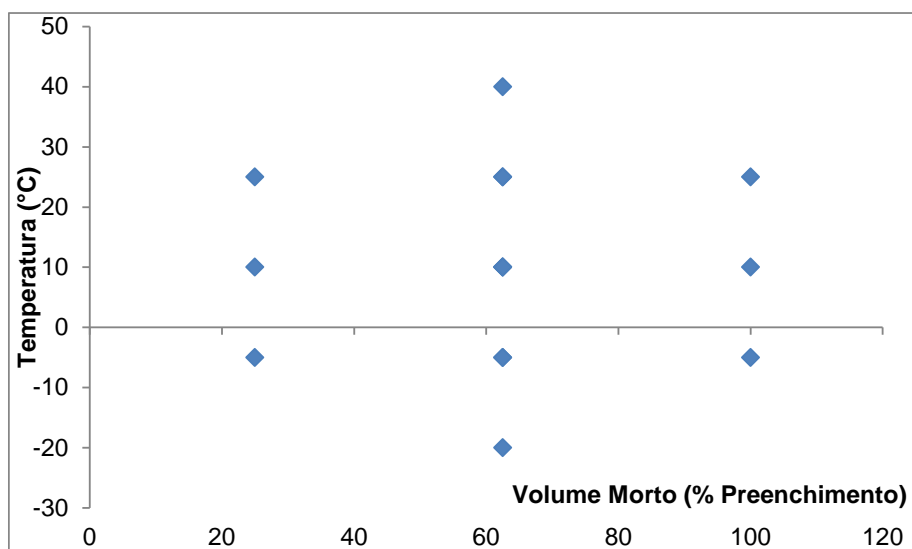


Figura 6: Representação gráfica do desenho espacial do estudo: Volume Morto *versus* Temperatura.

3.6 VARIÁVEIS (Tempo, Temperatura e Volume Morto)

A busca de um entendimento sobre a estabilidade do IFA (antibiótico) estudado neste projeto por meio do tempo, temperatura e volume morto (% preenchimento) é importante, pois o mesmo fica armazenado no almoxarifado da empresa por um período máximo de quatro meses (120 dias) até sua próxima utilização num lote produtivo. O IFA é adquirido pela empresa via exportação e foi verificado que a temperatura de transporte dessa matéria prima até chegar à empresa pode atingir até no máximo 40°C. Além disso, durante a produção dos medicamentos nem todo conteúdo do recipiente do IFA é utilizado, permanecendo uma quantidade alta em contato com o volume morto (% preenchimento) aguardando até a próxima utilização.

3.7 ANTIBIÓTICO

Como mencionado anteriormente, a identificação do antibiótico não será revelada, porém o IFA é um antibiótico aminoglicosídeo utilizado no tratamento de várias infecções gram-negativas. Deve ser indicado para o tratamento em septicemia bacteriana, meningite, e de diversas infecções: dos tratos urinário e gastrointestinal e de tecidos moles.

O antibiótico é uma estrutura formada por três componentes como mostra a Figura 7, que neste estudo será nomeado como antibiótico 1, 1a e 2a+2b+2.

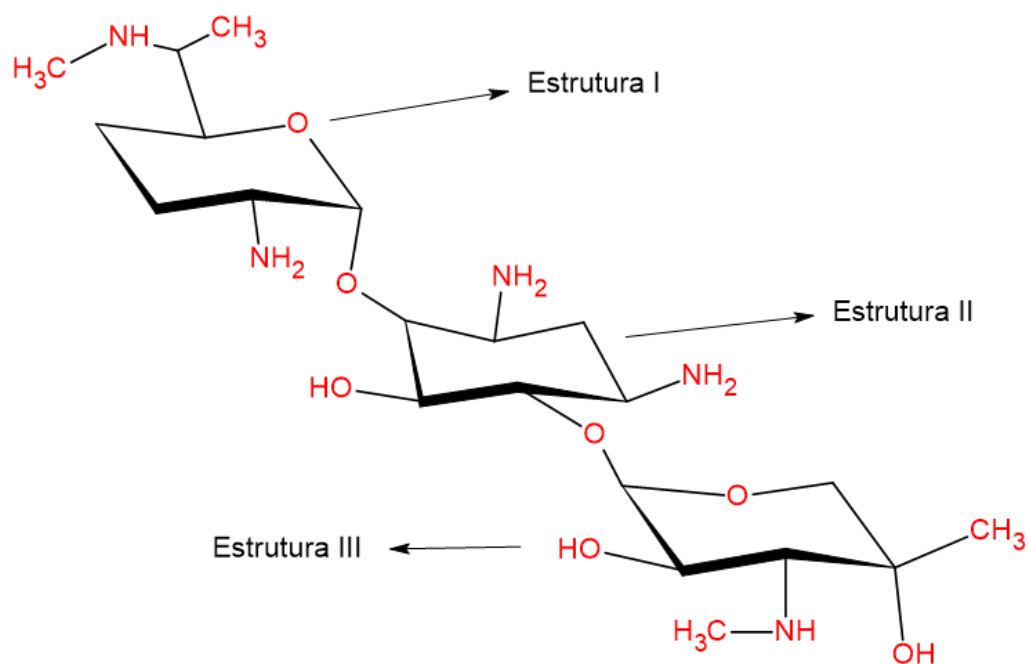


Figura 7. Estrutura do antibiótico objeto de estudo nesta dissertação de mestrado.

A estrutura I, II e III representa o antibiótico 1, 1a e 2a+2b+2, são isômeros considerados pseudo-trissacarídeos (ANDRADE, 2015).

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

O método utilizado foi desenvolvido e validado pela empresa, no setor de pesquisa e desenvolvimento (P&D), sendo rotineiramente utilizado para análise da matéria prima estudada neste projeto.

4.1 PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

Os experimentos para o desenvolvimento do projeto foram realizados nas instalações do laboratório do setor de controle de qualidade (CQ) da empresa Ouro Fino Saúde Animal localizado na cidade de Cravinhos- SP. O laboratório conta com uma vasta variedade de equipamentos analíticos qualificados para oferecer dados confiáveis e rastreáveis, respeitando a integridade dos resultados obtidos.

O método foi desenvolvido e validado no equipamento (HPLC) das marcas Shimadzu® (Modelo LC20-A) e Waters® (Modelo Acquity). Os instrumentos estão equipados com detector de arranjo de diodos (DAD) e de ultravioleta (UV). A coluna cromatográfica utilizada é Gemini C18 (Phenomenex). Além disso, foram empregados padrões secundários para o doseamento do antibiótico. Os solventes orgânicos utilizados (metanol, o-ftalaldeído e isopropanol), sais (heptanossulfonato de sódio), ácido e base (ácido bórico, ácido tioglicólico e hidróxido de potássio) e foram adquiridos da empresa Merck e Sigma- Aldrich e a água ultrapura foi obtida do sistema milli-Q da Millipore. O antibiótico estudado foi amostrado em frasco Nalgene® de polietileno (PE) de 25 mL e submetido a temperatura e umidade controlada (Câmara Mecalor, Brasil).

Condições Cromatográficas:

- Fase Estacionária: Gemini C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm).
- Fase Móvel: Metanol: Solução Tampão (55:45% v/v) – Modo Gradiente.

Solução Tampão: Em béquer de 500 mL, acrescentar 5,0 g heptanossulfonato de sódio, 250 mL de água purificada e 50 mL de ácido acético glacial. Agitar em ultrassom por 5 minutos ou até completa solubilização e filtrar em membrana de 0,45 µm.

A Tabela 3 mostra o gradiente cromatográfico que foi utilizado na análise.

Tabela 3 – Gradiente Cromatográfico empregado nas determinações.

Tempo (min)	% Metanol	% Solução Tampão
0,01	55	45
10	55	45
34	76	24
34,5	55	45
43	55	45

As demais condições cromatográficas são:

- Vazão: 1,5 mL/minuto.
- Volume de Injeção: 20 µL.
- Comprimento de onda: 330 nm.
- Detector de Ultravioleta (UV).
- Temperatura da coluna: 30°C.
- Auto Injetor: 5°C.
- Tempos de retenção para a mistura de antibiótico: (1) Aproximadamente 18,85 minutos; (1a) Aproximadamente 30,95 minutos; (2a+2b) Aproximadamente 33,10 minutos; (2) Aproximadamente 34,00 minutos.
- Tempo de eluição: 43,00 minutos.

É importante mencionar que o antibiótico é uma mistura de quatro componentes principais (Antibiótico 1, Antibiótico 1a, Antibiótico 2a+2b e Antibiótico 2) e será quantificado pela somatória das áreas (1+1a+2+2a+2b).

Preparo dos Padrões da Curva Analítica

Em um balão volumétrico de 50 mL, pesar 32,5 mg do antibiótico e adicionar 30 mL de água purificada. Agitar em vórtex por 1 minuto e colocar no banho ultrassônico por 5 minutos ou até completa solubilização. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, completar o volume do balão com água purificada. Agitar em vórtex até total homogeneização e realizar a derivatização. A curva analítica apresentará três pontos (P1 a P3) com a concentração de antibiótico de: 0,520 mg/mL, 0,650 mg/mL e 0,780 mg/mL, respectivamente.

Preparo da Amostra do Antibiótico

Em um balão de 50 mL, pesar 32,5 mg do antibiótico e adicionar 30 mL de água purificada. Agitar em vórtex por 1 minuto e colocar em banho ultrassônico por 5 minutos ou até completa solubilização. Após a amostra atingir a temperatura ambiente, completar o volume do balão com água purificada. Agitar em vórtex até total homogeneização e realizar a derivatização.

Preparo da Solução Derivatizante

Solução de o-ftalaldeído: Em béquer de 100 mL, pesar 1,0 g de o-ftalaldeído, adicionar 5 mL de metanol e agitar em banho ultrassônico até completa solubilização. Em seguida, acrescentar 95 mL da solução de ácido Bórico 0,4 mol/L e 2 mL de ácido tioglicólico. Ajustar o pH da solução para 10,40 utilizando uma solução de hidróxido de potássio 8 mol/L.

Reação de Derivatização

Em tubo de ensaio com tampa de 25 mL, adicionar 2,5 mL de amostra do padrão ou do Insumo Farmacêutico, 2,75 mL de álcool isopropílico e 1 mL da solução de o-ftalaldeído. Agitar em vórtex por 5 segundos e colocar para reagir em banho maria à 60°C e ao abrigo de luz durante exatamente 15 minutos. Refrigerar a amostra em banho de gelo e analisar.

Na realização dos cálculos foi utilizado o programa LC-Solution (Software Shimadzu) para o tratamento dos dados cromatográficos e o Octave (programa livre) para o tratamento dos dados estatísticos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 RESULTADOS: PLANEJAMENTO DO TIPO DOEHLERT

Na execução do planejamento do tipo Doehlert para as três variáveis estudadas: temperatura, tempo e volume morto, foi obtida a concentração do antibiótico em %p/p a partir do método cromatográfico apresentado anteriormente. A Tabela 4 mostra os experimentos e os resultados obtidos.

A Figura 8 apresenta um cromatograma típico do antibiótico estudado para a obtenção dos resultados dos experimentos

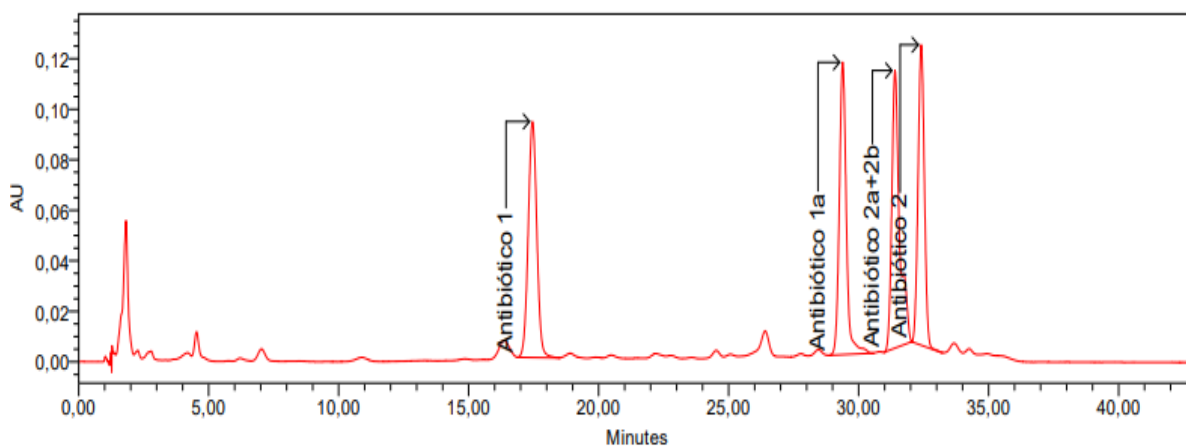


Figura 8. Cromatograma do Padrão e Amostra do Antibiótico.

Tabela 4. Planejamento Doehlert em escala real e codificada: Resultados do Antibiótico.

Experimento	Temperatura (°C)		Tempo (dias)		Volume Morto (%preenchimento)		Resultados (%p/p)
	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	
1	10	0	61	0	62,5	0	60,93
2	10	0	61	0	62,5	0	60,41
3	10	0	61	0	62,5	0	61,24
4	40	1	61	0	62,5	0	60,48
5	25	0,5	120	0,866	62,5	0	60,54
6	25	0,5	80	0,289	100	0,817	60,94
7	-20	-1	61	0	62,5	0	61,01
8	-5	-0,5	1	-0,866	62,5	0	60,21
9	-5	-0,5	41	-0,289	25	-0,817	59,84
10	25	0,5	1	-0,866	62,5	0	60,29
11	25	0,5	41	-0,289	25	-0,817	60,06
12	-5	-0,5	120	0,866	62,5	0	59,43
13	10	0	100	0,577	25	-0,817	60,41
14	-5	-0,5	80	0,289	100	0,817	61,66
15	10	0	21	-0,577	100	0,817	61,35

Analisando os resultados da Tabela 4, e compreendendo que o ponto de partida é o resultado de teor de antibiótico obtido no 1º dia (experimentos 8 e 10), de concentração média de 60,25 % p/p, observa-se que nenhum resultado dos experimentos foi crítico durante o período estudado, pois todos ficaram próximos a média do ponto de partida, faixa de 59,43 % p/p no experimento 12 até 61,66 % p/p no experimento 15. Entretanto, os cálculos para avaliação do modelo foram realizados no sentido de observar a estabilidade do antibiótico e em qual extensão (mesmo que reduzida) as três variáveis estudadas afetam a resposta monitorada.

A Tabela 5 mostra o planejamento com os resultados e os coeficientes (b_0 , constante), lineares (b_1 , b_2 e b_3), quadráticos (b_{11} , b_{22} e b_{33}) e de interações (b_{12} , b_{13} e b_{23}).

Tabela 5. Planejamento Doehlert com os coeficientes que foram calculados.

Experimento	b_0	b_1	b_2	b_3	b_{11}	b_{22}	b_{33}	b_{12}	b_{13}	b_{23}	Resultado (%p/p)
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60,93
2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60,41
3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61,24
4	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	60,48
5	1	0,866	0,5	0	0,750	0,250	0	0,433	0	0	60,54
6	1	0,289	0,5	0,817	0,084	0,250	0,667	0,145	0,236	0,409	60,94
7	1	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	61,01
8	1	-0,866	-0,5	0	0,750	0,250	0	0,433	0	0	60,21
9	1	-0,289	-0,5	-0,817	0,084	0,250	0,667	0,145	0,236	0,409	59,84
10	1	-0,866	0,5	0	0,750	0,250	0	-0,433	0	0	60,29
11	1	-0,289	0,5	-0,817	0,084	0,250	0,667	-0,145	0,236	-0,409	60,06
12	1	0,866	-0,5	0	0,750	0,250	0	-0,433	0	0	59,43
13	1	0,577	0	-0,817	0,333	0	0,667	0	-0,471	0	60,41
14	1	0,289	-0,5	0,817	0,084	0,250	0,667	-0,145	0,236	-0,409	61,66
15	1	-0,577	0	0,817	0,333	0	0,667	0	-0,471	0	61,35

5.2 TRATAMENTO DOS DADOS NO OCTAVE

5.2.1 Cálculo do modelo matemático para a resposta do Antibiótico

Para validar o modelo é utilizado a análise de variância (tabela ANOVA), onde são classificados alguns parâmetros do modelo proposto. A soma quadrática da regressão (SQReg) é o somatório do quadrado da diferença entre os valores previstos e a média dos valores obtidos experimentalmente, e possui um número de graus de liberdade igual a quantidade de coeficientes (p) calculados menos 1 ($p-1$), a situação que se almeja é que a SQReg seja mais alta possível. O outro valor que é calculado é a soma quadrática dos resíduos (SQres). A SQres é a somatória do quadrado da diferença entre os valores experimentais e previstos (erro), é o domínio que o modelo calculado não foi capaz de modelar, e possui um número de graus de liberdade igual ao número de experimentos (n) menos o número de coeficientes calculados ($n-p$). A soma quadrática total (SQT) é a soma das duas somas quadráticas antecedentes, assim como o número de graus de liberdade da SQT. E quando o experimento possui réplicas autênticas (verdadeiras) é possível calcular a soma quadrática do erro puro (SQEP). A SQEP é calculada pela somatória do quadrado da diferença entre cada réplica e a média das réplicas, a SQEP nada mais é que o erro aleatório dos experimentos realizados e o número de graus de liberdade é igual a somatória do número de réplicas em cada condição experimental menos 1.

Desse modo, ao subtrair da SQRes a SQEP, o valor obtido mostra a incapacidade do modelo em se ajustar aos pontos experimentais obtidos e é a soma quadrática referente a falta de ajuste (SQfaj), o número de graus de liberdade da SQfaj é igual ao número de experimentos independentes (m), menos o número de coeficientes calculados ($m-p$).

Dividindo cada soma quadrática pelo seu grau de liberdade associado, encontram-se as médias quadráticas (MQ) dos parâmetros do modelo calculado. As MQ são utilizadas para verificar a qualidade do modelo obtido. Para isso, é necessário comparar os valores de variância obtidos (MQ) por meio de teste F. Dividindo a média quadrática da regressão (MQReg) pela média quadrática do resíduo (MQres) obtemos o valor F da regressão. A situação que se almeja é que a MQReg seja maior MQres e que o F obtido com essa divisão deve ser algumas vezes maior (10 vezes) que aquele tabelado para os respectivos graus de liberdade. Desta forma, o esperado é que a MQReg e a MQres sejam estatisticamente

diferentes. Durante a realização desses cálculos foi utilizado o nível de confiança de 95% (p -valor de 0,05).

O outro F calculado é o proveniente da falta de ajuste, que é obtido dividindo-se a média quadrática da falta de ajuste (MQFaj) pela média quadrática do erro puro (MQEP), este deve ser menor que o valor tabelado de F . Assim, o esperado aqui é que essas duas MQ seja estatisticamente iguais, ou seja, o erro aleatório (MQEP) se confunde estatisticamente com a falta de ajuste.

Após realizar os cálculos no Octave, obtiveram-se os seguintes dados demonstrados nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

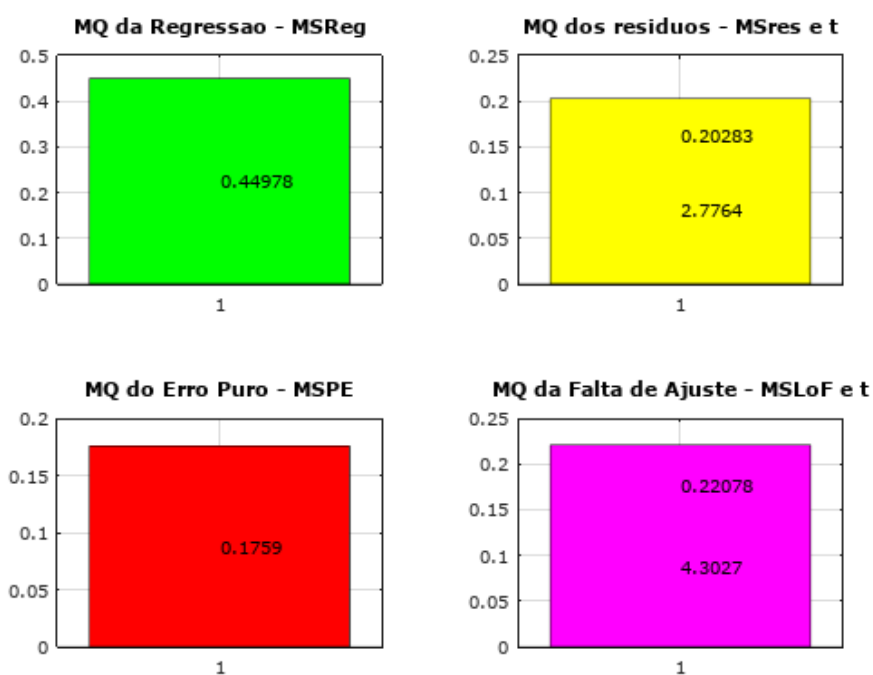


Figura 9. Valores das médias quadráticas do modelo calculado.

Os dados da Figura 9 mostram graficamente alguns aspectos das MQ. As MQReg e MQres, por exemplo foram iguais a 0,45 e 0,20, respectivamente. Os valores de MQEP e MQFaj foram de 0,18 e 0,22, respectivamente. A MQEP foi calculada com base nas 3 réplicas autênticas realizadas (ver experimentos de 1 a 3 na Tabela 5).

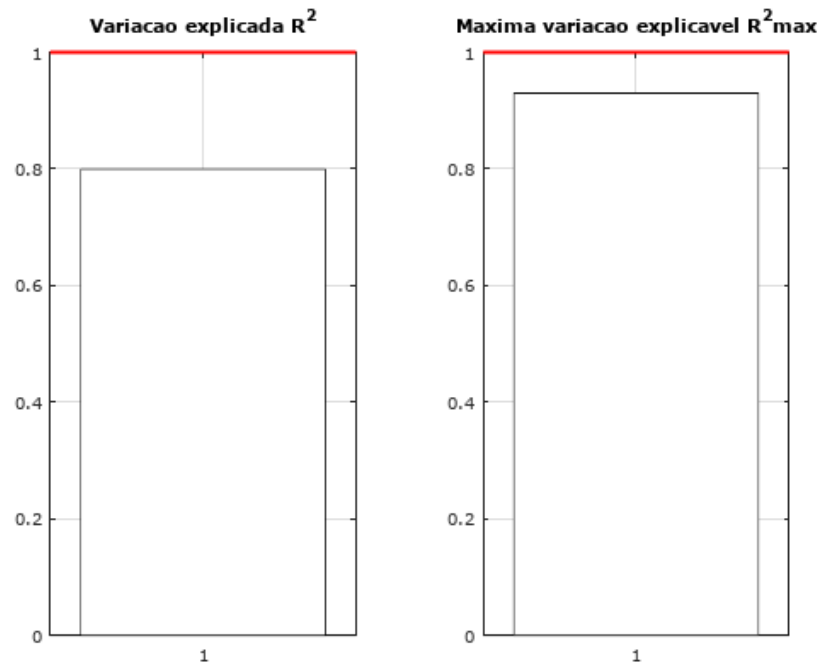


Figura 10. Valores de R^2 e R^2 máximo do modelo calculado.

Os valores de R^2 e R^2 máximo (Figura 10) ficaram em torno de 0,8 e 0,9, respectivamente. A Figura 11 mostra graficamente o valor de F quando as MQReg e MQres são comparadas. Os valores de F calculado e tabelado foram da ordem de 2,2 e 4,8, respectivamente. Isso mostra que as duas MQ são estatisticamente diferentes (situação ideal), porém a diferença não é contundente, evidenciando um modelo com regressão deficiente. Por outro lado (Figura 12) o modelo também não apresenta falta de ajuste, pois as MQFaJ e MQEP são estatisticamente iguais (F calculado $<$ F tabelado).

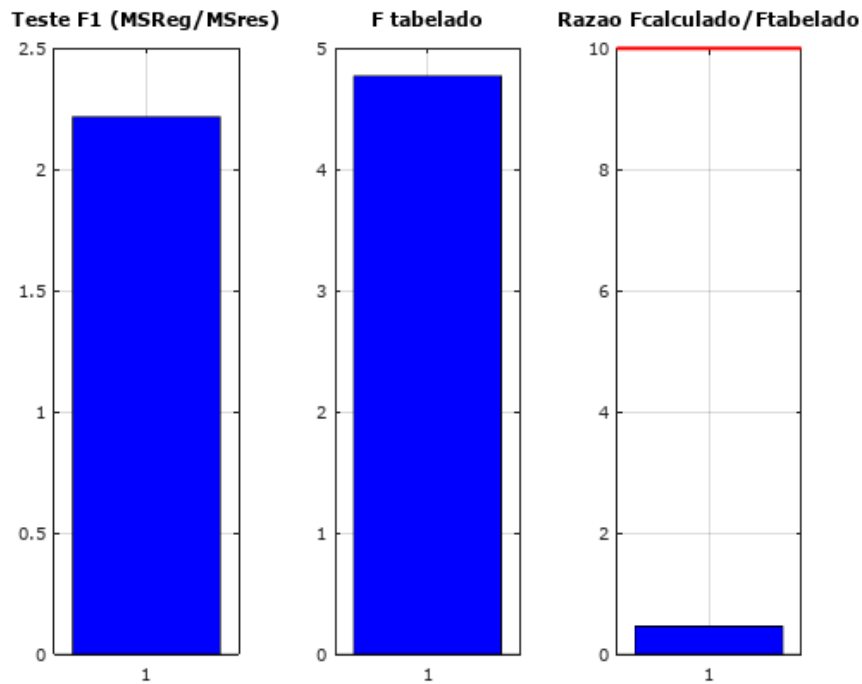


Figura 11. Valores do teste F1 do modelo calculado.

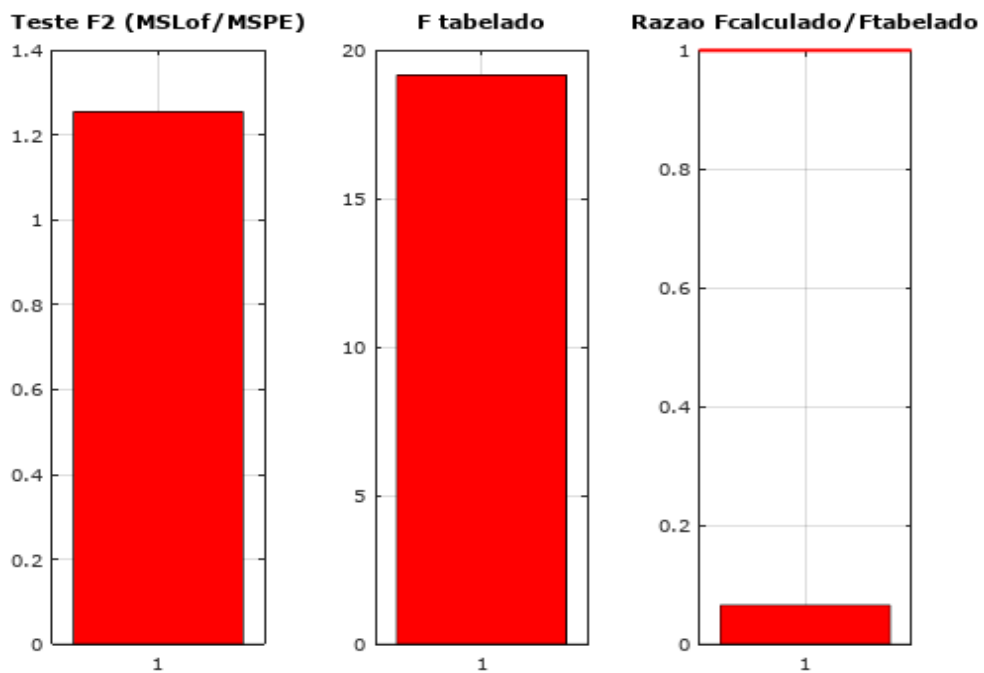


Figura 12. Valores do teste F2 do modelo calculado.

Com as conclusões obtidas anteriormente, foram utilizados os valores da média quadrática dos resíduos (0,20) e seu respectivo valor de t (2,7764) para a determinação dos erros (ver figura 9) e intervalo de confiança dos coeficientes da regressão calculados. As Figura 13 e Figura 14 apresentam os gráficos para os valores experimentais *versus* previstos e os resíduos da regressão, respectivamente.

Já a Tabela 6 mostra os coeficientes, seus intervalos de confiança (IC) e as faixas (mínimo e máximo) de cada um deles.

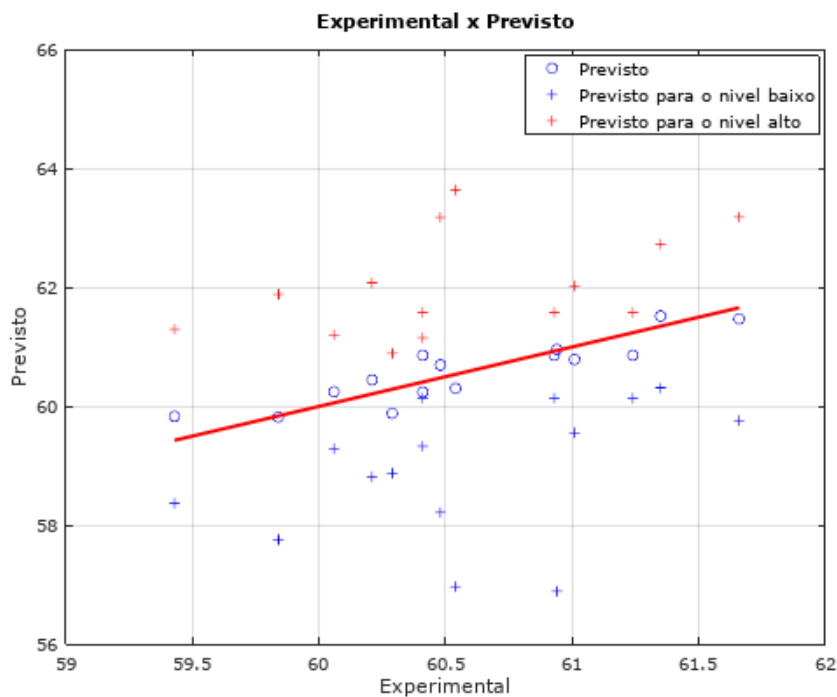


Figura 13. Gráfico dos valores experimentais *versus* previstos do modelo calculado.

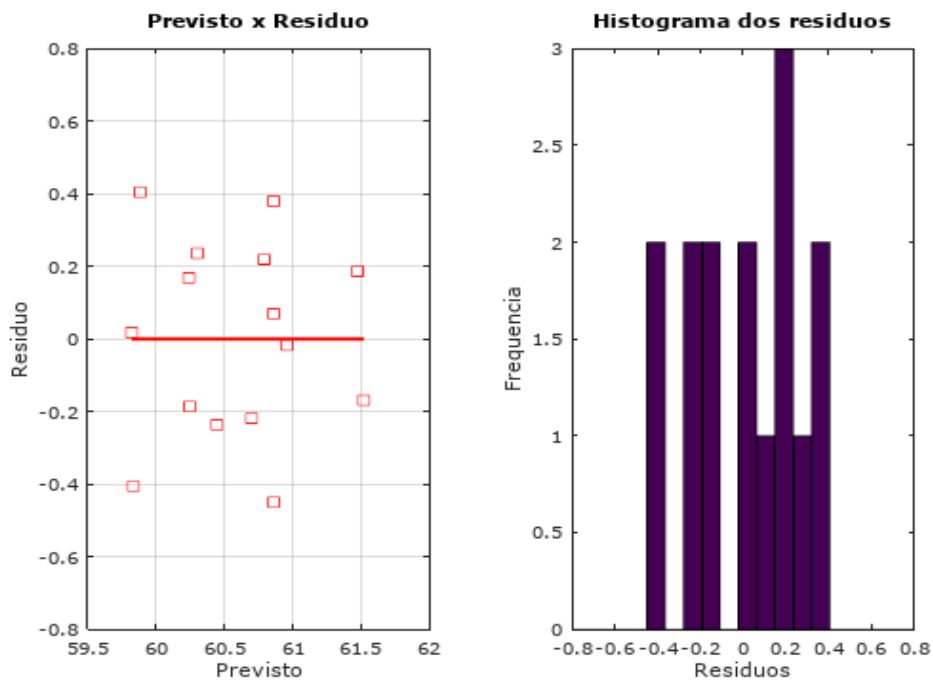


Figura 14. Gráfico dos resíduos do modelo calculado.

Tabela 6 – Valores dos coeficientes do modelo

Coeficiente	Média	Máximo	Mínimo	IC
b_0	60,86	60,14	61,58	0,72
b_1	-0,06	-0,68	0,57	0,62
b_2	-0,05	-0,67	0,58	0,62
b_3	0,74	0,12	1,37	0,62
b_{11}	-0,95	-2,09	0,19	1,14
b_{22}	-0,12	-1,25	1,02	1,14
b_{33}	0,04	-1,04	1,12	1,08
b_{12}	0,59	-0,85	2,04	1,44
b_{13}	-0,66	-2,26	0,95	1,61
b_{23}	-0,79	-2,40	0,82	1,61

Analisando os dados obtidos, verificamos que apenas os coeficientes b_0 e b_3 (relativo ao coeficiente linear do volume morto) 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 15. É importante lembrar que o algoritmo utilizado (Regression2) emprega um nível de confiança de 95% (p-valor de 0,05) (PEREIRA-FILHO, 2018).

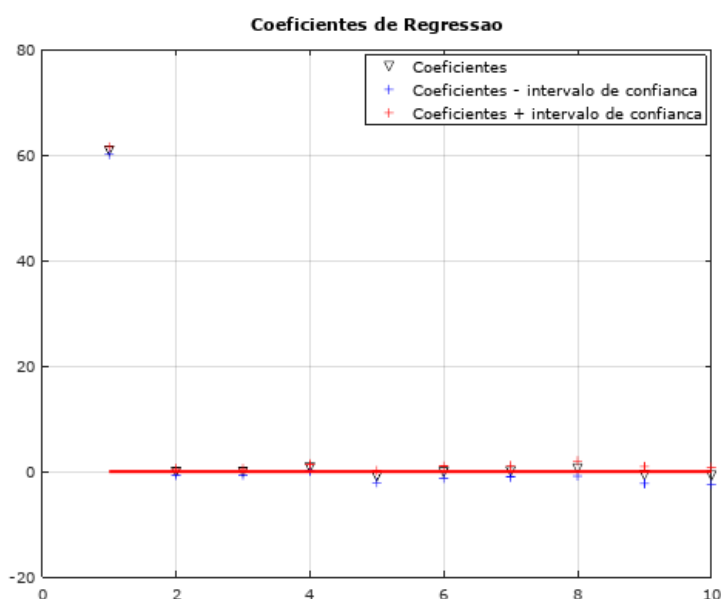


Figura 15. Gráfico dos coeficientes de regressão do modelo para o modelo calculado.

Apesar de estatisticamente a variável volume morto (com o coeficiente b_3) ser significativa para a estabilidade do antibiótico, observa-se que por meio dos resultados dos experimentos, essa influência é negligenciável, chegando impactar no máximo 2% em relação ao resultado inicial (Experimentos 8 e 10). Um aspecto importante é que as demais variáveis (temperatura e tempo) apresentaram influência insignificante no resultado final.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A ferramenta quimiométrica DoE permitiu um entendimento robusto sobre a estabilidade do antibiótico frente ao tempo, temperatura e o volume morto. Apesar do volume morto (% preenchimento) ter sido significativo estatisticamente, entende-se que essa influência foi pequena e perfeitamente aceitável para o processo produtivo.

Além disso, a utilização do DoE permitiu uma otimização dos experimentos, normalmente se fosse realizado um estudo de estabilidade como é feito atualmente na empresa, seriam realizados em torno de 50 experimentos, neste trabalho foram realizados 15 experimentos, ou seja, uma redução de 70% e com melhores respostas do ponto de vista estatístico. A redução dos experimentos engloba:

- Aumento da produtividade dos analistas e foco em resolução de problemas;
- Diminuição na utilização e descartes de reagentes e padrões;
- Diminuição na quantidade de amostras utilizadas para estudos.

O uso do planejamento forneceu evidências científicas da estabilidade do antibiótico, ajudando no questionamento que a empresa tinha sobre tal informação. Assim, foi possível concluir que as variáveis tempo, temperatura e volume morto não impactam na estabilidade do antibiótico estudado nos níveis investigados.

A realização deste projeto de mestrado trouxe benefícios para a empresa, pois para o caso específico do produto acabado no qual é utilizado este antibiótico, a empresa possui interesse em aprimorar a qualidade do mesmo. Além disso, por ser um produto de viabilidade econômica grande para a empresa, pode-se também apontar: tempo de almoxarifado, temperatura de transporte e o volume morto (%preenchimento) não afetam a estabilidade do antibiótico, com essa resposta a empresa decidiu realizar um novo projeto com uma nova formulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.R.M. **Avaliação da resposta óptica decorrente da interação entre antibiótico e nanopartículas de ouro esféricas e em forma de bastão visando aplicação analítica.** 2015. 132f. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre – PUC-Rio, Rio de Janeiro 2015.

BENVENISTE, R e DAVIED, J. **Relações estrutura-atividade entre os antibióticos aminoglicosídeos: papel dos grupos hidroxila e amino .** Antimicrob Agents Chemother , 4 , 402-409, 1973 .

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** Talanta v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008

CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, Departamento de Economia, Administração e Sociologia, ESALQ, perspectivas para o agronegócio em 2022. Disponível em < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniao-cepea/perspectivas-para-o-agronegocio-em-2022.aspx>> Acesso em: Mar. 2023.

DOS SANTOS, W. L.; DOS SANTOS, C. M.; COSTA, J. L.; ANDRADE, H. M.; FERREIRA, S. L. **Multivariate optimization and validation studies in on-line pre-concentration system for lead determination in drinking water and saline waste from oil refinery.** Microchemical Journal, v. 77, n. 2, p. 123-129, 2004.

G.GEETHA, KARANAM NAGA GANIKA RAJU, B. VIGNESH KUMAR and M. GNANA RAJA; analytical method validation: An Updated

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de Dados.** Bookman editora, 2009

I.MOLNÁR-PERL, **HPLC of amino Acids as o-Phthalaldehyde Derivatives,** Journal of Chromatography. Volume 70, Elsevier, 2005, pp 163-198.

MAPA, **Critérios e Procedimentos necessários para as alterações de registro de produto de uso veterinário de natureza farmacêutica e biológica**, RDC nº23. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília, 2016.

MAPA, **Critérios para a realização dos Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFAs), e de medicamentos novos**, RDC nº318. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília, 2019.

MAPA, **Regulamento técnico para testes de estabilidade de produto farmacêutico de uso veterinário**, IN nº15. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasília, 2005

MCPOLIN, B. Y. Oona - **An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis**. Mourn Training Services The. 44:0 (2009) 1–137

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