



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado ao desenvolvimento de métodos
por cromatografia gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina**

Leonardo Guimarães de Oliveira

Toledo – PR, 2021



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado ao desenvolvimento de métodos
por cromatografia gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina**

Leonardo Guimarães de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes

Toledo – PR, 2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Oliveira, Leonardo

Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado ao desenvolvimento de métodos por cromatografia gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina / Leonardo Oliveira; orientador Aparecido Módenes; coorientador Marcos Pereira. -- Toledo, 2021.
112 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

1. Qualidade por Design Analítico (AQbD) . 2. Cromatografia gasosa . 3. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos . 4. Cloridrato de Duloxetina. I. Módenes, Aparecido, orient. II. Pereira, Marcos, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA, APROVADA, APROVA A
DISSERTAÇÃO.

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado ao desenvolvimento de métodos
por cromatografia gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina**

ELABORADOR POR:

Leonardo Guimarães de Oliveira

COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes – UNIOESTE

Prof. Dr. Marcos Donizete Pelicon Pereira - UNESP-ARARAQUARA

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski - UNIOESTE

AGRADECIMENTOS

Durante minha vivência nesse mestrado pude compartilhar de um universo rico em conhecimento, sabedoria e aprendizado, que me acrescentou como profissional e como ser humano. Pude perceber a importância que um mestrado representou na minha jornada, sendo uma das experiências mais incríveis que já tive.

Neste momento, gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me mantido forte durante essa trajetória. A minha noiva Melissa, por todo apoio, ajuda, incentivo, amor e compreensão. Aos meus pais que sempre estiveram do meu lado.

Agradeço ao prof. Dr. Nivaldo por ter me acolhido desde o primeiro encontro e por estar sempre disposto a me guiar, direcionar e a contribuir, sem medir esforços. Aos profs. Drs. Douglas e Marcos, por estarem sempre dispostos a ajudar e por aceitarem o convite de contribuir para com este trabalho.

Chegar aqui é um motivo de muito orgulho, pois passar por inúmeras dificuldades, incertezas e indecisões, e mesmo assim buscar ser melhor, não foi fácil. Mas como diz o ditado “Mar calmo nunca fez um bom marinheiro”, posso dizer que é assim que me sinto em meio a toda dificuldade enfrentada e ainda assim conseguir chegar até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Indústria farmacêutica	14
3.1.1 Contaminantes de medicamentos.....	15
3.1.2 Solventes residuais.....	16
3.1.3 Cloridrato de Duloxetina	16
3.2 Cromatografia em fase gasosa	18
3.2.1 Cromatógrafo a gás	19
3.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos	20
3.4 Qualidade por <i>Design</i> Analítico - <i>Analytical Quality by Design</i> (AQbD).....	22
3.4.1 Estabelecimento do Perfil Analítico Alvo (ATP)	23
3.4.2 Identificação das Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC) 24	
3.4.3 Análise de risco.....	24
3.4.4 Planejamento de experimentos (DoE)	25
3.4.5 Região de Design Operável do Método (MODR).....	26
3.4.6 Estratégia de controle	26
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	28
4.1 Equipamentos	28
4.2 Padrões, reagentes e solventes	28
4.3 Etapas do AQbD.....	29
4.3.1 Apresentação das condições cromatográficas.....	30
4.3.2 Preparo de amostra - Exploratório: descrito no Apêndice I	31
4.4 Método otimizado após a avaliação do planejamento experimental	31
4.4.1 Preparo da Seletividade Otimizada - Apresentado no Apêndice 3.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Etapa 1	34
5.1.1 Definição dos analitos.....	34
5.1.2 Identificação do Perfil Analítico Alvo (ATP).....	39
5.1.3 Planejamento experimental	39
5.1.4 Definição dos fatores primários / Etapa 2 – Processar e analisar os dados da triagem 42	
5.2 Etapa 2.....	48
5.2.1 Identificação das Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC).....	48

5.2.2	Análise de risco (QRM).....	49
5.2.3	Identificação dos Atributos críticos de Qualidade (CQA)	53
5.2.4	Definição dos fatores secundários	54
5.2.5	Criar um DoE da otimização/Realização de novos experimentos – Etapa 3 – Tratamento e processamento de dados.....	54
5.3	Etapa 3.....	55
5.3.1	Estudo teórico de robustez	55
5.3.2	Avaliação empírica das condições obtidas através da otimização.....	56
5.4	Etapa 4.....	57
5.4.1	Validação da metodologia proposta	57
5.4.2	Definição do Região de Design operável do Método (MODR);.....	71
5.4.3	Estratégia para controle.....	91
5.4.4	Monitoramento/ciclo de vida contínuo gestão	91
6.	CONCLUSÃO	93
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
8.	REFERÊNCIAS	95
9.	ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS.....	99
Apêndice 1.....		99
	Preparo de amostra - Exploratório	99
	<input type="checkbox"/> Procedimento analítico	100
	<input type="checkbox"/> Critérios de aceitação.....	100
Apêndice 2.....		101
	Preparo de amostras Otimizado – linearidade, precisão, exatidão e robustez	101
Apêndice 3.....		103
	Seletividade Otimizada	103
Apêndice 4.....		108
	Procedimento analítico.....	108
	Cálculos	108
	Especificação.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPC** – Características de Desempenho do Método Analítico – do inglês, *Analytical Method Performance Characteristics*
- ANOVA** – Análise de Variância
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOAC** – Associação Oficial de Químicos Analíticos – do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
- AQbD** – Qualidade por *Design* Analítico – do inglês, *Analytical Quality by Design*
- ATP** – Perfil Analítico Alvo – do inglês, *Analytical Target Profile*
- CCD** – Delineamento de controle central– do inglês, *Control Central Design*
- CG** – Cromatógrafo Gasoso
- cGMPs** – Boas práticas de fabricação de controle farmacêutico – do inglês, *Pharmaceutical Control Good Manufacturing Practices*
- CMA** – Atributos Críticos do Material – do inglês, *Critical Material Attributes*
- CPP** – Parâmetros Críticos do Processo – do inglês, *Critical Process Parameters*
- CQA** – Atributos Críticos de Qualidade – do inglês, *Critical Quality Attributes*
- DoE** – Planejamento de Experimentos – do inglês, *Design of Experiments*
- DOQ** – Documento de Caráter Orientativo
- DPR** – Desvio Padrão Relativo
- DS** - Região Operacional – do inglês, *Design Space*
- DXH** – Cloridrato de Duloxetina
- ECD** – Detector por Captura de Elétrons – do inglês, *Electron Capture Detector*
- EMA** - Agência Europeia de Medicamentos – do inglês,
- FDA** – Administração de Alimentos e Medicamentos – do inglês, *Food and Drug Administration*
- FID** – Detector de Ionização em Chama – do inglês, *Flame Ionization Detector*
- FMEA** – Análise do Efeito do Modo de Falha – do inglês, *Failure Mode and Effect Analysis*
- FPD** – Detector por Fotométrico de Chama – do inglês, *Flame Photometric Detector*
- HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- ICH** – Conferência Internacional de Harmonização – do inglês, *International Conference on Harmonisation*
- IFA** – Insumo Farmacêutico Ativo
- INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- IR** – Espectrofotômetro de Infravermelho – do inglês, *Infrared Spectrophotometer*

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada – do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LOD – Limite de Detecção – do inglês, *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação – do inglês, *Limit of Quantification*

MODR – Região de Design Operável do Método – do inglês, *Method Operable Design Region*

MS – Espectrometria de Massas – do inglês, *Mass Spectrometry*

OFAT – Um fator de cada vez – do inglês, *One Factor At Time*

OOS – Out of Specification

OOT – Out of Trend

PA – Produto Acabado

PAT – Tecnologia Analítica de Processo – do inglês, *Process Analytical Technology*

QbD – Qualidade por *Design* – do inglês, *Quality by Design*

QRM – Análise de risco – do inglês, *Quality Risk Management*

QTPP – Perfil de Qualidade Alvo do Produto – do inglês, *Quality Target Product Profile*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RS – Superfície de Resposta – do inglês, *Response Surface*

SNRI – Inibidor de Recaptação de Serotonina e Norepinefrina – do inglês, *Serotonin and Norepi-nephine Reuptake Inhibitor*

TCD – Detectores por Condutividade Térmica – do inglês, *Thermal Conductivity Detector*

USP – Convenção da Farmacopeia dos Estados Unidos – do inglês, *United States Pharmacopeia Convention*

UV – Ultravioleta

VIF – Fatores de inflação da variância

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Sistema cromatográfico exploratório
- Tabela 02:** Condições de temperatura do forno exploratório
- Tabela 03:** Sistema cromatográfico otimizado (condição validada)
- Tabela 04:** Condições da temperatura do forno otimizadas (condição validada)
- Tabela 05:** Condições do *Headspace Transferline* otimizadas (condição validada)
- Tabela 06:** Analitos controlados no certificado analítico dos fabricantes
- Tabela 07:** Solubilidade da matéria-prima
- Tabela 08:** Características físico-químicas de todos analitos a serem controlados
- Tabela 09:** Resultados de coluna
- Tabela 10:** Divisão de métodos
- Tabela 11:** Definição do Perfil Analítico Alvo (ATP)
- Tabela 12:** Condições de *Headspace Transferline* avaliadas no Planejamento Plackett-Burman (Planejamento fatorial exploratório)
- Tabela 13:** Desejabilidade global de área e recuperação da 40% e 240%
- Tabela 14:** Desabilidade global das áreas
- Tabela 15:** Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC)
- Tabela 16:** Análise de risco (QRM) por FMEA
- Tabela 17:** Ação preventiva baseada nos riscos médios e altos
- Tabela 18:** Atributos críticos de qualidade (CQA's)
- Tabela 19:** Plotagem do modelo de diagnóstico
- Tabela 20:** Tempos de retenção e resolução dos analitos de interesse na Solução Seletividade Teste de todos os fabricantes
- Tabela 21:** Resultados da avaliação da linearidade de Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol
- Tabela 22:** Relação sinal/ruído
- Tabela 23:** Precisão e exatidão – Metanol
- Tabela 24:** Precisão e exatidão – Acetona
- Tabela 25:** Precisão e exatidão – Diclorometano
- Tabela 26:** Precisão e exatidão – 2-Propanol
- Tabela 27:** Precisão e exatidão – Terc-butanol
- Tabela 28:** Avaliação dos resultados de robustez de coluna e estabilidade
- Tabela 29:** Planejamento CCD

Tabela 30: Análise de variância do Metanol

Tabela 31: Análise de variância da Acetona

Tabela 32: Análise de variância do 2-Propanol

Tabela 33: Análise de variância de Diclorometano

Tabela 34: Análise de variância de Terc-butanol

Tabela 35: Ajuste estatístico – Metanol

Tabela 36: Ajuste estatístico – Acetona

Tabela 37: Ajuste estatístico – 2-Propanol

Tabela 38: Ajuste estatístico – Diclorometano

Tabela 39: Ajuste estatístico – Terc-butanol

Tabela 40: Coeficientes em termos de fatores codificados – Metanol

Tabela 41: Coeficientes em termos de fatores codificados – Acetona

Tabela 42: Coeficientes em termos de fatores codificados – 2-Propanol

Tabela 43: Coeficientes em termos de fatores codificados – Diclorometano

Tabela 44: Coeficientes em termos de fatores codificados – Terc-butanol

Tabela 45: Preparo das soluções da linearidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura do Cloridrato de Duloxetina

Figura 02: Produtos de degradação gerados após as condições de estresse aplicado

Figura 03: Esquema do cromatógrafo a gás

Figura 04: Exemplo de aplicação do Diagrama de Ishikawa empregando todas as características de desempenho do método analítico

Figura 05: Fluxograma da tomada de decisão no desenvolvimento analítico

Figura 06. Gráfico de probabilidade global de cada efeito da desejabilidade

Figura 07. Gráfico representativo da porcentagem que cada efeito tem sobre a resposta da desejabilidade

Figura 08. Gráfico de probabilidade baseado na desejabilidade das áreas

Figura 09. Gráfico de porcentagem baseado na desejabilidade das áreas

Figura 10. Diagrama de Ishikawa obtido para AMPC

Figura 11. Cromatograma da solução seletividade com e sem ampliação nos analitos de interesse

Figura 12: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Metanol

Figura 13: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) da Acetona

Figura 14: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do 2-Propanol

Figura 15: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Diclorometano

Figura 16: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Terc-butanol.

Figura 17: Gráfico de superfície de resposta e gráfico de contorno, com a sequência dos analitos Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol.

Figura 18: Gráfico de desejabilidade

Figura 19: Gráfico de perturbação para cada analito e desejabilidade

Figura 20: Gráfico de desejabilidade entre as superfícies de respostas sobrepostas

Figura 21: Espaço do *Design* operável ótimo com ampliação

QUALIDADE POR *DESIGN* ANALÍTICO (AQbD) APLICADO AO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA NA MATÉRIA-PRIMA CLORIDRATO DE DULOXETINA

Leonardo Guimarães de Oliveira

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo aplicar o Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) no desenvolvimento e validação de método analítico de solventes residuais por cromatografia gasosa com injeção *Headspace transferline* da matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina. Foi realizado otimização multivariada do método analítico, para o controle dos solventes residuais metanol, acetona, 2-propanol, diclorometano, terc-butanol, Acetato de etila, Clorofórmio, Trietilamina, Dimetilsulfóxido, Ciclohexano e Tolueno com a aplicação de planejamentos experimentais que visam o atendimento dos objetivos, características e critérios de qualidade. A execução foi conduzida por etapas que podem ser resumidas em triagem, otimização, avaliação dos dados, validação e controle estratégico. Na triagem, o planejamento experimental de *Plackett-Burman* foi aplicado de maneira a definir as melhores condições de utilização de *Headspace transferline*, permitindo maximização do sinal e recuperação próximos a 100% dos analitos. Contudo, houve a divisão dos analitos a serem controlados, e assim optados por apresentar validação de solventes residuais Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol. Já na etapa de otimização foram realizadas as identificações das Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC), Atributos Críticos de Qualidade (CQA) e Análise de Risco (QRM) e finalização com a aplicação do delineamento de composto central (CCD) para a definição da região de *design* operável do método (MODR). Procedeu-se para a avaliação dos resultados, em que os dados foram processados e avaliados, permitindo a realização de ajustes necessários ao método. A etapa de validação analítica foi realizada conforme RDC 166/2017, obtendo um método preciso, linear, seletivo, robusto e limite de quantificação. A MODR foi definida após a variação dos fatores temperatura inicial do forno e fluxo de gás de arraste, obtendo as regiões de *design* que vai de 29,3 a 31,1 °C e 0,9 a 1,03 mL.min⁻¹, respectivamente. Por fim, os resultados a maximização da resposta analítica e recuperação próxima a 100%, garantindo a operacionalidade e a flexibilidade regulatória permitindo ajustes imediato do método analítico. A determinação da sensibilidade/Limite de quantificação analítica no nível 40% para os analitos Metanol, Acetona, Terc-butanol, 2-propanol e Diclorometano em um teor de 1197,50, 1995,58, 398,16, 1997,84 e 239,26 µg.g⁻¹, respectivamente. A aplicação

do AQbD possibilitou a mudança de paradigma por meio de uma abordagem multivariável com a utilização de ferramentas da qualidade, as quais demonstram pontos importantes no desenvolvimento e validação de um método analítico ao identificar e mitigar os pontos de fragilidade.

Palavras-chave: AQbD; Qualidade; Métodos analíticos, Cromatografia em fase gasosa; Cloridrato de duloxetina.

ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN (AQbD) APPLIED IN THE DEVELOPMENT OF GAS CHROMATOGRAPHIC METHODS ON RAW MATERIAL DULOXETINE HYDROCHLORIDE

Leonardo Guimarães de Oliveira

ABSTRACT

This work aimed to apply Quality by Analytical Design (AQbD) in the development and validation of an analytical method of residual solvents by gas chromatography with Headspace transferline injection of the raw material of Duloxetine Hydrochloride. Multivariate optimization of the analytical method was performed to control residual solvents methanol, acetone, 2-propanol, dichloromethane, tert-butanol, Ethyl acetate, Chloroform, Triethylamine, Dimethylsulfoxide, Cyclohexane and Toluene with the application of experimental designs aimed at meeting the objectives, characteristics and quality criteria. The execution was carried out in stages that can be summarized as screening, optimization, data evaluation, validation and strategic control. In screening, the Plackett-Burman experimental design was applied in order to define the best conditions for the use of Headspace transferline, allowing signal maximization and recovery close to 100% of the analytes. However, there was a division of the analytes to be controlled, and thus opted to present validation of residual solvents Methanol, Acetone, 2-Propanol, Dichloromethane and Tert-butanol. In the optimization stage, the identification of the Performance Characteristics of the Analytical Method (AMPC), Critical Quality Attributes (CQA) and Risk Analysis (QRM) were carried out and finalized with the application of the central composite design (CCD) for the definition of the method operable design region (MODR). The results were evaluated, in which the data were processed and evaluated, allowing the necessary adjustments to be made to the method. The analytical validation step was performed according to RDC 166/2017, obtaining a precise, linear, selective, robust method and limit

of quantification. The MODR was defined after varying the kiln initial temperature and carrier gas flow factors, obtaining design regions ranging from 29.3 to 31.1 °C and 0.9 to 1.03 mL.min⁻¹, respectively. Finally, the results are maximized analytical response and recovery close to 100%, ensuring operability and regulatory flexibility allowing immediate adjustments to the analytical method. The determination of the sensitivity/Limit of analytical quantification at the 40% level for the analytes Methanol, Acetone, Tert-butanol, 2-propanol and Dichloromethane at a content of 1197.50, 1995.58, 398.16, 1997.84 and 239.26 µg.g⁻¹, respectively. The application of AQbD enabled the paradigm shift through a multivariable approach with the use of quality tools, which demonstrate important points in the development and validation of an analytical method to identify and mitigate weak points.

Key-words: AQbD; Quality; Analytical methods; Gas chromatography; duloxetine hydrochloride.

1. INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica exerce grande impacto no cenário mundial devido a sua importância na manutenção da vida e na economia. O desenvolvimento de um medicamento abrange diferentes etapas, dentre elas o desenvolvimento do processo de formulação *in vitro*, *in vivo*, ensaios pré-clínicos fase I, II, III e IV, viabilidade e em escala industrial e testes de estabilidade. [1]

Os solventes orgânicos são substâncias que podem ser utilizadas na fabricação de um medicamento como insumo farmacêutico ativo ou como modificador da qualidade para a substância. A remoção destes solventes orgânicos pode ser feita por meio de técnicas químicas, como adição de agentes extrator, e físicas, como aquecimento ou destilação. Seu controle é imprescindível uma vez essas impurezas são remanescentes da síntese. [2-3]

Durante o processo de obtenção de uma matéria-prima ocorre a adição de agentes químicos que são necessários para o processo de síntese do Insumo farmacêutico ativo (IFA). Desta forma, por conhecermos o processo e os agentes adicionados, temos que garantir que o resultado final seja de um produto que atenda com segurança e eficácia. O IFA utilizado neste trabalho foi o Cloridrato de Duloxetina e junto a ele a definição da estratégia de controle adequada para o controle dos agentes químicos, e neste caso vamos controlar os solventes residuais que podem estar presente na matéria-prima.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre a validação do métodos analíticos e exige como parâmetros a serem adotados na documentação a seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. [4]

A ANVISA estabelece critérios rígidos diante da avaliação e aprovação de fármacos a fim de garantir a integridade de dados analíticos e rastreabilidade de seus ensaios para a comprovação de resultados. Com isso, são necessárias metodologias analíticas que buscam atender com confiabilidade toda esta criticidade exigida e constante investimento em novas técnicas analíticas para maior atendimento satisfatório. [5]

O desenvolvimento e validação de um determinado procedimento analítico almejam demonstrar a obtenção de método e que o mesmo seja reproduzido seguindo critérios de desempenho e especificações descritos na metodologia. O estudo realizado deve ser devidamente documentado, visando garantir a qualidade metrológica,

rastreabilidade dos dados, qualidade em seus resultados analíticos para as tomadas de decisões, e garantia de um método adequado. [6-8]

A técnica de cromatografia gasosa com Detector de Ionização em Chama (FID) se trata de uma das técnicas que vem sendo frequentemente abordada na determinação de traços de solventes orgânicos voláteis, que tem como princípio uma separação baseada na interação da sua fase móvel, sendo ela o hélio sob uma fase estacionária com característica (polar, apolar ou média polaridade), preferencialmente solventes de baixa temperaturas de ebulição, baixa massa molar e alta pressão de vapor. [9]

Ao adotar esta técnica cromatográfica para o controle deve ser realizado o desenvolvimento do método a ponto de identificar a melhor condição analítica a serem utilizadas durante a validação analítica, esta etapa contempla o tratamento e avaliação dos resultados obtidos a partir do método proposto, onde o esperado é o atendimento dos parâmetros de qualidade. [7-9]

Durante o desenvolvimento e validação foi aplicado a abordagem Qualidade por *Design* Analítico (AQbD – Do inglês, *Analytical Quality by Design* (AQbD)), este conceito é baseado no estudo da arte, definições estratégias a partir da análise de risco, análise da superfície de resposta, elaborar um modelo de planejamento de experimentos (DoE), validação do método analítico, tendo como ganho a flexibilidade regulatória e ajuste do modelo. Desta forma, vamos promover a redução de custos, tempo de análise e consumo por solventes. [10]

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aplicar o Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) no desenvolvimento de método de solventes residuais por cromatografia em fase gasosa aplicados na matéria-prima Cloridrato de Duloxetina.

2.2 Objetivos específicos

Definir o estado da arte, realizando um estudo aprofundado sobre o fármaco, diluente e solventes residuais;

Elaborar uma análise de risco (QRM) baseada no Diagrama de Ishikawa e Modo de Falha e Análise de Efeito (FMEA) com a definição de estratégias para o controle de risco.

Elaborar uma análise de superfície de resposta e contorno a partir dos dados do Planejamento de Experimentos (DoE);

Validar a robustez de modo a definir uma região de ótima (MODR), garantindo a flexibilidade regulatória;

Validar a metodologia proposta de maneira que atenda a quantificação satisfatória dos analitos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria farmacêutica

Dentre os setores industriais de maior relevância no cenário mundial, destaca-se a indústria farmacêutica, sendo ela a responsável pela produção, distribuição, e comercialização de medicamentos. Para o melhor atendimento da saúde mundial tem-se um elevado investimento financeiro para a pesquisa, desenvolvimento e inovação de novos produtos, com o emprego de alta tecnologia, e mão de obra qualificada, com o objetivo de entregar ao consumidor produtos com qualidade, segurança e eficácia para o tratamento e controle de doenças. [1,11]

A busca pela inovação é o que move essa indústria que atinge um público cada vez mais exigente e necessitado, logo o setor da pesquisa e desenvolvimento é responsável por um elevado número de patentes registradas, visto que o desenvolvimento de novos medicamentos produz lucros para a indústria. No Brasil o setor farmacêutico representa um faturamento anual em torno de 10,3 bilhões de dólares devido ao consumo de produtos oriundos da indústria farmacêutica, encontrando-se entre os dez maiores consumidores mundiais. [1]

Para que haja a comercialização de um medicamento, o mesmo passa por etapas necessárias para garantir a qualidade do fármaco, sendo elas a pesquisa de moléculas biologicamente ativas, produção em escala industrial, bem como o processamento final. [1,12] O efeito terapêutico do medicamento no organismo ocorre devido ao fármaco, que é a principal substância da formulação do medicamento, sendo, portanto, o princípio ativo da forma terapêutica. Além do fármaco, substâncias farmacologicamente inativas denominadas de excipientes também fazem parte da composição dos medicamentos, auxiliando na eficácia do princípio ativo. Estima-se que a cada 10000 moléculas sintetizadas nas fases iniciais das pesquisas, apenas uma chega a fase final com a função de princípio ativo. [12] Além do mais, para desenvolver um fármaco são necessários investimentos milionários ou bilionários por meio da indústria farmacêutica responsável, resultando em vários anos de pesquisa até uma conclusão satisfatória. [11] Antes da evolução da síntese orgânica, os compostos químicos com funções farmacológicas eram majoritariamente obtidos de fontes naturais. Porém, com o desenvolvimento das tecnologias relacionadas a síntese orgânica, aliado com a busca por melhor custo benefício, fez com que os produtos naturais bioativos fossem substituídos por compostos sintéticos. Assim, a indústria farmacêutica é responsável pela fabricação de substâncias químicas através de sínteses química para o preparo de medicamentos,

abrangendo a fabricação de especialidades farmacêuticas (alopáticas e homeopáticas) de acordo com as classes terapêuticas. [11,13]

Logo, a pureza do produto final está relacionada com sua rota sintética, no qual o fabricante do medicamento tem por responsabilidade em estipular um controle adequado de suas impurezas ao longo do procedimento realizado. Dessa forma, as inovações realizadas pelo setor de pesquisas almejam redução do número de etapas reacionais, empregando reagentes e solventes de baixo custo, com menor toxicidade, além de redução da quantidade de resíduos. [14-15]

3.1.1 Contaminantes de medicamentos

Devido ao elevado número de reagentes e solventes envolvidos no processo de síntese, há uma pequena parcela de impurezas remanescentes da síntese que podem permanecer. [2] Assim, almeja-se identificar estratégias que busquem minimizar e controlar a presença de traços de solventes orgânicos e impurezas que possam prejudicar a qualidade do produto final.

Nesse contexto, as agências regulatórias fornecem orientações e estratégias de como lidar com as dificuldades apresentadas pelas impurezas. Dentre os principais guias para esse propósito, tem-se em âmbito internacional Conferência Internacional de Harmonização (ICH - do inglês, *International Conference on Harmonization*) e FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). No contexto nacional, destacam-se as normas da ANVISA. As diretrizes estabelecidas pela ANVISA estão em concomitância com as internacionais, em que exige-se dos fabricantes de medicamentos o cumprimento das normas relacionadas a presenças de impurezas, além de especificar limites aceitáveis para impurezas. [16-17]

De acordo com os guias do ICH, as impurezas que podem estar presente nos medicamentos classificam-se em diferentes categorias, que são as inorgânicas, orgânicas, e solventes residuais, sendo que podem ter sua origem em diversas etapas, desde a matéria prima utilizada, até por meio de reações químicas secundárias que podem ocorrer no decorrer do processo. Além disso, muitos fármacos são descritos na literatura como influenciados pela temperatura, umidade, pH, luz, e gases presentes no ambiente, originando produtos de degradação secundários. [16]

O guia ICH-Q3A(R2) descreve as impurezas inorgânicas como resultado da utilização de metais, catalisadores, sais inorgânicos, ligantes e outros materiais. Já as impurezas orgânicas podem ser originadas dos materiais de partida, produtos de degradação e intermediários, além dos demais reagentes. Por fim, as impurezas

relacionadas aos solventes correspondem aos líquidos orgânicos e inorgânicos utilizados no procedimento da síntese. [16]

O guia Q3B (ICH, 2006) dispõe em suas diretrizes que todas as classes de impurezas devem ser controladas, sendo que a técnica analítica escolhida deve ser sensível e seletiva para possibilitar a detecção de baixas concentrações. Logo, para a escolha da técnica adequada, é necessário conhecer as características das moléculas que serão avaliadas, bem como a classe em que a impureza se classifica. [16]

3.1.2 Solventes residuais

No processo de síntese de um Insumo farmacêutico ativo (IFA) vários solventes orgânicos podem ser utilizados, com a finalidade de melhorar o rendimento ou atribuir características uma estrutura cristalina de interesse, a pureza e a solubilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA), como forma de atender aos critérios de qualidade.

De acordo com Nagpal *et al.*, (2011), os solventes utilizados nas rotas sintéticas da produção de medicamentos podem ser classificados em três categorias, sendo elas a classe 1 que corresponde aos solventes que devem ser evitados por serem tóxicos, em que fazem parte o benzeno, tetracloreto de carbono, 1,2 dicloroetano, entre outros. Os solventes da classe 2 são considerados de uso limitado por apresentarem uma toxicidade inerente, e incluem metanol, acetonitrila, hexano, entre outros. Já a classe 3 abrange os solventes que apresentam baixa toxicidade, tais como o ácido acético, ácido fórmico, acetona, entre outros. A toxicidade se refere a sobredosagem de algo que possa prejudicar a saúde, que se refere a reações tóxicas graves, muitas vezes nocivas e algumas vezes fatais. Com isso, o mais indicado em um processo de fabricação do Insumo farmacêutico ativo (IFA) são os solventes classe 3, pois é o que traz o menor risco aos seres humanos, estando ele dentro da concentração estipulada pela legislação. [3]

3.1.3 Cloridrato de Duloxetina

A Duloxetina(+)-(S)-N-metil-3-(1-naftiloxi)-3-(tiofen-2-il)-propan-1-amina é um fármaco inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina, (SNRI, do inglês, *serotonin and norepi-nephine reuptake inhibitor*). É utilizado especialmente no tratamento de transtornos depressivos e ansiedade, porém também é empregado no alívio de dores musculoesqueléticas crônicas, neuropáticas periféricas e fibromialgia. Existem evidências também que atua no tratamento de incontinência urinária. [18-19]

Comumente, pode ser encontrado na forma de Cloridrato de Duloxetina (DXH) e é comercializado com o nome Cymbalta®, com seu uso autorizado pela FDA desde agosto de 2004. [20] É considerado um medicamento alternativo para o tratamento de sintomas de

depressão. Apresenta várias vantagens sobre outros antidepressivos comumente utilizados, como a fluoxetina e a tomoxetina, tais como como eficácia aprimorada, tolerabilidade, segurança, recuperação mais rápida, menos efeitos colaterais, baixa afinidade para receptores neuronais e natureza de inibição dupla. [21-22]

O Cloridrato de Duloxetina apresenta fórmula molecular empírica $C_{18}H_{19}NOS.HCl$, com massa molecular de $333,38 \text{ g mol}^{-1}$. [22] A FIG. 01 apresenta a estrutura química do Cloridrato de Duloxetina. É caracterizado por ser um composto altamente lipofílico com fortes propriedades de base e um pK_a de 9,5. [23] Evidências sugerem que ele possui propriedades físico-químicas aceitáveis e ativos biofarmacêuticos em termos de peso molecular ($333,38 \text{ g/mol}$), $\log P$ (3,84), solubilidade aquosa (5 mg/mL) e ponto de fusão ($162-162 \text{ °C}$). [24] Vale ressaltar que a Duloxetina possui um enantiômero (*R*), porém ele é farmacologicamente inválido e não usado clinicamente. [21]

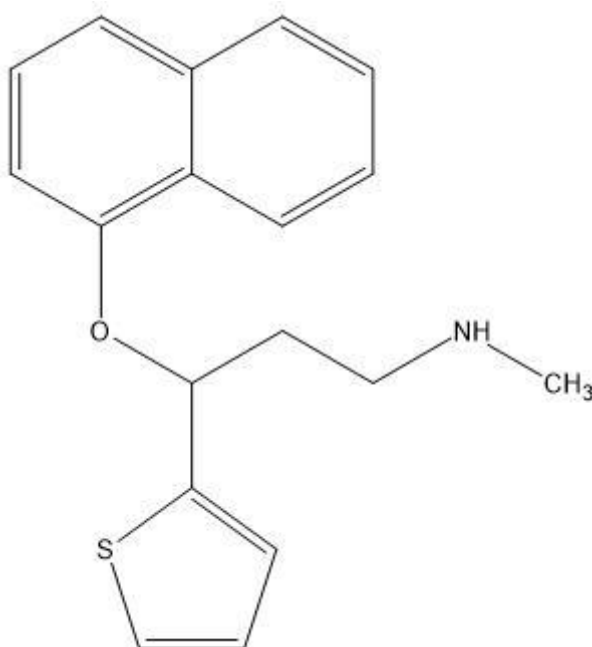


Figura 01: Estrutura do Cloridrato de Duloxetina.

A pureza de um medicamento é determinada com base na porcentagem da quantidade rotulada de ingrediente farmacêutico ativo encontrada nele por meio de um método analítico adequado. De acordo com Datar *et al.*, (2014), impurezas fenólicas já foram relatadas em sua composição, sendo identificadas por técnicas de espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, e análise de raios-X. [23-24]

Chadha *et al.*, (2016) realizaram um estudo de degradação da duloxetina e constataram que ela foi altamente suscetível à degradação hidrolítica e (ou) fotolítica sob condições ácidas, alcalinas e neutras. Foram identificados dezessete produtos de degradação. As posições mais susceptíveis de degradação na molécula foram a função

amina secundária, a ligação do éter naftilo e o anel tiofeno. Além disso, o anel naftaleno também mostrou ser propenso a oxidação fotocíclica na quinona correspondente. [25]

Datar *et al.*, (2014) identificaram cinco produtos de degradação na duloxetina, e constataram que ela é altamente sensível à degradação ácida e fotocíclica, porém é estável em calor e condições oxidativas. [23]

Na FIG. 02, pode-se observar que todos os possíveis produtos de degradação gerados do Cloridrato de Duloxetina são controladas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplado ao Espectrometro de massa de tempo de voo (MS/TOF).

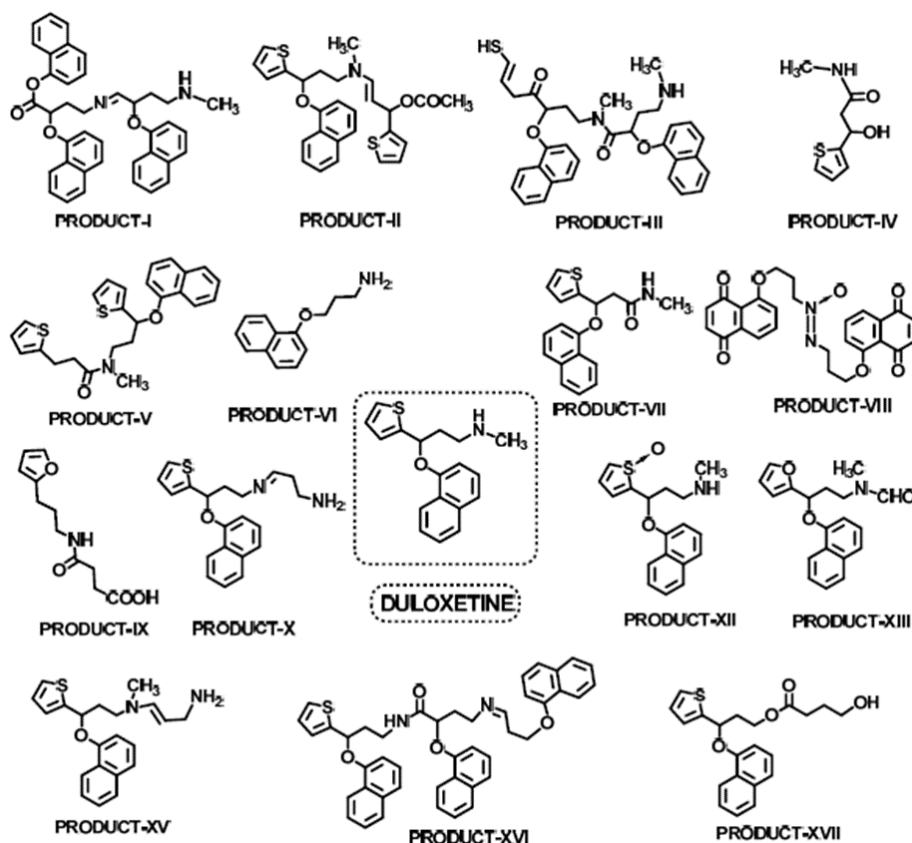


Figura 02: Produtos de degradação gerados após as condições de estresse aplicado
Fonte: Chadha *et al.*, (2006)

3.2 Cromatografia em fase gasosa

A cromatografia consiste de um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato, na qual uma das fases permanece estacionária e a outra passa através da primeira, resultando na separação dos componentes. O mecanismo de separação envolvido na técnica cromatográfica, bem como o tipo de fase estacionária utilizado, define o tipo de cromatografia. Os mecanismos mais comuns são por adsorção, bioafinidade, exclusão, partição e troca iônica pela diferença de polaridade das substâncias [26]

A cromatografia em fase gasosa consiste em uma modalidade cromatográfica em que substâncias voláteis ou volatilizáveis podem ser separadas, sendo assim, os compostos da amostra devem apresentar baixo ponto de ebulição. A fase móvel que tem por finalidade transportar as moléculas que devem ser separadas, é um gás chamado de gás de arraste, e a fase estacionária pode ser líquida ou sólida. [7]

O desenvolvimento da técnica dá-se por meio de eluição. Várias substâncias de uma mesma amostra podem ser analisadas por essa técnica. Caracteriza-se por apresentar um excelente poder de resolução, ser uma técnica rápida, sensível e simples.

3.2.1 Cromatógrafo em fase gasosa

O cromatógrafo a gás é geralmente constituído por um reservatório de gás, um injetor, coluna, forno, detector e equipamento de registro de dados. A FIG. 03 representa um esquema básico do funcionamento de um cromatógrafo a gás.

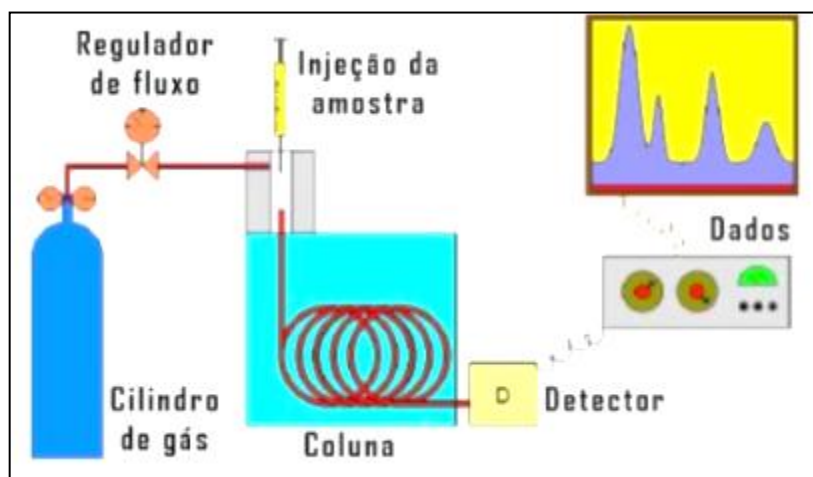


Figura 03: Esquema do cromatógrafo a gás.

Fonte: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>

A volatilização da amostra acontece no injetor e a separação na coluna, pois os constituintes da amostra são transportados através desta e as diferentes interações de cada analito com a fase estacionária levam a separação. Após a separação os analitos passam pelo detector que produz um sinal para o sistema de registro e tratamento de dados. [7, 26]

A injeção da amostra dissolvida no solvente ocorre por meio de um injetor, que normalmente trata-se de uma seringa ou válvula, que pode ocorrer de forma automática ou manual. Para colunas capilares, os principais injetores utilizados são os do modo *split* e *splitless*. Normalmente, utiliza-se o modo *split* para amostras concentradas, sendo que a amostra que foi injetada é dividida entre a coluna e a saída para descarte. Já o modo

splitless é mais utilizado para amostras diluídas, sendo que toda amostra entra na coluna. [26-27]

O gás de arraste deve ser inerte e puro, e somente transportar os analitos sem interagir com eles. O tipo de detector disponível irá influenciar na sua escolha, sendo que os gases mais comumente empregados são o hélio, o hidrogênio e o nitrogênio. [7]

A amostra é levada para a coluna após a injeção, que é considerada a principal parte do cromatógrafo, visto que é onde ocorrerá a separação dos componentes. As colunas podem ser capilares ou empacotadas, sendo que as capilares são atualmente as mais empregadas, devido a sua grande capacidade de separação e vasta variedades de substâncias que podem ser separadas. As colunas capilares geralmente são feitas com sílica fundida apresentando diâmetro interno de 0,10 a 0,75 mm, sendo que a fase estacionária é espalhada ou imobilizada na parede interna do capilar. A coluna fica armazenada em um forno, no qual estabelece-se a temperatura ideal para o tipo de análise que será realizada. [7, 26]

Além da coluna cromatográfica, o detector também é de extrema importância em um cromatógrafo a gás. De acordo com o tipo de análise que será realizada, o detector deve apresentar características como seletividade e sensibilidade, e também apresentar boas informações qualitativas e quantitativas dos analitos. Os principais tipos de detectores utilizados em cromatografia gasosa são os detectores por condutividade térmica (TCD, do inglês, *Thermal Conductivity Detector*), de ionização em chama (FID, do inglês, *flame ionization detector*), fotoionização, captura de elétrons (ECD, do inglês, *Electron Capture Detector*), fotométrico de chama (FPD, do inglês, *Flame Photometric Detector*), e espectrometria de massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*). [7, 26]

O FID é bastante popular por apresentar alta eficiência, resposta rápida, grande faixa de linearidade, alta sensibilidade, e baixo custo. [7] O gás de arraste chega ao detector e uma chama é produzida pela combustão de ar e hidrogênio, presente no detector, queima e ioniza algumas das moléculas presentes nessa corrente gasosa, gerando íons que produzem uma corrente da ordem de 10^{-14} A, registrada como a linha de base do detector. Os íons formados devido a queima das moléculas da amostra na chama, são coletadas por um eletrodo. A quantidade de íons formados quando a amostra está presente no gás eluente é muito maior que a quantidade formada quando somente o gás de arraste está sendo queimado. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e registrada sob a forma de um cromatograma. [7, 26]

3.3 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico requer um processo de avaliação para que os resultados sejam confiáveis e interpretáveis sobre a amostra. Esse processo de avaliação é denominado validação. A etapa de validação de um método analítico visa demonstrar se o método é adequado para o que se pretende realizar, com a obtenção de resultados com qualidade e confiabilidade. Nessa etapa busca-se assegurar que o método irá gerar os resultados esperados nas condições estabelecidas. [7-9]

Um método analítico que é validado, deve oferecer para às agências reguladoras um procedimento que comprove que o método garante os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequados. [7-9]

Organizações nacionais e internacionais oferecem orientações sobre validação de métodos e outros temas relacionados. No Brasil, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) com o DOQ-CGCRE-008 (revisão 03) de 2010 são as principais agências reguladoras. No âmbito internacional podem ser destacadas a ICH, FDA, Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

No processo de validação analítica vários parâmetros são avaliados, tais como exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção e quantificação, e robustez. [7-9]

A exatidão expressa a concordância entre o valor experimental com o valor tido como verdadeiro ou aceito como referência. Já a precisão expressa a concordância de vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra. Esta deve ser obtida em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade. [7-9]

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. [7] Normalmente utiliza-se uma curva de resposta que é construída por meio de gráficos de calibração e tratamentos estatísticos. [7-9].

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente, quantificada como um valor exato. Já o limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada. [7-9]

A seletividade indica a capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na determinação, ou seja, é uma parte do método capaz de determinar uma espécie em uma mistura sem sofrer interferências. [7-9]

3.4 Qualidade por *Design* Analítico - *Analytical Quality by Design* (AQbD)

O conceito de Qualidade por *Design* (QbD) (do inglês, *Quality by Design*) é atribuído ao doutor Joseph M. Juran, que acreditava na ideia de que os problemas referentes à qualidade de um produto estão relacionados ao modo com que ele foi desenvolvido e, dessa forma, a qualidade deve ser controlada a cada etapa do processo para maximizar a probabilidade de que o produto final alcance seus atributos de qualidade e as especificações. No contexto analítico, esse conceito vem sendo ampliado e é denominado de Qualidade por *Design* Analítico (AQbD, do inglês, *Analytical Quality by Design*), em que se visa o desenvolvimento de métodos analíticos robustos que possam ser aplicados durante todo o ciclo de vida do produto. [28-29]

De acordo com Grangeia *et al.*, (2020), formalmente, QbD é definido como "uma sistemática abordagem para o desenvolvimento de produtos que começa com objetivos e enfatiza a compreensão do produto e do processo e controle de processo, com base em ciência sólida e gestão de risco de qualidade". Todavia, a indústria farmacêutica somente passou a adotar essa nova abordagem nos últimos anos. [30]

A agência regulatória americana FDA foi a primeira a introduzir na indústria farmacêutica esse novo conceito no ano de 2004 por meio dos documentos "Boas práticas de fabricação de controle farmacêutico (cGMPs) para o século 21" e "Orientação para tecnologia analítica de processos da indústria (PAT)". Nos anos seguintes, outras agências reguladoras de outras regiões do mundo também decidiram aderir, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), ICH, bem como as principais empresas farmacêuticas. [29-30]

Como consequência, vários documentos de orientação farmacêutica relevantes foram emitidos pelo ICH, tais como ICH Q8, Q9, Q10, Q11, Q12 e Q13. De acordo com Bezerra e Rodrigues (2017), o ICH busca com esses documentos definir uma nova concepção na produção de medicamentos, que se baseia não apenas nos testes finais realizados no produto, mas na aplicação dos princípios do *Quality by Design*, consistindo em uma abordagem sistemática do desenvolvimento farmacotécnico, que inicia com objetivos pré-definidos e dá ênfase à compreensão do produto, do processo e do controle de qualidade deste, com base na ciência e no gerenciamento de riscos de qualidade. [29-30]

As técnicas cromatográficas são as ferramentas analíticas mais comumente empregadas no controle de qualidade da indústria farmacêutica. Todavia, o número de variáveis envolvidas na etapa de desenvolvimento do método analítico é bastante vasto, tais como as características da amostra, as configurações do instrumento, métodos de calibração, entre outros. [7-9]

Por meio da abordagem convencional, somente um fator por vez é monitorado no desenvolvimento de métodos analíticos, OFAT (do inglês, *One Factor At Time*), resultando em demasiado tempo de análises, não permitindo avaliar a interação entre as variáveis, além de alta incerteza de medição. Em contrapartida, empregar o conceito de AqBd no desenvolvimento de métodos analíticos possibilita identificar e compreender como os parâmetros analíticos críticos afetam o desempenho do método analítico. Assim, é possível estabelecer estratégias de controle, garantindo desempenho adequado do método, resultando em resultados com menores incertezas e maior confiabilidade. [29-32]

As principais etapas que incluem o QbD e o AqBd são: (I) estabelecimento do Perfil de Qualidade Alvo do Produto (QTPP), do inglês, *Quality target product profile*) / estabelecimento do Perfil Analítico Alvo (ATP, do inglês, *Analytical Target Profile*), (II) identificação de Atributos Críticos de Qualidade (CQA, do inglês *Critical quality attributes*) / Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC, do inglês, *Analytical Method Performance Characteristics*), (III) Análise de Risco (QRM, do inglês, *Quality Risk Management*), (IV) Planejamento de Experimentos (DoE, do inglês, *Design of Experiments*), (V) definição da Região Operacional (DS, do inglês *Design Space*) / Região de Design Operável do Método (MODR, do inglês, *Method Operable Design Region*). [29,31-32]

3.4.1 Estabelecimento do Perfil Analítico Alvo (ATP)

O ATP, etapa inicial do AqBd, é a definição do objetivo do método analítico em questão, ou seja, ele irá conduzir as atividades de seleção, *design* e desenvolvimento de métodos. O ATP equivale ao QTPP do QbD, visto que o QTPP resume as características de qualidade do produto para garantir sua eficácia e segurança. [32-33]

O ATP é fundamentado no conhecimento prévio do analito que será quantificado, isto é, saber quais são as propriedades físico-químicas da molécula em estudo, conhecer as vias e mecanismos de degradação que resultam em impurezas, eventuais interações com os excipientes, entre outros. [34]

Assim sendo, o ATP especifica o que deverá ser medido, como deverá ser medido, e por que e quando deverá ser medido. [32] Dessa forma, o ATP serve como referência para avaliar a eficácia do método analítico da fase de desenvolvimento e durante todas as mudanças do ciclo de vida do produto. [34] O ATP facilita uma melhora constante dos métodos de análise, sendo que quando bem definido evita desperdício de tempo e análises. [32-33]

3.4.2 Identificação das Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC)

As AMPC são definidas como as características do método que interferem diretamente no ATP. Assim, para garantir a qualidade do método analítico, é necessário um controle das AMPC. Podem ser classificadas em variabilidade sistemática e variabilidade aleatória conforme sua fonte de erro. [32-33]

Em uma abordagem farmacêutica de QbD para o desenvolvimento de produtos, a próxima etapa é identificar as características que são críticas para qualidade (CQA), que são representados pelas propriedades químicas, físicas, biológicas e/ou microbiológicas, almejando entregar de forma consistente um medicamento com tais CQAs para o paciente. Assim, um CQA se refere às propriedades ou características do método que podem ter impacto direto no ATP. [29-32]

Os atributos críticos do material (CMA, do inglês, *Critical Material Attributes*), consiste de propriedades físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas que o material de partida bem como os excipientes devem cumprir para garantir o CQA desejado. [29-32]

Os parâmetros críticos do processo (CPP, do inglês, *Critical Process Parameters*) representam cada uma das operações unitárias que podem influenciar diretamente no CQA, incluindo a frequência de rotações do equipamento, a velocidade de aquecimento, o fluxo, a temperatura de secagem, entre outros. [29-32]

3.4.3 Análise de risco

A análise de risco (QRM) ou gerenciamento de risco identifica as variáveis do método que impactam o ATP, sendo possivelmente críticos para as respostas. Por meio da QRM é possível discriminar as fontes de variação de um sistema e, conseqüentemente, priorizar os pontos de investigação de um processo. As características da amostra bem como o seu procedimento de preparo, o tempo de análises, dentre outros parâmetros, são alguns dos fatores que podem ser críticos nessa etapa. [32-33]

A etapa da QRM pode se subdividir em três partes, sendo a identificação, análise e avaliação de risco. Normalmente, é utilizado um diagrama de espinha de peixe (Ishikawa) para a avaliação de risco. Esse diagrama é uma avaliação de risco qualitativa que permite a identificação e classificação em categorias amplas das principais fontes de perigos de prejuízos para a análise. Assim, o diagrama de Ishikawa apresenta resultados voltados para a identificação e agrupamento dos riscos. A FIG. 04 apresenta um exemplo de aplicação do Diagrama de Ishikawa. [32-34]

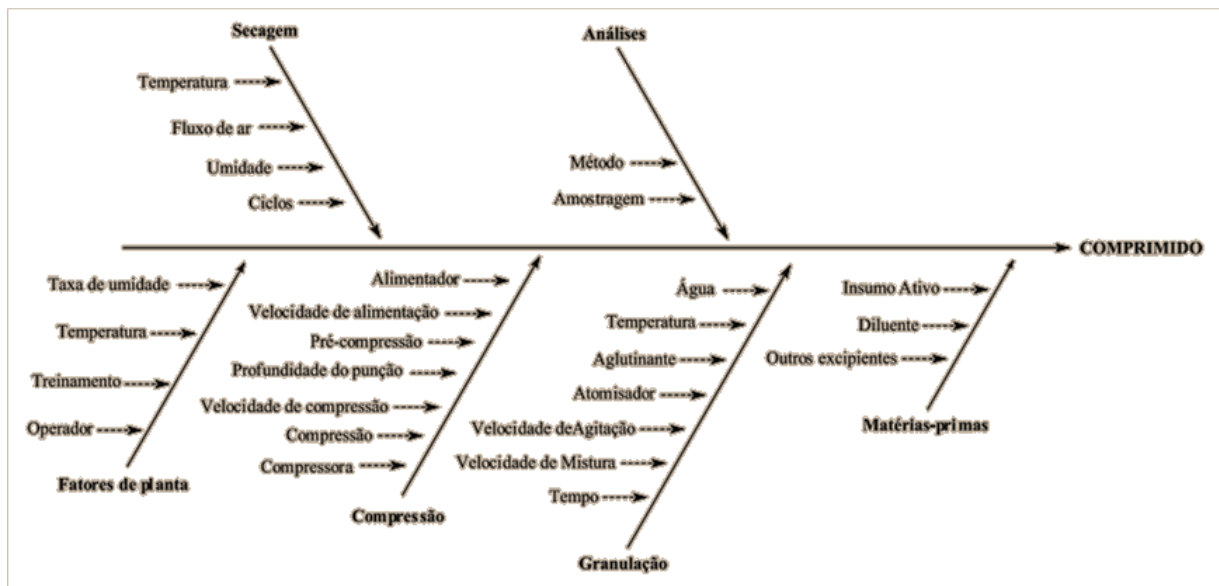


Figura 04: Exemplo de aplicação do Diagrama de Ishikawa empregando todas as características de desempenho do método analítico.

Fonte: Bezerra e Rodrigues, 2017. [29]

Outra ferramenta de análise comumente empregada para determinar as fontes de riscos associadas ao método, é a FMEA (do inglês, *Failure Mode Effect Analysis*). O FMEA é frequentemente usado para realizar uma avaliação de risco quantitativa, que fornece a atribuição de intensidade do risco considerando o produto da multiplicação de três fatores, sendo eles a frequência de falha (probabilidade), a severidade do efeito da falha (severidade), e a capacidade de detectar a falha (detectabilidade). [29,32,34]

3.4.4 Planejamento de experimentos (DoE)

O DoE, também comumente chamado de delineamento ou desenho experimental, é uma ferramenta utilizada para planejar os experimentos, isto é, estabelece a relação entre os parâmetros analíticos que são críticos e interferem na resposta da análise. Em outras palavras, o DoE irá definir quais são os dados que serão coletados, quais as condições que os experimentos serão realizados, e também o número de experimentos. Em suma, o DoE irá por meio de um modelo matemático do tipo $y = f(x_i)$, onde x_i representa as variáveis independentes e y as variáveis dependentes. [32-34]

A fase de DoE inclui três etapas fundamentais. A primeira etapa é a triagem, em que busca identificar os principais parâmetros que são críticos no método. A segunda etapa é a otimização, que estabelece a relação entre as variáveis críticas da etapa anterior com as respostas analíticas de interesse. A fase final é a escolha da ferramenta de DoE, visto que existem vários modelos de DoE que podem ser selecionados. [32-33]

Dentre as principais ferramentas do DoE, destacam-se o planejamento fatorial completo, planejamento fatorial fracionário, planejamento Plackett-Burman, delineamento de Composto central e delineamento Box-Behnken. A escolha deve levar em consideração os objetivos, o número de fatores com suas possíveis interações, a validade estatística e a eficácia de cada delineamento. [33]

3.4.5 Região de Design Operável do Método (MODR)

No QbD, o DS é uma combinação multidimensional e interação de fatores que fornecem garantia de qualidade, resultando em segurança e eficácia. Ele fornece flexibilidade regulatória frente a pequenas alterações no método. O DS é um domínio multivariado de fatores de encontrados, em que respostas obtidas enquadram-se nos limites predefinidos com um nível aceitável de probabilidade. [32,35]

O MODR no AQbD é a combinação e interação multidimensional de condições analíticas. Ela fornece garantia do desempenho do método analítico para as respostas avaliadas. Os resultados são tratados por meio de ferramentas estatísticas e expressos por modelos matemáticos ou graficamente. [32]

De acordo com Moreira (2019), os limiares que restringem o MODR contemplam o espaço delineado com base nas combinações múltiplas das variáveis do método, sendo assim, o mesmo é delimitado conforme a identificação dos limites de falha dessas variáveis. Assim, qualquer condição que esteja fora do MODR não apresentará o desempenho aceitável. [35] O método é delineado em uma área na qual são delimitadas as zonas de robustez. [32,35]

3.4.6 Estratégia de controle

A estratégia de controle é responsável por assegurar que o método mantenha sua performance, isto é, ela busca garantir que os requisitos do ATP sejam atingidos. Ela é derivada de vários dados coletados durante a fase de desenvolvimento do método. Também é derivada da verificação da performance do método, dos resultados estatísticos originados do DoE, na compreensão do MODR, nos estudos de robustez, dentre outros. [33, 35]

Assim, a estratégia de controle pode auxiliar prevenindo cuidados a serem tomados, assim como, o grau dos reagentes, marca dos equipamentos, tipos de colunas, sensibilidade analítica, entre outros fatores.

Peraman *et al.*, (2015) enfatizam que a estratégia de controle do método de AQbD não difere da estratégia de controle tradicional, todavia os controles de método

precisam ser estabelecidos para garantir relação entre o propósito do método e o desempenho do método. [33]

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foi um cromatógrafo gasoso (CG) da marca *Agilent* modelo 7890A acoplado ao *Headspace Transferline* da marca *Agilent* modelo 7697A, utilizando o software *Waters Empower™* 3, e para a avaliação estatística de todo planejamento experimental, foi utilizado o *Octave 4.2.1™* e uma versão de Teste do software *StatEase, Design Expert* versão 13. Como diluente foi utilizado o reagente Dimetilformamida Grau CG da marca Merck e água purificada pelo Purificador de água de laboratório *Milli-Q® Advantage A10*.

4.2 Padrões, reagentes e solventes

Como contribuição dessa pesquisa, o trabalho foi realizado nas dependências da empresa Prati-Donaduzzi com o uso de todos os recursos cabíveis para a elaboração deste projeto. Os padrões caracterizados utilizados foram definidos após a escolha dos solventes residuais dimetilsulfóxido, metanol, acetona, álcool isopropílico, diclorometano, tolueno, ácido acético, acetato de etila, n-hexano, ciclohexano, clorofórmio, dimetilacetamina, trietilamina e terc-butanol para serem controlados por quatro métodos distintos pela técnica de cromatografia a gás.

Os critérios de especificação adotados na validação para desvio padrão relativo (DPR) e recuperação, estão conforme preconiza o “*Guidelines for Standard Method Performance Requirements*”. Estas especificações são baseadas na razão de massa do analito pela massa da amostra, quanto menor for essa relação mais abrangente é o critério. Vale ressaltar que esses critérios desprezam outros fatores importantes que influenciam no resultado final, como a técnica de análise utilizada, a resposta do analito frente ao detector, e se há alguma etapa crítica no processo de preparo da sua amostra. [36-37]

O método proposto no Capítulo Geral da USP <467> *Residual Solvents* sofreu uma série de modificações tornando-o um desenvolvimento local, o qual contemplará a análise de todos os parâmetros que devem ser considerados em uma validação analítica, devendo conter toda apresentação de resultados e evidências quanto ao atendimento da legislação brasileira vigente RDC 166/2017. [4, 38]

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de solventes residuais inicia-se na determinação de quais analitos devem ser controlados, na qual essa decisão é tomada a partir da avaliação do *Drug Master of File* (ou Arquivo Mestre da Droga), esse documento tem por finalidade trazer todas as informações referente ao insumo

farmacêutico ativo (IFA), tais informações como: rota produtiva, impurezas relacionadas, estudos de estabilidade do fármaco, condições de manuseio, conservação, utilização, justificativas e certificados analíticos. Desta forma, é possível determinar o que deve ser controlado de forma a garantir a qualidade, segurança, eficácia e confiabilidade do produto final.

Para a realização deste trabalho foi adotado a técnica de cromatografia gasosa com o FID, técnica que é comumente empregada para a determinação de solventes residuais. As premissas para utilização dessa técnica baseiam-se no analito apresentar baixa temperatura de ebulição, alta pressão de vapor, baixa massa molar, e conter carbono em sua estrutura.

4.3 Etapas do AQbD

Tendo em vista uma perspectiva do futuro, para tornar real a prática atual tende-se o QbD ser introduzido durante o desenvolvimento do método e validado para a comprovação do desempenho do método. Na sequência, encontra-se o passo a passo que deve ser realizado na prática. [39-43]

As agências regulatórias EMA e FDA levam em consideração que todos os métodos desenvolvidos sejam com base no AQbD, com protocolos definidos para a transferência de métodos, o estabelecimento de metodologias para a verificação da MODR na transferência do local, e ter uma definição clara com critérios de avaliação de métodos baseados no AQbD. [39-42]

Os métodos analíticos para os medicamentos existentes devem ser reavaliados periodicamente para resolver quaisquer lacunas ou melhorias em seu desempenho, e fatores de risco usando AQbD. A gama de robustez para o método precisa ser comprovada por verificação e compreensão científica, a fim de evitar a falha em sua transferência e também para reduzir Fora da especificação (OOS) e Fora de tendência (OOT). [39-42]

A seguir serão apresentadas as etapas de implementação do AQbD:

Etapa 1 – Triagem e definições primárias

- Definição dos analitos, características e divisão de métodos;
- Estabelecimento do Perfil alvo analítico (ATP);
- Planejamento experimental;
- Definir os fatores primários.

Etapa 2 – Otimização e definições secundárias

- Processar e analisar os dados da triagem;

- Identificação das Características de desempenho do método analítico (AMPC);
- Análise de risco (QRM);
- Identificação dos Atributos críticos de qualidade (CQ's);
- Definir os fatores secundários;
- Criar o Design de experimento (DoE) da otimização;

Etapa 3 – Avaliação dos resultados

- Tratamento e processamento de dados;
- Estudo teórico de robustez;
- Avaliação empírica das condições obtidas através da otimização;
- Criação de superfícies de respostas;
- Ajuste final.

Etapa 4 – Validação

- Validação da metodologia proposta;
- Definição da estrutura para aplicação do AQbD dividida por etapas;
- Definição do Região de Design operável do Método (MODR);

Etapa 5 – Estratégia de controle

- Estratégia para controle;
- Monitoramento;
- Ciclo de vida contínuo gestão.

4.3.1 Apresentação das condições cromatográficas

A descrição do sistema cromatográfico e as condições do método cromatográfico, que foram utilizados na fase exploratória para a escolha do diluente e seleção da coluna cromatográfica, são apresentados nas TABS. 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01: Sistema cromatográfico exploratório

Gás de Arraste:	Hélio
Vazão do gás de arraste (mL.min ⁻¹):	4,0
Volume de Injeção (uL):	1
Coluna:	G2 (ZB-1) 30 m x 0,53 mm, 3,0 µm de filme de revestimento;
Liner:	Split com lã de vidro para baixa pressão (Agilent, 5190-2295)
Column Pressure Mode:	Constant Flow
Razão de separação:	1:10
Detector:	FID
Temperatura do detector (°C):	300
Temperatura do injetor (°C):	250
Purga do septo (mL.min ⁻¹):	3,0
Nitrogênio (<i>Make Up</i>) (mL.min ⁻¹):	26
Hidrogênio (mL.min ⁻¹):	30
Ar sintético (mL.min ⁻¹):	300
Detector Output (MHz):	20,0

Tabela 02: Condições de temperatura do forno exploratório

Rampa (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de permanência (min)	Tempo total (min)
-	40	5,00	5,00
10	260	7,00	34,00

4.3.2 Preparo de amostra - Exploratório: descrito no Apêndice I

Por se tratar de um preparo de amostra que tem como base o Capítulo <467> da USP foi optado em mantê-lo no Apêndice I.

4.4 Método otimizado após a avaliação do planejamento experimental

Após a avaliação dos resultados da etapa exploratória, foi obtida a condição ideal para a validação do método, de acordo com a RDC 166/2017.

Nas TABS. 03, 04, e 05 estão apresentadas as condições do Sistema cromatográfico, as condições da temperatura do forno e as condições do *Headspace Transferline*, respectivamente.

Tabela 03: Sistema cromatográfico otimizado (condição validada)

Gás de Arraste:	Hélio
Vazão do gás de arraste (mL.min ⁻¹):	1,0
Volume de Injeção (mL):	1
Coluna:	G43 (ZB-624) 60 m x 0,25 mm, 1,4 µm de filme de revestimento;
Liner:	Split com lã de vidro para baixa pressão (Agilent, 5190-2295)
Column Pressure Mode:	Constant Flow
Modo:	Split
Razão de separação:	1:10
Detector:	FID
Temperatura do detector (°C):	220
Temperatura do injetor (°C):	220
Purga do septo (mL.min ⁻¹):	3,0
Nitrogênio (<i>Make Up</i>) (mL.min ⁻¹):	26
Hidrogênio (mL.min ⁻¹):	30
Ar sintético (mL.min ⁻¹):	300
Detector Output (MHz):	20,0

Tabela 04: Condições da temperatura do forno otimizadas (condição validada)

Rampa (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de permanência (min)	Tempo total (min)
-	30	42,00	42,00
118,00	200	7,56	51,00

Tabela 05: Condições do *Headspace Transferline* otimizadas (condição validada)

Tamanho do <i>vial</i> :	Hélio
Vazão do gás no <i>vial</i> (mL.min ⁻¹):	1,0
Tipo de gás no <i>vial</i> :	Nitrogênio
Volume de transferência (mL):	1,0
Temperatura de incubação (°C):	90
Temperatura do <i>loop</i> (°C):	105
Temperatura da <i>Transferline</i> (°C):	120
Agitação do <i>vial</i> :	6
Tempo de ciclo do cromatógrafo (min):	59,00
Tempo de incubação (min):	20,00
Pressão de equilíbrio (min):	0,1
Injeção (min):	0,5
Vazão de purga (mL.min ⁻¹):	100
Tempo de purga (min)	10
Modo de preenchimento do <i>vial</i> :	Preenchimento por pressão
Pressão de preenchimento (psi):	20
Modo de enchimento do <i>loop</i> :	Original
Modo de extração:	Única + Limpeza após a extração

4.4.1 Preparo da Seletividade Otimizada - Apresentado no Apêndice 3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Etapa 1

5.1.1 Definição dos analitos

Na TAB. 06 são apresentados os analitos a serem controlados de acordo com a definição de cada fabricante em seu processo de síntese, ao ser optado pelo controle em rotina esses analitos serão divididos em quatro métodos distintos para o controle.

Tabela 06: Analitos controlados no certificado analítico dos fabricantes

Analitos	Fabricante 1	Fabricante 2	Fabricante 3
Dimetilsulfóxido	Controlado	Controlado	**
Metanol	Controlado	Controlado	Controlado
Acetona	Controlado	**	Controlado
Álcool isopropílico	Controlado	Controlado	Controlado
Diclorometano	Controlado	**	**
Tolueno	Controlado	Controlado	Controlado
Ácido acético	**	Controlado	**
Acetato de Etila	**	Controlado	Controlado
n-Hexano	**	Controlado	**
Ciclohexano	**	Controlado	Controlado
Clorofórmio	**	Controlado	**
Dimetilacetamida	**	Controlado	**
Trietilamina	**	**	*
Terc-Butanol	**	**	Controlado

* Os fabricantes apresentaram justificativa para a isenção do controle em rotina dos analitos, com demonstração do controle em 6 lotes pilotos ou 3 lotes em escala industrial com resultados abaixo do Limite de detecção do método (LOD);

** Solventes não existentes na rota de síntese apresentada pelo fabricante;

Baseado nas informações acima, tem-se a determinação de quais solventes devem ser controlados, sendo possível observar que cada fabricante possui solventes específicos a serem considerados em um método. As informações necessárias para essas avaliações e definições são baseadas no *Drug Master of File*, disponibilizado por cada fabricante, e pelo controle informado temos os solventes residuais mencionados acima sendo controlados por cromatografia gasosa, e não temos o controle de impurezas relacionadas pela técnica abordada neste trabalho.

Com isso, o próximo passo para um desenvolvimento de método parte da definição da solubilidade do fármaco. A TAB. 07 apresenta os testes de solubilidade realizados para a matéria-prima cloridrato de duloxetine e analitos a serem controlados.

Tabela 07: Solubilidade da matéria-prima

Solvente (Diluyente)	Concentração 50 mg.mL⁻¹	Concentração 25 mg.mL⁻¹
Dimetilsulfóxido	Solúvel	Solúvel
Dimetilformamida	Solúvel	Solúvel
Dimetilacetamida	Solúvel	Solúvel
Metanol	Solúvel	Solúvel
Etanol	Solúvel	Solúvel
Acetonitrila	Insolúvel	Insolúvel
2-Propanol	Insolúvel	Insolúvel
H ₂ O	Parcialmente solúvel	Parcialmente solúvel

Com os resultados apresentados na TAB. 07, nessa primeira etapa de desenvolvimento podemos observar algumas possibilidades de diluentes a serem adotados. Para essa escolha, foram realizados testes experimentais exploratórios considerando o melhor perfil cromatográfico, sendo ele o mais limpo e livre de impurezas. Com esses resultados, foi possível definir que ao optar pelo modo de injeção via *Headspace*, a melhor escolha como diluente seria uma solução de dimetilformamida e água purificada na proporção (60:40), contendo 5 mL de volume final da mistura em um *vial* de *Headspace* de 20 mL. Ao se obter uma mistura orgânico/inorgânico, há uma melhor competição entre as moléculas dentro do *vial* durante o aquecimento, fazendo com que as moléculas do analito se desprendam com maior facilidade do meio líquido para o gasoso. Com isso, traz-se um efeito positivo na intensidade do sinal representando uma maior sensibilidade analítica e melhor estabilidade entre o meio líquido e gasoso. Já para a injeção direta (líquida), foi utilizado metanol como diluente levando em consideração o perfil cromatográfico e o diluente com menor temperatura de ebulição. Por se tratar de uma injeção direta, a escolha por diluentes com essa característica faz com que não haja a condensação do mesmo no injetor durante o processo de vaporização, que ocorre no *linner* do equipamento, garantindo assim que o diluente possa eluir com facilidade. Na TAB. 08 serão apresentadas as características físico-químicas para cada analito, e servindo como base para a tomada de decisões durante o desenvolvimento analítico, baseado na problemática encontrada durante esta etapa, e auxiliará na resolução de problemas para a evolução do método analítico.

Tabela 08: Características físico-químicas de todos analitos a serem controlados

Analitos	Pressão de vapor (mmHg 25°C)	Densidade (g.mL ⁻¹)	Massa molar (g.mol ⁻¹)	Temperatura de ebulição (°C)	Polaridade*
Dimetilsulfóxido	0,6	1,10	78,14	189,0	Polar
Metanol	127,0	0,79	32,04	64,7	Polar
Acetona	231,0	0,79	58,08	56,0	Polar
Álcool isopropílico	45,4	0,79	60,10	82,3	Polar
Diclorometano	435,0	1,33	84,93	40,0	Apolar
Tolueno	28,4	0,87	92,14	111,0	Apolar
Terc-butanol	40,7	0,78	74,12	82,3	Polar
Ácido acético	15,7	1,05	60,05	118,0	Polar
Acetato de Etila	93,2	0,90	88,11	77,0	Polar
n-Hexano	153,0	0,66	86,18	69,0	Apolar
Ciclohexano	96,9	0,78	84,16	81,0	Apolar
Clorofórmio	197,0	1,48	119,37	62,0	Apolar
Dimetilacetamida	2,0	0,94	87,12	165,0	Polar
Trietilamina	57,1	0,73	101,19	89,0	Polar-Apolar

*Fonte: PubChem

Baseado nas características de cada analito, é possível identificar qual tipo de injeção deve ser adotada em cada método. Teoricamente, quanto menor é sua pressão de vapor, maior a dificuldade de vaporização do analito, sendo que, quanto maior a massa molar e temperatura de ebulição, maior a dificuldade dos mesmos se deslocarem da fase líquida para gasosa. Com isso, para analitos que atendam essas características, a escolha da injeção direta se faz necessária, sendo eles: dimetilsulfóxido, ácido acético, dimetilacetamida e trietilamina, pois desta forma conseguimos elevar a temperatura do injetor a tal ponto que a vaporização dos analitos ocorra dentro do *linner* do sistema de injeção, mesmo que sejam necessárias altas temperaturas.

A partir destas informações, foi dada continuidade no desenvolvimento com a escolha da coluna cromatográfica nesta etapa. Visando obter um desenvolvimento economicamente viável, foi utilizado o modo de injeção direta, que nos remete a uma economia no consumo de reagentes, padrões, insumos como *vials*, tampas e septos, sendo que tudo isso se torna necessário ao se utilizar o modo de injeção *Headspace*. Com esta escolha, viabiliza-se a re-injeção do mesmo *vial* em todas colunas a serem testadas.

Desta forma, para o desenvolvimento desse trabalho foi avaliado a seletividade dos analitos com diferentes polaridades de colunas. A condição utilizada para a seletividade foi considerada uma condição exploratória com intuito de avaliar a separação dos analitos e identificar quais deles melhor atendem os parâmetros de qualidade avaliados, como:

Resolução $\geq 1,5$, cauda $\leq 2,0$, sinal ruído ≥ 10 no limite de quantificação e perfil cromatográfico livre de impurezas.

Para este produto, foram selecionados quatro fabricantes distintos para a matéria-prima, sendo que para cada um deles foram considerados os solventes utilizados na rota produtiva e controlados pelo fabricante em seu certificado de análise.

Na análise exploratória, tivemos os seguintes resultados apresentados na (TAB. 09).

Tabela 09: Resultados de robustez de coluna

Analítico	DB-1 30m¹ 530mm² 3µm³	DB-624 60m¹ 250mm² 1,4µm³	DB-Wax 30m¹ 530mm² 2µm³
Metanol	Coeluição com impurezas de analitos	Aprovado	Coeluição com Terc-butanol
Acetona	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Álcool isopropílico	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Terc-Butanol	Coeluição com diclorometano	Aprovado	Coeluição com Metanol
Diclorometano	Coeluição com Terc-butanol	Aprovado	Aprovado
Acetato de etila	Coeluição com Hexano e clorofórmio	Aprovado	Aprovado
Hexano	Coeluição com Acetato de Etila e clorofórmio	Aprovado	Aprovado
Clorofórmio	Coeluição com Hexano e Acetato de Etila	Aprovado	Aprovado
Benzeno	Aprovado	Coeluição com Trietilamina	Aprovado
Ciclohexano	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Trietilamina	Aprovado	Aprovado	Coeluição com Diisopropiletilamina
Dimetilsulfóxido	Cauda >2	Aprovado	Aprovado
Dimetilacetamida	Cauda >2	Aprovado	Aprovado
Tolueno	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Ácido acético	Coeluição com Hexano e Cauda >2	Cauda >2	Aprovado

1: Comprimento da coluna, em metro (m); 2: Diâmetro interno da coluna, em milímetro (mm); 3: Espessura do filme da coluna, em micrometro (µm).

A partir da análise dos resultados acima, foi possível identificar qual o melhor cenário para cada analito e o modo de injeção no sistema cromatográfico. Com isso, foi proposto a separação dos métodos conforme apresentado na (TAB. 10).

Coeluições entre analitos podem ocorrer, no entanto, o que deve ser garantido é que, os analitos a serem separados por uma determinada fase estacionária estejam completamente resolvidos dos analitos avaliados e dos picos adjacentes a ele.

Tabela 10: Divisão de métodos

Análitos	Coluna cromatográfica	Divisão de métodos	Modo de injeção
Dimetilsulfóxido	G27 – 30m x 530mm x 2 um	Método I	Líquida
Metanol	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
Acetona	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
Acool isopropílico	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
Diclorometano	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
Tolueno	G1 – 30m x 320 mm x 5um	Método II	<i>Headspace</i>
Ácido acético	G27 – 30m x 530mm x 2 um	Método I	Líquida
Acetato de Etila	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
n-Hexano	G1 – 30m x 320 mm x 5um	Método II	<i>Headspace</i>
Ciclohexano	G1 – 30m x 320 mm x 5um	Método II	<i>Headspace</i>
Clorofórmio	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>
Dimetilacetamida	G27 – 30m x 530mm x 2 um	Método I	Líquida
Trietilamina	G27 – 30m x 530mm x 2 um	Método IV	Líquida
Terc-butanol	G43 – 60m x 250mm x 1,4um	Método III	<i>Headspace</i>

A proposta para o controle dos solventes residuais contidos na Matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina foi baseada na melhor condição de injeção de maneira individualizada para cada analito, essa decisão foi tomada após a avaliação das características físico-química, comportamento analítico e sensibilidade por meio de um preparo na concentração real nos dois modos de injeção. Contudo, essa divisão em injeção *Headspace* e direta (Líquida), para o *Headspace* foi utilizado uma coluna de média polaridade para os métodos dois e três, onde julgou-se que dividi-los seria a melhor estratégia, visando um menor tempo de corrida, assim não haveria impactando em atrasos na rotina de liberação do produto, e para o método um vamos ter Dimetilsulfóxido e dimetilacetamida e para o método quatro trietilamina, neste caso foi optado pela divisão como forma de melhor atender os critérios de *System suitability* que era impactado quando eles estavam juntos.

Após a TAB. 10, foi possível seguir com a divisão proposta durante a etapa exploratória, que abrange a escolha da coluna cromatográfica e do diluente de modo a atender os parâmetros de qualidade. Desta forma, foi dada sequência na etapa 1 (um) com a aplicação do planejamento experimental apropriado.

Devido ao cenário encontrado de três métodos analíticos para o controle dos solventes residuais, foi optado pela continuidade no desenvolvimento analítico a partir do método 3 (três) com a aplicação do planejamento experimental exploratório de Plackett-Burman, que teve como objetivo a identificação dos efeitos primários, almejando a maximização do sinal analítico, a recuperação do limite de quantificação (40%) e do ponto máximo da faixa de trabalho (240%). Com isso, foi utilizado o método 3 (três) e, com ele, os seguintes analitos deverão ser avaliados no método: Metanol, Acetona, Álcool

Isopropílico, Diclorometano, Acetato de Etila e Terc-butanol. Os mesmos foram avaliados nas condições exploratórias do *Headspace Transferline*.

5.1.2 Identificação do Perfil Analítico Alvo (ATP)

Esta etapa é baseada no objetivo do método. A aprovação da ANVISA será baseada no que foi definido como proposta de ATP, pois com essa definição inicial é possível ter um melhor direcionamento dos objetivos e conhecimento sobre o proposto de maneira pré-definida. [43]

As características esperadas para o desenvolvimento do método podem ser pautadas na avaliação de desempenho, na qual existem dois tipos de avaliação: componentes sistemáticos (tendência) e componentes aleatórios inerentes (variância), que poderão ser evidenciados com a avaliação dos parâmetros de desempenho do método, como precisão, exatidão, seletividade e linearidade. Os parâmetros linearidade e seletividade não estarão incorporadas nos ATP. A escolha do método analítico deve estar de acordo com as necessidades definidas nos ATP, de acordo com a TAB. 11. [43]

Tabela 11: Definição do Perfil Analítico Alvo (ATP)

ATP	Alvo	Justificativa
Amostra	Matéria-prima	Desenvolver um método analítico para quantificação de solventes residuais contidos na matéria-prima Duloxetine.
Tipo de Método	Seletivo, linear, preciso e exato	De acordo com a polaridade da molécula, resposta proporcional ao aumento de concentração do analito, baixa variação na repetibilidade e reprodutibilidade e que não apresente recuperação tendenciosa. Todos atendendo aos Atributos críticos de qualidade (CQA's)
Instrumento	CG	Baseado na volatilidade, solubilidade, pressão de vapor e ponto de ebulição.
Características da amostra	Forma Farmacêutica - Sólido	Facilmente solubilizado, inerte, inodoro, não tóxico. Técnica para a extração do analito na amostra. Ultrassom, agitação mecânica, centrifugação, decantação
Preparo do padrão e amostras	Diluyente	Baseado no coeficiente de solubilidade, pka do IFA e sem interação.
Aplicação do método	Matéria Prima	A aplicação é baseada no controle de solventes residuais na matéria prima Duloxetine, sistema de extração <i>Headspace Transferline</i> e injeção, Detecção de Ionização em Chama (FID), modelo do injetor com divisão de fluxo (<i>Split/Splitless</i>)

Fonte: [43]

5.1.3 Planejamento experimental

Na FIG. 05 é apresentado um fluxograma para os problemas com três ou mais fatores.

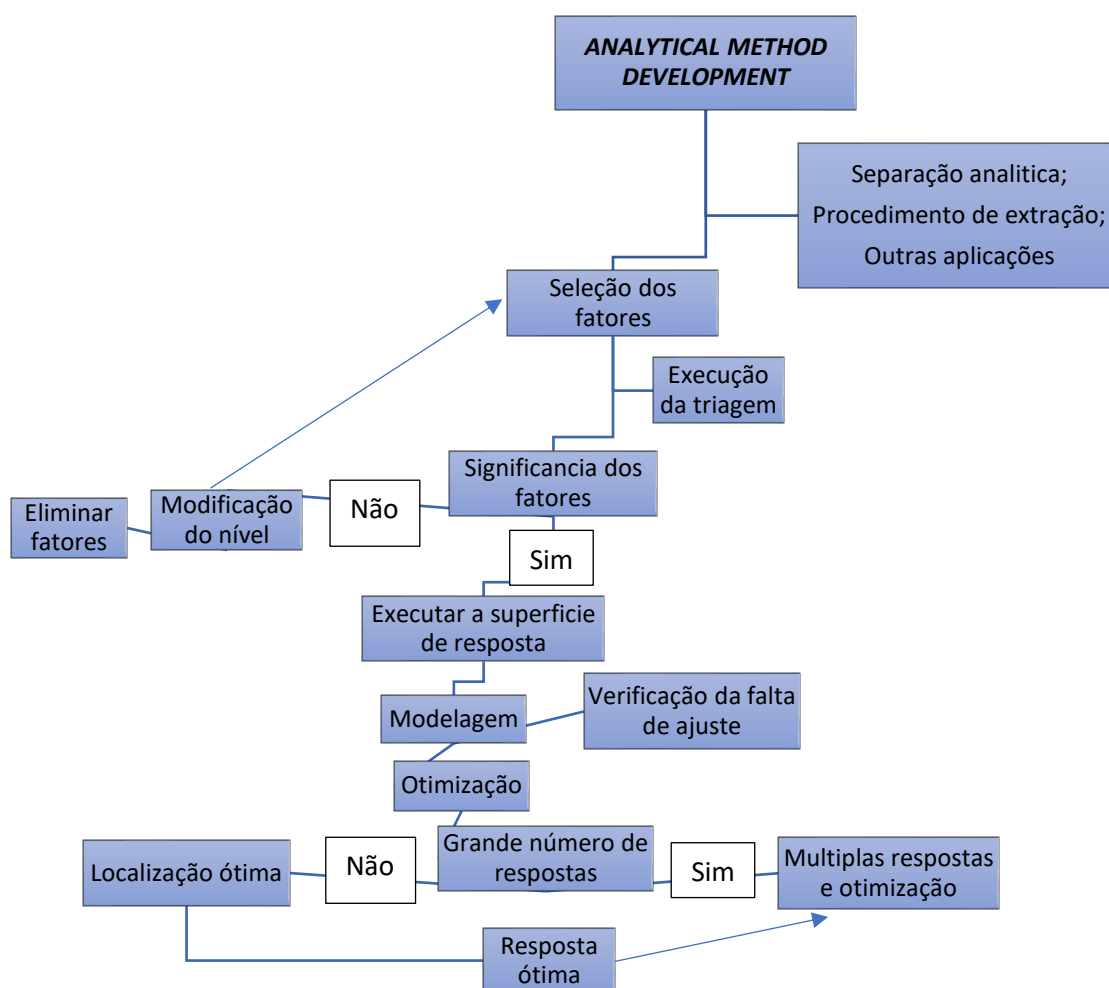


Figura 05: Fluxograma da tomada de decisão no desenvolvimento analítico

Fonte: [42]

A seleção de um projeto experimental deve seguir algumas especificações, como ter o conhecimento declarado dos objetivos e as informações conhecidas. Além disso, é necessário conhecer o número de fatores e interações a serem estudadas, bem como a validade estatística e eficácia de cada projeto. É importante que seja levado em consideração as restrições operacionais que o custo e o tempo podem originar. Dessa forma, para a execução dos experimentos e determinação das respostas, algumas etapas devem ser obedecidas:

- (a) As observações e erros devem ser variáveis aleatórias e independentes;

(b) Quando um número de experimentos ultrapassar um dia de análise, esses experimentos devem ser conduzidos em blocos, onde cada bloco corresponderia um dia ou sequência diferente;

(c) Na primeira instância é necessário aplicar cálculos para estimar os efeitos dos fatores em uma resposta. Uma estimativa está sempre sujeita a erros, e para decidir se o efeito é significativo ou não na escala, o desvio padrão do efeito deve ser conhecido, que também chamado de erro padrão de um efeito que pode ser calculado utilizando o (erro experimental, erro aleatório e incerteza experimental);

O erro aleatório acontece devido às causas comuns que remetem a variabilidade do processo, diante de observações que não podem ser explicadas por meio das variáveis em estudo. Durante a execução do preparo, deve-se garantir que não haja uma alta variação, pois ela pode levar a uma variação excedente por um erro que não corresponde ao método. A determinação do erro pode ser realizada com o uso de réplicas do ponto central do planejamento; em uma segunda abordagem utilizando os efeitos observados para dummies, ou como terceira abordagem, considerando dos efeitos insignificantes usando o algoritmo de *Dong* ou *Lenth basea* com a utilização de uma escala. [42]

Assim, a abordagem geral para a análise dos dados de uma triagem para cada resposta que é analisada deve estimar os efeitos dos fatores e examinar seus sinais e magnitude, bem como a construção de um modelo inicial para a resposta. Além disso, é importante realizar testes estatísticos e retificar o modelo desconsiderando todas as variáveis não significativas. [42]

A fim de verificar a adequação do modelo e suposições, deve-se realizar uma análise de resíduos. O efeito de cada fator em cada resposta é estimado como a diferença entre a resposta média dos experimentos com sinais positivos e a resposta média dos experimentos com sinais negativos. Uma triagem pode ser avaliada dentro de um modelo linear, visto que na maior parte dos modelos utilizados é possível observar como resultado final apenas o efeito primário. [42]

A TAB. 12 apresenta o planejamento experimental Plackett-Burman aplicado às condições do equipamento *Transferline*, que terá como intuito a maximização da área e atingir recuperações dos analitos próximos a 100%.

Tabela 12: Condições de *Headspace Transferline* avaliadas no Planejamento *Plackett-Burman* (Planejamento fatorial exploratório)

Experimento	Variável						
	1 ^o (1)	2 ^o (2)	3 ^o (3)	4 ^o (4)	5 ^o (5)	6 ^o (6)	7 ^o (7)
Níveis (+1) e (-1)	(+1): 90 (-1): 80	(+1): 30 (-1): 20	(+1): 20 (-1): 15	(+1): 1 (-1): 0,1	(+1): 100 (-1): 50	(+1): 10 (-1): 50	(+1):0,5 (-1): 1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1

1: Temperatura de incubação (°C); 2: Tempo de incubação (min); 3: Pressão de preenchimento (psi); 4: Pressão de equilíbrio (min); 5: Fluxo de purga da amostra (mL.min⁻¹); 6: Tempo de purga da amostra (min); 7: Injeção (min).

5.1.4 Definição dos fatores primários / Etapa 2 – Processar e analisar os dados da triagem

A aplicação do planejamento experimental é realizada em uniplicata, com a injeção de 1 (um) branco, 1 (um) teste, 1 (um) 100%, 1 (um) 40% e 1 (um) 240% para cada experimento. Como o objetivo desta etapa é avaliar o efeito de uma variável sobre a resposta com a definição dos fatores primários, foi realizado a avaliação utilizando a desejabilidade, por se tratar de 21 (vinte e uma) respostas.

As FIGS. 06 e 07 apresentam os resultados de acordo com o gráfico de probabilidade e de porcentagem de um efeito, respectivamente. Os efeitos avaliados equivalem a área de cada analito, recuperação a 40% e 240%, avaliados pelo método proposto. Quando se aplica a avaliação da desejabilidade global, o alvo deve estar definido em cada experimento. O objetivo foi de maximização os resultados de áreas e recuperação aproximada de 100% para cada analito no nível 40% e 240%. Desta forma, o resultado abaixo apresenta graficamente as considerações mencionadas para a desejabilidade global, onde os analitos levado em consideração para essa avaliação foram eles: Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano, Terc-butanol, Acetato de etila e Clorofórmio.

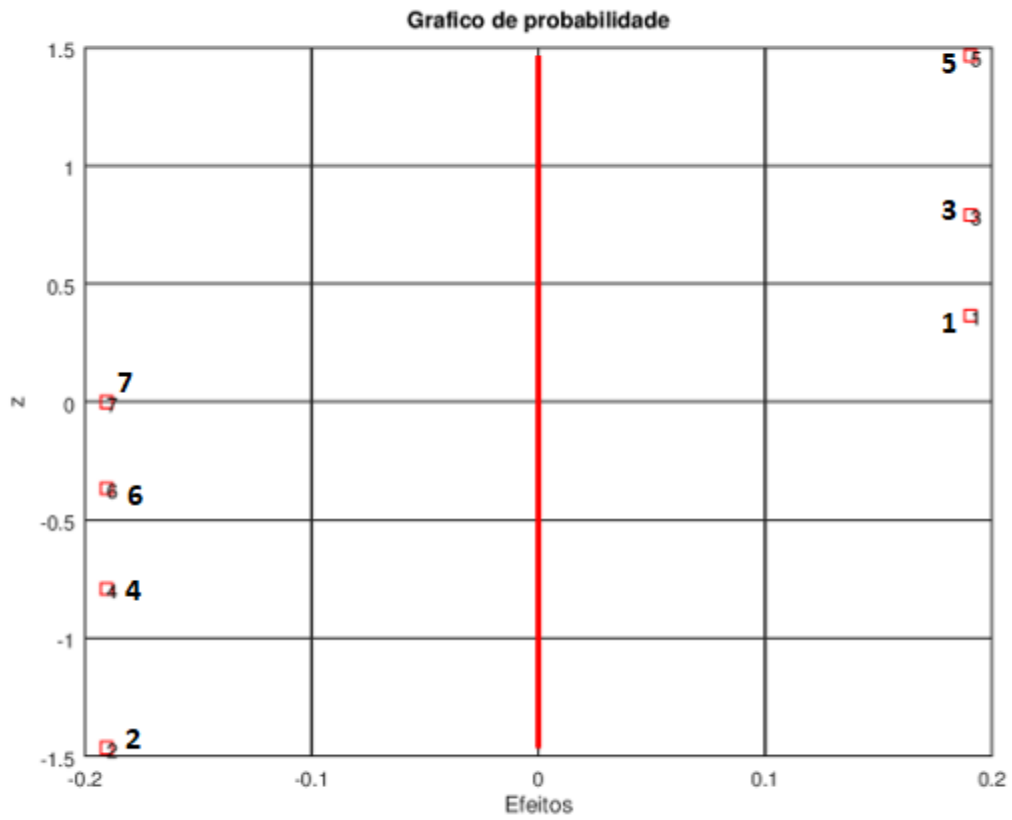


Figura 06: Gráfico de probabilidade global de cada efeito da desejabilidade

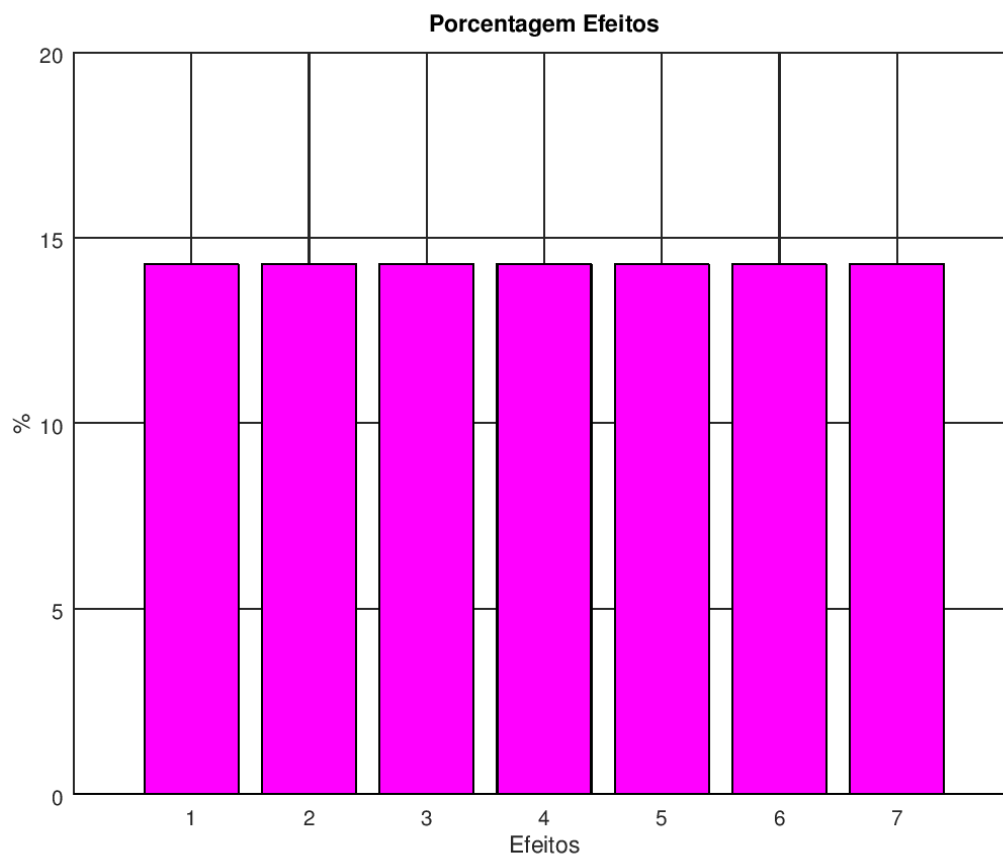


Figura 07: Gráfico representativo da porcentagem que cada efeito tem sobre a resposta da desejabilidade

A FIG. 6 demonstra que as variáveis 1, 3 e 5 têm efeito positivo, ou seja, para este parâmetro deixar a variável no nível (+)1 oferece o melhor resultado levando em consideração os todos os parametros avaliados e suas desejabilidades. Já para as variáveis 2, 4, 6 e 7 o efeito negativo significa que o nível (-)1 oferece um melhor resultado de recuperação no nível 40% e 240% levando em consideração o resultado ideal em comum entre todos analitos. Com o resultado apresentado na FIG. 07 é possível observar que cada efeito apresenta resultados significativos de 15% sobre a resposta. É apresentado na TAB. 13 a avaliação com o ajuste de acordo o resultado encontrado de desejabilidade global.

Tabela 13: Desejabilidade global da área e recuperação a 40% e 240%

Identificação Variáveis	Variáveis	Desejabilidade Global (%)			Condição favorável	Sugestão
		-1	+1			
1	Temperatura de incubação (°C)	80	90	19	Aumentar	90
2	Tempo de incubação (min)	20	30	-19	Diminuir	20
3	Pressão de preenchimento (psi)	15	20	19	Aumentar	20
4	Pressão de equilíbrio (psi)	0,1	1	-19	Diminuir	0,1
5	Fluxo de purga (mL.min ⁻¹)	50	100	19	Aumentar	100
6	Tempo de purga (min)	10	50	-19	Diminuir	50
7	Injeção (min)	0,5	1,0	-19	Diminuir	0,5

Também foi avaliado os resultados com o fracionamento da resposta obtida de área de acordo com a análise de desejabilidade global, tendo como objetivo a maximização da área. Conforme os resultados apresentados abaixo (FIGS. 08 e 09):

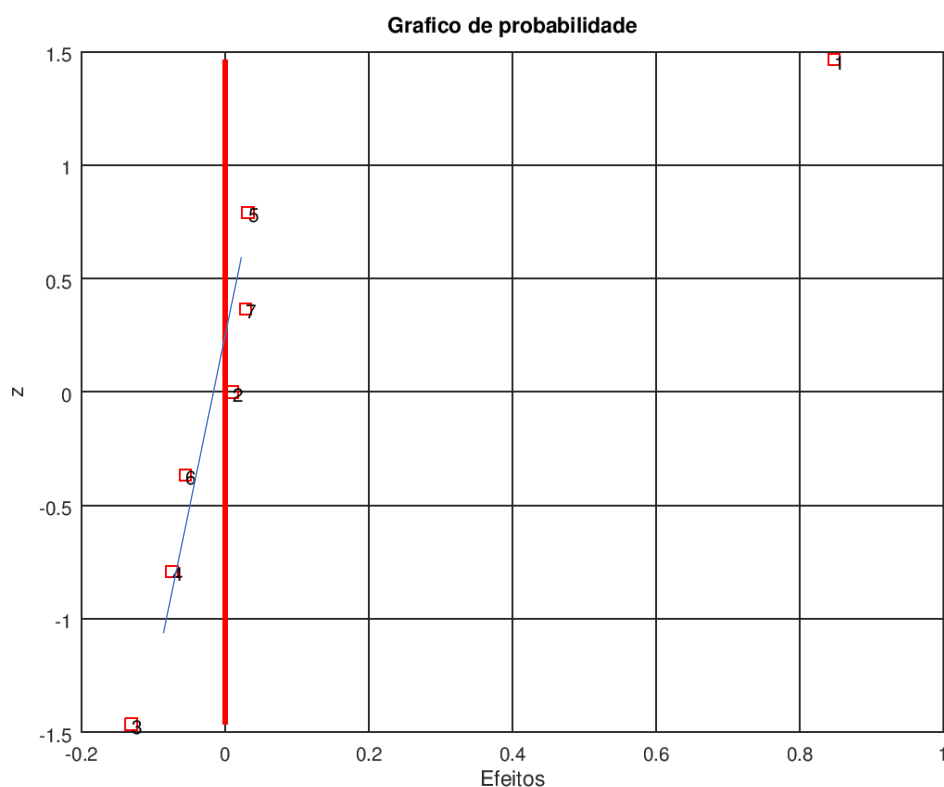


Figura 08: Gráfico de probabilidade baseado na desejabilidade das áreas

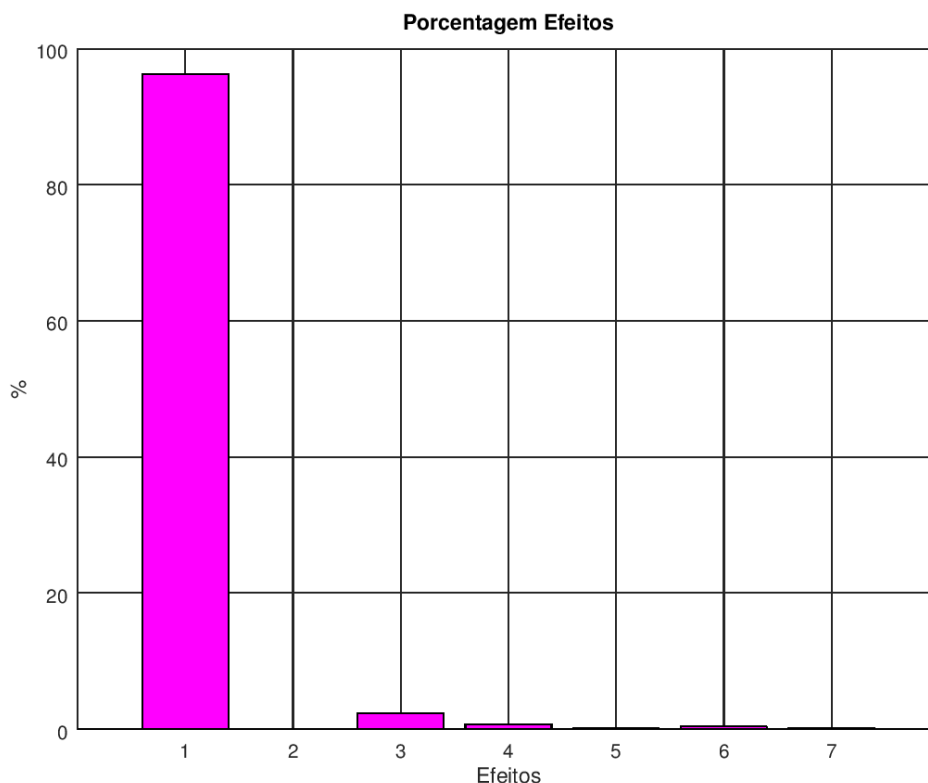


Figura 09: Gráfico de porcentagem baseado na desejabilidade das áreas

Com os resultados apresentados acima nas FIGS. 08 e 09 foi possível evidenciar que a variável 1(um) teve o efeito positivo sobre a resposta representando a maior área obtida, contudo para esta variável recomenda-se que a mesma seja trabalhada com o nível máximo (+1), ou seja, quanto maior a temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) maior será o resultado em área dos analitos. Já para a variável 3(três) considera-se um efeito negativo sobre a resposta, que nos remete que para essa variável indica-se trabalhar no nível (-)1, ou seja, quanto maior a pressão de preenchimento (psi) para a obtenção do melhor resultado final em todas as áreas dos analitos. Conforme demonstrado na (TAB. 14).

Tabela 14: Desejabilidade global entre áreas

Identificação Variáveis	Variáveis	-1	+1	Desejabilidade (%)	Condição favorável	Sugestão
1	Temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$)	80	90	84,0	Aumentar	90
2	Tempo de incubação (min)	20	30	1,0	Indiferente	**
3	Pressão de preenchimento (psi)	15	20	-13,1	Diminuir	15
4	Pressão de equilíbrio (psi)	0,1	1	-7,4	Diminuir	0,1
5	Fluxo da purga ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	50	100	3,2	Indiferente	**
6	Tempo de purga (min)	10	50	-5,6	Diminuir	10
7	Injeção (min)	0,5	1	2,8	Indiferente	**

Com a aplicação do planejamento de Plackett-Burman e avaliação dos resultados é possível identificar quais são as melhores condições de *Transferline* para se obter uma maior resposta de área entre os analitos, assim este resultado contribuiu de maneira a identificar as variáveis principais, e verificar qual teria um maior efeito.

As variáveis de maior impacto nas áreas foram a temperatura de incubação, pressão de preenchimento, pressão de equilíbrio e purga da sonda de amostra (*time*). Ao avaliar cada variável de maneira individual é observado o seguinte cenário: com o aumento da temperatura de incubação ocorre a maior colisão entre as moléculas, o que contribui para que a molécula tenda a permanecer na fase gasosa, logo aumentando a sua porção na fase gás, então, com o aumento da temperatura mais facilmente a molécula se desprende da fase líquida e conseqüentemente pode-se notar um aumento considerável da área dos analitos.

Ao comparar a TAB. 13 com a TAB. 14, pode-se observar que para a variável 1(um) o efeito continua positivo, no entanto, para a variável 3(três) foi observado a divergência entre o ótimo, onde ao considerar todas as respostas temos que aumentar a resposta seria o ideal, porém ao avaliar somente a área temos que diminuir. As demais variáveis tiveram resposta idênticas e algumas não apresentaram diferença entre o nível 1(+) e 1(-) por estar em um nível marginal de efeito sobre a resposta. A variável 3(três) foi a única que apresentou um sentido contrário de sinal, no entanto, foi considerado os resultados da desabilidade global considerando a TAB. 13 que leva em consideração todos os resultados obtidos para a validação do método.

Por fim, sabe-se que ao aplicar o planejamento experimental *Plackett-Burman* deve ser considerado a confusão entre as variáveis devido a curta matriz de experimentos, por isso, o mesmo é aplicado com o intuito de triagem dos dados e deve ser conduzido com objetivos pré-definidos como os utilizados de maximização das áreas e recuperação nos níveis baixo e alto bem próximas ao alvo de 100% de recuperação, onde a concentração adicionado sobre a matriz deve ser a mesma recuperada para cada analito avaliado, sendo eles: Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano, Terc-butanol, Acetato de etila e Clorofórmio. Assim, entendemos que a continuidade de novos experimentos para as condições de *Headspace Transferline* não foi necessária, pois o resultado obtido de recuperação e de área encontrados estavam dentro do esperado pra o método analítico, estando ele dentro da especificação definidas regulatoriamente, portanto atendendo a finalidade que se propõe.

5.2 Etapa 2

5.2.1 Identificação das Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC)

A identificação de todas as características de desempenho é necessária para que o método possa atender adequadamente os ATPs, de modo a expressar de maneira sucinta tudo aquilo que representa um impacto significativo para o não atendimento dos objetivos do método. Podemos dividir essas características em dois grupos, sendo eles de: variabilidade sistemática e a variabilidade aleatória. Com essa definição, podemos identificar junto a QRM quais são as características cruciais do método a serem consideradas como atributos críticos de qualidade (CQA's), para termos uma melhor identificação das características que podem de fato influenciar no resultado final. A TAB. 15 apresenta as características de desempenho do método analítico

Tabela 15: Características de Desempenho do Método Analítico (AMPC)

Elementos	AMPC	Objetivo	Variabilidade
Equipamentos	Injetor	Vaporização dos analitos	Sistemática
	Detector	Detecção gerada pela queima das substâncias orgânicas	Sistemática
	Tipo de injeção	Com divisão de amostra	Sistemática
	Fase Estacionária	Polaridade intermediária para que haja interação de todos analitos	Sistemática
	Programação de Forno	Atenda a separação necessária	Sistemática
	Volume morto	Pequeno intervalo de retenção	Aleatória
	Número de analitos	Determinado pelo fabricante	Aleatório
	Gás de Arraste	Que abranja a maior velocidade linear atingindo a maior número de pratos teóricos.	Sistemático
	Concentração Diluente	De acordo com ICH Q3C Perfil analito livre de impurezas, inerte e que não coelua com os analitos	Sistemático Aleatório
	Padrões	Padrões com contaminações secundárias de analitos	Sistemático
Método	Tempo de estabilidade das soluções	O maior tempo sem decaimento de teor	Aleatório
	Preparo das soluções	Com o menor número de diluição possível	Aleatório
	Tempo de análise	O menor tempo possível que atenda a seletividade	Aleatório
	Temperatura	Suficiente para a vaporização e eluição dos analitos	Sistemático
	Fluxo	De acordo com as dimensões da coluna	Sistemático
	Volume de injeção	De acordo com a capacidade do <i>linner</i>	Sistemático
Medida	Modo de injeção <i>Split/Splitless</i>	De modo a atender o melhor sinal analítico e bom perfil cromatográfico	Sistemático
	Número de pratos teóricos	> 20.000	Aleatório

Elementos	AMPC	Objetivo	Variabilidade
	Recuperação	90-107%	Aleatório
	Desvio padrão relativo (DPR)	$\leq 5,3$	Aleatório
	Avaliação de testes da linearidade	Resíduos, tendência, variabilidade, resposta linear	Aleatório
	Resolução	$\geq 1,5$	Aleatório
	Sinal ruído	≥ 10	Aleatório
	Fator de cauda	$\leq 2,0$	Aleatório
	Assimetria	$\leq 2,0$	Aleatório
	Tempo de retenção	Menor tempo com qualidade	Aleatório
	Resposta analítica	Maior sensibilidade	Aleatório
	Integração	O intervalo que contemple o início e termino da gaussiana	Aleatório
	Amostras	Amostra impuras	Sistemática
	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	LOD: ≥ 3 LOQ: ≥ 10	Aleatório
Ambiente	Temperatura	18 a 25°C	Aleatório
	Umidade	60%	Aleatório

5.2.2 Análise de risco (QRM)

Nesta avaliação foram contempladas duas ferramentas utilizadas para a QRM, sendo elas o Diagrama de Ishikawa e FMEA (Análise de Efeito e Modo de Falha).

O Diagrama de Ishikawa é utilizado como diagrama de causa e efeito e considerado uma ferramenta de qualidade que auxilia na investigação de uma problemática, que possibilita uma visão clara, organizada e sucinta, que contribui para o tratamento de não conformidades. Ao almejar a melhor eficiência do método, os fatores considerados para esta aplicação foram os CQA's.

Já para a aplicação FMEA, uma ferramenta utilizada para a previsão de falhas e QRM pertinentes a um processo, leva-se em consideração dados históricos do processo baseados na ocorrência, severidade e detecção da falha, tendo como resposta a probabilidade baixa, média e alta da mesma falha acontecer. Desta forma, pode ser gerado um plano de ação para prevenir a ocorrência de falha ou mitigar seu efeito. A FIG. 10 apresenta o diagrama de Ishikawa e a TAB. 16 apresenta a QRM por FMEA.

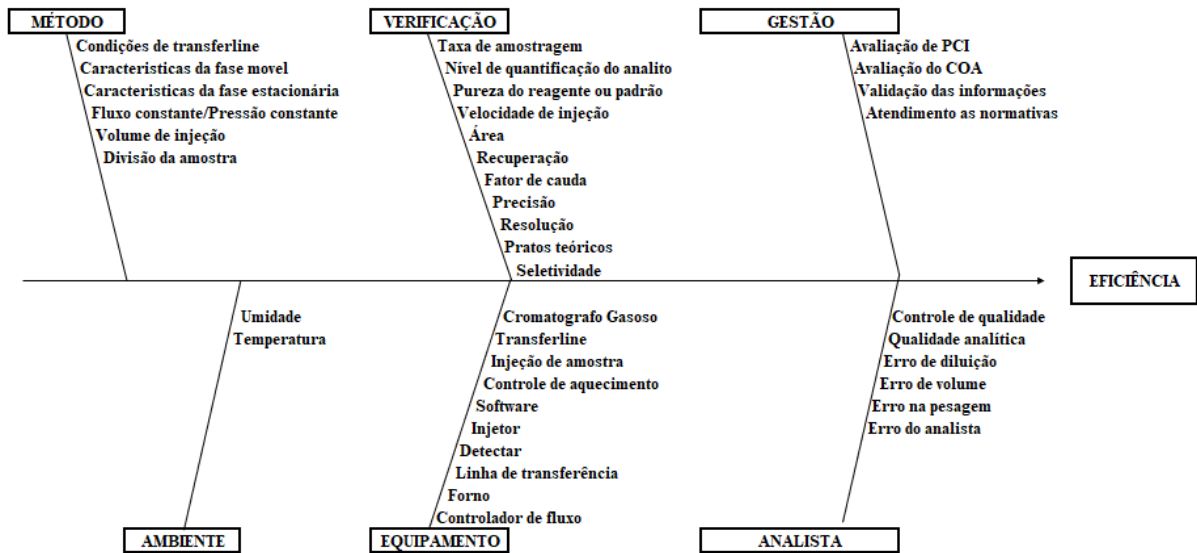


Figura 10: Diagrama de Ishikawa obtido para AMPC

Tabela 16: Análise de risco (QRM) por FMEA

Dano ou Efeito	Causa da falha	Ocorrência	Severidade	Detecção	RPN
Fornecedores de IFAs com controles distintas de solventes residuais.	Fornecedores com alto teores de impurezas devido à utilização de rotas de sínteses complexas e insumos de baixa qualidade. Ausência de etapas eficientes para a purificação do IFA.	1	8	1	8
Modificação da área correspondente ao ponto	Executor do preparo, vidraria utilizada inadequada, ausência de calibração.	3	3	3	27
Comparação ineficaz de padrões	Desenvolvimento de método não foi abrangente o suficiente para prever as possíveis contaminações dos diluentes e padrões.	4	15	4	240
Detecção incorreta do analito devido a presença de impurezas já existente na matriz.	Compra de reagente de qualidade inferior ao exigido	4	3	4	48
baixo teor do gás de arraste, detector contaminado.	Compra de cilindros com qualidade refutável e ausência de uma manutenção preventiva pós utilização	1	8	1	8
Alteração do tempo de retenção.	Coluna muito desgastada com perda de fase estacionária e comprimento da coluna reduzido devido ao reparo.	2	5	2	20
Modificação na separação, seletividade dos analitos.	Coluna com alto sangramento devido à perda gradual de fase estacionária	2	4	2	16
Ausência de interação, desgaste comprometendo resolução/cauda.	Comprimento, diâmetro e filme inadequado somado a fluxos superiores a sua capacidade obtendo uma menor interação com os pratos teóricos, ausência de interação da coluna para o analito.	3	15	3	135
Pico com cauda, ausência de resolução.					
Diluyente com baixo temperatura de ebulição e baixa estabilidade em temperatura ambiente.	Solventes que eluem em baixas temperaturas.	1	2	1	2
Alteração do tempo de retenção devido a reações secundárias, formação de impurezas	Escolha de filtros incompatíveis com o analito e diluyente.	2	9	2	36
Evaporação do diluyente e analito, perda ou concentração do analito	Analitos/diluentes com baixa temperatura de ebulição e instáveis em temperatura ambiente.	2	6	2	24
Aumento de impurezas, evaporação do diluyente. Precipitação do analito. Coleta errônea da fase extratora	Amostra impura, diluyente muito volátil, insolubilidade da matriz, desatenção durante o preparo.	5	9	5	225

Dano ou Efeito	Causa da falha	Ocorrência	Severidade	Detecção	RPN
Analito com baixa estabilidade em temperatura ambiente, devido à baixa estabilidade no meio, e temperatura de ebulição.	Analito instável	3	3	3	27
Excesso no volume de amostra, saturação detector com resultados questionáveis	Quantidade de amostra acima da capacidade do <i>linner</i> . Alta concentração da espécie	2	8	2	32
Alteração na recuperação. Aparecimento de picos que pode ser confundido com impurezas. Não detecção de impurezas por ficar retidas nos filtros. Formação de impurezas devido a interação.	Desenvolvimento com má escolha do filtro.	2	8	2	32
Alteração na recuperação, apresentando tendência em seus resultados	Instabilidade no equilíbrio entre as fases líquida e gasosa no <i>vial</i> .	4	8	4	128
Pressurização necessária para a estabilidade dos analitos	Instabilidade no equilíbrio entre as fases líquida e gasosa no <i>vial</i> .	4	8	4	128
Varição na recuperação devido a insolubilidade do padrão com o analito.	Transferência de volumes heterogênea	3	8	3	72
Falta de cuidado, aparecimento de impurezas	Descuido de preparo e baixa pureza de reagentes	4	4	4	64
Alta variação dos resultados	Desenvolvimento má avaliação durante a etapa.	2	8	2	32

Nesse caso, sendo considerado de 0 – 100 – risco baixo, 100 – 200 – risco moderado e > 200 – risco alto.

De acordo com os resultados apresentados na QRM por FMEA, será discutido um tratamento preventivo da falha considerada como média e alta, apresentando uma ação a ser tomada para evitá-la. A TAB. 17 sumariza as ações preventivas que serão tomadas.

Tabela 17: Ação preventiva baseada nos riscos médios e altos

Dano ou Efeito	Causa da falha	Ação Preventiva
Comparação ineficaz de padrões (Nível Alta)	Desenvolvimento de método não foi abrangente o suficiente para prever as possíveis contaminações dos diluentes e padrões.	Aquisição de diluentes com baixos níveis de impurezas, e devem ser escolhidos mediante a avaliação prévia do certificado analítico, buscando reagentes com grau de pureza elevado.
Pico com cauda, ausência de resolução (Nível Média)	Comprimento, diâmetro e filme inadequado somado a fluxos superiores a sua capacidade obtendo uma menor interação com os pratos teóricos, ausência de interação da coluna para com o analito.	Colunas que represente uma resolução $\geq 2,0$, com fator de cauda igual a $1 \pm 0,5$, colunas que representam maior interação com o analito, buscar por coluna que apresenta o maior filme, menor diâmetro e maior comprimento.
Aumento de impurezas, evaporação do diluente. Precipitação do analito. Coleta errônea da fase extratora (Nível Alta)	Amostra impura. Diluente muito volátil. Insolubilidade da matriz. Desatenção durante o preparo.	Avaliação prévia das impurezas da amostra. Diluentes com ponto de ebulição acima de 60°C , agentes que contribui como estabilizante da amostra, inibindo o efeito matriz. Informar ao analista responsável da bancada, e corrigir o erro demonstrando através de um treinamento a ação correta.
Alteração na recuperação, apresentando tendência em seus resultados (Nível Média)	Instabilidade no equilíbrio entre as fases líquida e gasosa no <i>vial</i> .	Mudança do volume de líquido do <i>vial</i> , com o ajuste da fase orgânica e inorgânica, ou realizar a adição de sal dentro do <i>vial</i> , com o objetivo de anular o efeito da matriz.
Pressurização necessária para a estabilidade dos analitos (Nível Média)	Instabilidade no equilíbrio entre as fases líquida e gasosa no <i>vial</i> .	Aplicação de planejamentos experimentais <i>Plackett-Burman</i> ou fatorial para identificar os efeitos significativos, aplicando a desejabilidade global.

5.2.3 Identificação dos Atributos críticos de Qualidade (CQA)

Nesse estágio devem ser incorporados no planejamento junto com as medidas quantitativas os CMPs do método sendo eles os parâmetros críticos do método. Ou seja, aqueles levantados na triagem do método junto com a avaliação de risco considerada para o mesmo. Esta etapa fornece uma base para a compreensão científica da relação entre as quantidades de variáveis encontradas na entrada com a quantidade. Quando se opta por aplicar a superfície de resposta para a obtenção do melhor resultado de acordo com o

resultado esperado. Entende-se que este resultado é baseado nos critérios/especificação que remete a qualidade no desenvolvimento do método. Segue a definição dos atributos críticos de qualidade do método na TAB. 18.

Tabela 18: Atributos críticos de qualidade (CQA's)

CQA	Objetivo	Variabilidade
Fase Estacionária	Polaridade intermediária para que haja interação de todos analitos	Sistemática
Programação de Forno	Atenda a separação necessária	Sistemática
Concentração	De acordo com ICH Q3C	Sistemático
Diluente	Perfil analito livre de impurezas, inerte e que não coelua com os analitos	Aleatório
Padrões	Padrões com contaminações secundárias de analitos	Sistemático
Preparo das soluções	Com o menor número de diluição possível	Aleatório
Fluxo	De acordo com as dimensões da coluna	Sistemático
Recuperação	90-107%	Aleatório
Desvio padrão relativo (DPR)	$\leq 5,3$	Aleatório
Avaliação de testes da linearidade	Resíduos, tendência, variabilidade, resposta linear	Aleatório
Resolução	$\geq 1,5$	Aleatório
Integração	O intervalo que contemple o início e termino da gaussiana	Aleatório
Amostras	Amostra impuras	Sistemática

A escolha dos CQA's foi baseada na QRM e em critérios que determinam a aprovação e/ou reprovação de um método analítico. Por este motivo, foi considerado como um fator crítico que demanda cuidado e atenção durante o desenvolvimento de método.

5.2.4 Definição dos fatores secundários

O planejamento Plackett-Burman teve como objetivo identificar os fatores primários, e os resultados encontrados entre as variáveis apresentaram uma ordem de grandeza semelhante para cada variável. Assim, observou-se que todas as variáveis apresentadas tiveram um efeito significativo sobre a resposta, ou seja, não foram obtidos fatores secundários já que todos os fatores foram considerados primários.

5.2.5 Criar um DoE da otimização/Realização de novos experimentos – Etapa 3 – Tratamento e processamento de dados

Não é necessário a aplicação de novos experimentos por razão da etapa anterior ter atendido os fatores de qualidade, como resolução cauda, sinal ruído e perfil cromatográfico. Entende-se que a melhor condição foi obtida completamente devido o

atendimento dos objetivos, proveniente de uma boa execução da etapa exploratória a qual gerou subsídios para a execução da próxima etapa.

5.3 Etapa 3

5.3.1 Estudo teórico de robustez

De acordo com a legislação vigente RDC 166/2017, os parâmetros a serem contemplados em uma validação analítica devem garantir a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Para o parâmetro robustez, existem três tipos de variações que são exigidas, sendo elas: variação de lote/fabricante de coluna cromatográfica, variação do fluxo do gás de arraste e variação de temperatura. (RDC 166/2017).

Para ser considerado robusto, um método deve sofrer pequenas e deliberadas alterações sem que haja perda da qualidade analítica. Desta forma, as condições mencionadas na RDC 166/2017 têm por objetivo testar a qualidade do método. Quando se estuda as variáveis fluxo do gás de arraste e temperatura do forno, sabe-se que com o aumento do fluxo há uma pequena perda de seletividade entre os analitos, impactando diretamente na resolução entre os picos. No entanto, nota-se um pequeno ganho em redução do tempo de corrida remetido à eluição precoce dos analitos, conseqüentemente, quando se considera a redução desses dois parâmetros, temos a retenção maior na eluição dos analitos, alargamento do pico e aumento do tempo de corrida.

Diante da aplicação atual de avaliação da robustez, não é abrangido o efeito que as variáveis exercem entre si, tornando-se a aplicação risória mediante o potencial que pode ser atingido quando considerado a aplicação de um planejamento experimental para a este parâmetro.

Tendo em vista a problemática, a proposta para este estudo de robustez é baseada na aplicação de um planejamento analítico de composto central que terá como um dos objetivos avaliar a superfície de resposta (RS), avaliar a interação entre as variáveis e definir a MODR visando a flexibilização do modelo experimental, assim, garantindo a flexibilização baseada em dados de que o método atende com qualidade a uma região previamente e experimentalmente definida.

5.3.2 Avaliação empírica das condições obtidas através da otimização

Na TAB. 19 será apresentado o modelo utilizado para a avaliação dos dados do planejamento experimental, que servirão de subsídio para a avaliação da MODR e linearidade do método analítico.

Tabela 19: Plotagem do modelo de diagnóstico

Plot	Avaliação	Resposta esperada	Resultado inadequado	
			Resposta inadequada	Ação sugerida
Probabilidade normal	Distribuição normal do resíduo	Linha reta	Em formato "S" da curva	Transformação da resposta
Resíduo vs. Previsto	Variância constante dentro do intervalo	Dispersão aleatória	Expandindo a variância	Transformação da resposta
Resíduo vs. Ordem da corrida	Variáveis que podem ser influenciado a resposta durante o experimento	Dispersão aleatória	Tendência	Randomização e bloqueio de experimentos
Resíduo vs. Fator	Variância não contabilizada pelo modelo dependendo do diferente nível de um fator	Dispersão aleatória	Curvatura pronunciada	Novo modelo de regressão
Estudentizado Residual Extremo	Identificação de corrida anormal	Resíduos extremos $\leq 3,5 A_s$	Resíduos extremos $> 3,5 A_s$	Se é uma causa especial identificada como outlier, este pode ser rejeitado
Alavanca	Pontos com grade influência no formato do modelo	Ponto alavanca $< 2 A_L^b$	Ponto alavanca = 1	Pontos adicionais ou replicata para o modelo
DFFITS (diferença formato do modelo)	Influência de cada ponto nos valores previstos	$DFFITS < 2/\sqrt{P/N^c}$	$DFFITS > 2/\sqrt{P/N^c}$	Pontos adicionais ou replicata para o modelo
DFBETAS (diferença betas)	Influência de cada ponto nos valores do coeficiente de regressão	$DFBETAS < 2/\sqrt{P/N^c}$	$DFBETAS > 2/\sqrt{P/N^c}$	Pontos adicionais ou replicata para o modelo
Cook's Distância (CD)	Mudança na magnitude da regressão se a causa é omitida	Ponto CD $< 2 A_D^d$	Ponto CD $> 2 A_D^d$	Se é uma causa especial identificada como outlier, este pode ser rejeitado

a: Desvio do padrão; b: alavanca média; c: onde P é o número do parâmetro modelo e N é o número de experimentos; d: Média Cook's distância. Fonte: [43]

A avaliação dos dados da Análise de Variância (ANOVA) devem ser comparados com a avaliação do gráfico de resíduos padronizados e studentizados para que seja possível detectar a influência de cada experimento na resposta do experimental, com a detecção de pontos alavanca ou *outlier*.

Como auxílio na avaliação da normalidade podemos seguir com dois modos de avaliação, sendo eles:

Transformação da resposta: Essa possibilidade é baseada na modificação dos dados obtidos, após o não atendimento da avaliação inicial do modelo proposto, podendo ela ser aplicada em dois casos: (a) em que o intervalo da resposta é bastante grande; (b) as suposições do modelo, ou seja, normalidade e homocedasticidade não são completas. Para que ocorra a transformação da resposta, aplica-se uma função matemática de maneira igualitária.

Localização ótima: pode ser identificada a partir dos gráficos de superfície de resposta tridimensional e de contorno.

5.4 Etapa 4

5.4.1 Validação da metodologia proposta

A validação de método analítico representa uma etapa crucial do processo, em que expõe o mesmo a testes confirmativos de confiabilidade, asseguração e credibilidade na quantificação de rotina. Desta forma, as evidências deverão demonstrar que o método analítico atende à finalidade a que se propõe.

Por se tratar de um desenvolvimento local de método analítico, é compreendida a necessidade de seguir com a validação completa com os parâmetros regulados pela RDC 166/2017, sendo eles: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e estabilidade. Ao longo desta etapa serão apresentados os resultados obtidos em cada parâmetro.

A seletividade é a capacidade que o método analítico possui em identificar ou quantificar os analitos de interesse, inequivocadamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, tais como impurezas e componentes da matriz. Esta capacidade de separação é medida pela resolução (R), o qual pode ser definida como a razão da distância entre os dois picos e a largura média desses picos a meia altura ($h/2$).

As medidas foram realizadas de modo a garantir a identificação individual de cada um dos padrões de referência e de maneira composta levando em consideração todos os analitos presentes no certificado analítico (COA) dos três fabricantes, por mais que tenha sido optado pela separação dos analitos em mais dois métodos auxiliares para a quantificação, pensando em qual seria a melhor condição para cada analito e sabe-se que os demais analitos deve comprovar a seletividade e especificidade a cada método analítico testado, para este vamos abordar a avaliação dos analitos metanol, acetona, 2-propanol, diclorometano e terc-butanol.

Para o preparo de cada padrão foi utilizado nas especificações definida pelo ICH que leva em consideração a exposição diária permitida em relação a dose diária que pode ser ingerida do fármaco. Desta forma, será apresentado na FIG. 11 o cromatograma de seletividade composto por todos os solventes a serem controlados.

Neste método, a seletividade será avaliada pela análise da eluição dos analitos das seguintes soluções: Branco, Padrão Metanol, Padrão Acetona, Padrão Diclorometano, Padrão Terc-butanol, Padrão Acetato de etila, Padrão Clorofórmio, Padrão Trietilamina, Padrão Dimetilsulfóxido, Padrão 2-Propanol, Padrão Ciclohexano, Padrão Tolueno, Teste Fabricante 1, Teste Fabricante 2, Teste Fabricante 3, Seletividade e Seletividade Teste Fabricante 1, Seletividade Teste Fabricante 2 e Seletividade Teste Fabricante 3.

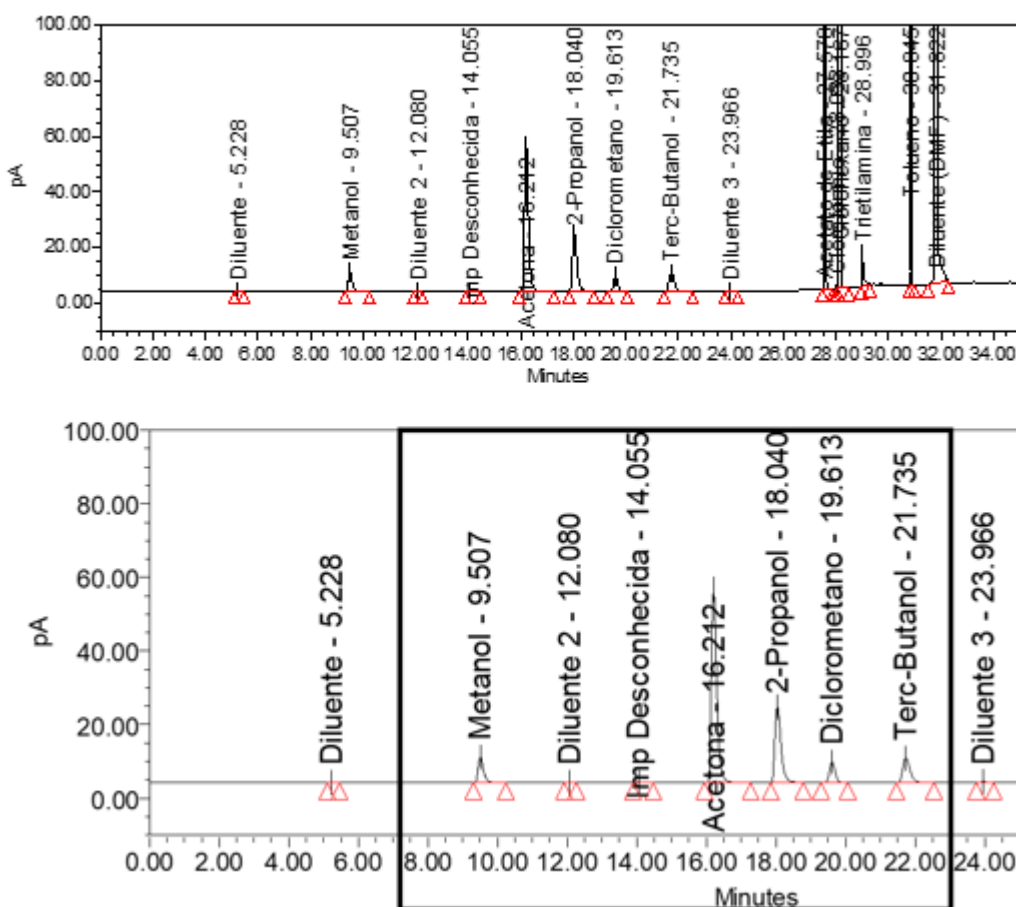


Figura 11: Cromatograma da solução seletividade com e sem ampliação nos analitos de interesse

Com a apresentação da separação acima temos a compreensão de que se trata de uma solução composta por todos analitos a serem controlados, independente de qual método tenha sido escolhido para o controle, e este seria o pior caso, em que se tratando de uma situação real, em que todos os analitos possa estar presentes em uma única amostra, e mesmo assim não haveria interferência na quantificação e separação. Com isso,

foi obtido êxito com o resultado não havendo coeluição de nenhum dos padrões com os analitos de interesse, e nem com as impurezas adjacentes proveniente da matriz ou do diluente.

A coluna optada para a separação dos componentes apresenta polaridade média, sendo classificada na USP como G43, a composição da fase estacionária: 6% Cianopropilfenil 94% dimetilpolisiloxano de 60 m x 0,25 mm x 1,4 µm. Com a utilização desta coluna foi possível atender a separação esperada para o método analítico proposto.

Em seguida, na TAB. 20 serão apresentados o tempo de retenção de cada padrão e a resolução apresentada na Solução Seletividade teste de cada fabricante 1, 2 e 3.

Tabela 20: Tempos de retenção e resolução dos analitos de interesse na Solução Seletividade Teste de todos os fabricantes

Picos de Interesse	Tempo de retenção (min)	Resolução ($\geq 1,5$)	Tempo de retenção (min)	Resolução ($\geq 1,5$)	Tempo de retenção (min)	Resolução ($\geq 1,5$)
	Fabricante 1		Fabricante 3		Fabricante 2	
	Diluyente	5,232	NA	5,243	NA	5,241
Metanol	9,510	17,3	9,510	15,8	9,506	15,8
Diluyente 2	12,078	8,8	12,082	9,6	12,068	9,2
Impureza Desconhecida	14,091	6,1	14,092	5,8	14,076	6,4
Acetona	16,209	6,6	16,212	5,8	16,207	6,7
2-Propanol	18,042	6,1	18,042	6,1	18,037	6,0
Diclorometano	19,609	5,0	19,614	5,0	19,618	5,0
Terc-butanol	21,728	6,1	21,726	6,0	21,724	6,0
Diluyente 3	23,975	5,9	23,961	5,8	23,970	5,6
Acetato de Etila	27,580	16,4	27,579	16,3	27,580	15,0
Cloroformio	28,032	6,6	28,029	6,8	28,030	6,7
Ciclohexano	28,168	1,9	28,168	2,0	28,169	1,9
Trietilamina	29,003	8,3	29,054	8,0	29,039	7,0
Tolueno	30,845	21,4	30,845	18,4	30,845	16,4
Diluyente Dimetilformamida	31,824	11,1	31,821	11,3	31,818	11,6

Com o cromatograma acima é possível comprovar que todos os analitos quantificados por este método exercem uma separação maior ou igual a 1,5. Esse resultado demonstra o bom atendimento do método analítico, com a qualidade esperada e assegurada a partir do atendimento aos critérios de especificação empregados.

A linearidade do método analítico é definida pela capacidade do método em demonstrar a sua proporcionalidade quando ao aumento ou redução da concentração, onde espera-se que a resposta observada seja diretamente proporcional a essa alteração dentro

de uma faixa de trabalho estabelecida, com no mínimo 5 pontos em diferentes concentrações e 3 réplicas verdadeiras de cada ponto.

Os resultados obtidos serão demonstrados na TAB. 21, comprovando o atendimento aos critérios avaliados: demonstração da significância do coeficiente angular (inclinação da reta), coeficiente linear (intercepto com o eixo y), coeficiente de correlação (R), Análise de Variância (ANOVA), análise de *outliers* dos resíduos padronizados, análise da homogeneidade da variância dos resíduos, Teste F, e avaliar resíduos padronizados resultante da regressão linear.

Tabela 21: Resultados da avaliação da linearidade de Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA – Metanol, Acetona, Diclorometano, 2-Propanol e Terc-butanol	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do Intercepto – Metanol, Acetona, Diclorometano e Terc-butanol	Intercepto igual a zero.
Teste do Intercepto – 2-Propanol	Intercepto significativo
Coeficiente de Correlação de Pearson – Metanol e Terc-Butanol	R = 0,9999 que é maior que o proposto (0,99)
Coeficiente de Correlação de Pearson – Acetona	R = 0,9998 que é maior que o proposto (0,99)
Coeficiente de Correlação de Pearson – 2-Propanol	R = 1 que é maior que o proposto (0,99)
Coeficiente de Correlação de Pearson – Diclorometano	R = 0,9992 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos – Metanol, Acetona, Diclorometano, 2-Propanol e Terc-butanol	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade – Metanol, Acetona, Diclorometano, 2-Propanol e Terc-butanol	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta – Metanol, Acetona, Diclorometano, 2-Propanol e Terc-butanol	Não detectamos pontos extremos
Teste de independência das observações – Metanol, Acetona, Diclorometano, 2-Propanol e Terc-butanol	Não detectamos dependência das observações

a: Resumo das Conclusões do estudo de linearidade (Método dos Mínimos Quadrados Ponderados).

A partir de todos os resultados apresentados, pode ser observado na TAB. 21 que o teste apontou que o intercepto é significativamente diferente de zero para o analito 2-Propanol, onde o maior impacto foi observado no nível mais baixo, ou seja, nível de concentração 40%, sendo que a variação encontrada na medição do intercepto foi de aproximadamente 1,95%. Ao considerar o impacto deste valor sobre o resultado, nota-se que o mesmo se encontra abaixo do valor em módulo para a especificação da exatidão,

que seria de 17%, e que o próprio erro do instrumento em relação a repetibilidade amostral é de 3%. Portanto, como o resultado encontrado está abaixo da variação adotada para o método analítico na precisão e exatidão, e visto que os resultados foram precisos e exatos, incluindo o ponto mais baixo, conclui-se de fato o intercepto não passar em zero não afeta a quantificação do solvente 2-propanol, assim passará a ser adotado como não significativo, não sendo necessária a inclusão de uma curva para quantificação em rotina, e desta forma, seguimos com a avaliação por meio da injeção de ponto único o 100%, em relação a quantidade já presente na matriz.

As avaliações estatísticas para os solventes metanol, acetona, 2-propanol, diclorometano e terc-butanol apresentaram um ponto extremo (*outlier*) e influente, sendo ele o ponto 80% da curva 1, e foi necessário a exclusão deste ponto para uma nova avaliação da linearidade. Visto que os valores extremos podem ser retirados do conjunto de dados em um máximo de 22,2%, conforme preconiza o Manual de Garantia da Qualidade Analítica – MAPA, por isso, compreende que o ponto não faz parte do conjunto de dados, assim a melhor forma de expressar a curva é não o incluir. [6]

A exclusão pode ser realizada desde que se respeite o “n” mínimo de 5 níveis com 3 replicatas cada e não se exclua nenhum nível de concentração inteiro. O parâmetro foi realizado com 7 níveis e 4 replicatas cada, e dessa forma a exclusão do ponto não trouxe prejuízo na avaliação dos graus de liberdade. Após a retirada deste ponto, os testes estatísticos se mostraram satisfatórios e atenderam todos os critérios previamente estabelecidos.

As análises estatísticas foram realizadas no relatório *Action Stat*® e demonstraram cumprimento dos critérios estabelecidos para o parâmetro de linearidade. Considera-se, então, o método linear, homocedástico, normal, independente e sem valores extremos para análise dos solventes residuais Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol.

A linearidade tem a capacidade de avaliar a resposta detectada para cada analito frente a diferentes concentrações, que atendam uma faixa linear, desde que respeitando a especificações requeridas no guia ICH Q8 R2.[16]

Este guia apresenta os limites para controle dos solventes, Acetona e 2-Propanol a 5000 ppm (Classe 3), Diclorometano a 600 ppm (Classe 2), Terc-butanol a 1000 ppm (Classe 2) e Metanol a 3000 ppm (Classe 2), assim, como a especificação é definida em teor, considerando que o teor é a resultante da massa do analito sobre a massa de amostra. Portanto, a especificação base para cálculos e comparação de resultados é referente a 100%, ou seja, o limite máximo permitido que cada analito pode atingir em uma amostra em condições normais. As análises foram realizadas utilizando a quantificação de quatro

curvas analíticas em sete níveis, os quais foram: 40, 80, 100, 120, 160, 200, 240% compreendendo o intervalo de concentração referente a especificação para cada solvente residual.

Pode-se observar que todos os solventes apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,99 no intervalo estudado, esses valores demonstram que os dados apresentaram um ótimo ajuste linear, obtendo-se a correlação entre os dados, que demonstraram que o modelo linear atende a finalidade proposta e conforme a avaliação realizada pelo *Software Action Stat®*. Na qual foi apresentado um resumo por meio da TAB. 21 que mostra o resultado final de cada teste aplicado para a análise de cada solvente residual.

A avaliação da linearidade em um conjunto de dados é baseada em testes de hipótese, avaliação estatística e gráfica, no qual leva em consideração ser significativo ou não mediante a hipótese apresentada.

O teste F avalia a significância do modelo linear, sendo que o resultado encontrado para o coeficiente angular foi significativo, o qual é desejável e demonstra que o método possui inclinação na reta e quando avaliado juntamente com o coeficiente de correlação Pearson mostra que o método apresenta correlação entre os eixos de concentração por área, contendo o ajuste linear adequado ao aumento de concentração dentro da faixa de trabalho estudada de 40% a 240% e a resposta proporcional em área, assim, representando o atendimento aos critérios de aceitação definidos pela Agencia reguladora. [46]

A ANOVA é utilizada para descrever um modelo de regressão linear. Há diversas maneiras de se avaliar a variabilidade total dos seus dados, podendo ela ser compreendida de duas formas: uma com a comprovação do modelo e outra em função do erro. Em outras palavras, a ANOVA tem como objetivo avaliar a qualidade do ajuste do modelo de regressão linear. A aplicação da técnica estatística requer comparação de três ou mais grupos em amostras independentes, permitindo avaliar a média da população baseada na análise das variâncias amostrais. É esperado homocedasticidade entre as variâncias amostrais.

A avaliação dos parâmetros estatísticos da linearidade pelo teste de Breusch-Pagan é fortemente utilizada para avaliar homocedasticidade. Com a aplicação do teste de Breusch-Pagan foi possível avaliar o modelo com o nível de significância de 95%, ou seja, comprovar por meio do p-valor que todos os resultados se mostraram superiores à 0,05, o que nos leva a um modelo homoscedástico que apresenta variâncias não-tendenciosas ao longo do modelo linear, sendo estatisticamente iguais. [47]

Outra avaliação empregada é a verificação da dependência das observações, que demonstra a tendência pela análise de regressão. Por meio da distribuição entre os resíduos é possível identificar se há essa tendência na disposição dos resultados de resíduos, sendo ele de maneira consecutiva com o sinal semelhante, sendo ele negativo ou positivo, representando que há uma dependência entre as observações. Os resultados encontrados para todos os solventes analisados não apresentaram dependência entre as observações de acordo com o teste de Durbin-Watson. [48]

A avaliação da normalidade tem como objetivo detectar resultados que pertencem a uma distribuição normal em nível de significância estabelecido de 95% de confiança, ou seja, mostrar que os dados pertencem a uma população normal. Para esta avaliação utilizamos o teste de Shapiro-Wilk, que é baseado na estatística W e leva em consideração a população amostral, então, quanto maior o número de observações, melhor será a representatividade do teste, obtendo maior probabilidade de que o resultado apresente uma distribuição normal. Os solventes analisados apresentaram uma distribuição normal entre os resíduos, demonstrando que os dados pertencem a uma população normal. [49]

Contudo, ao aplicar todos os testes estatísticos para a avaliar os resultados, foi possível evidenciar o cumprimento aos critérios estabelecidos para a avaliação da linearidade para os analitos Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol. Os resultados atenderam a cada avaliação em que o resultado foi exposto, assim demonstra-se um método linear para todos os solventes analisados e que atende aos requisitos pré-estabelecidos para avaliação de Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina.

No Limite de Quantificação (LOQ), o objetivo é avaliar a menor quantidade de cada analito que garanta um resultado preciso, linear e exato determinando o início da faixa de trabalho da linearidade. Este resultado deve demonstrar o atendimento de no mínimo um sinal ruído superior a 1:10. Para este método, a concentração definida como o nosso LOQ foi no nível de concentração de 40%, então, para cada analito este foi o limite mínimo a ser quantificável.

A TAB. 22 trará a apresentação do sinal/ruído encontrado para cada analito a ser quantificado no método:

Tabela 22: Relação sinal/ruído

Analito	Relação sinal/ruído			Especificação
	1 ^a Injeção	2 ^a Injeção	3 ^a Injeção	
Metanol	358	245	269	> 10
Acetona	2703	1885	2128	

2-Propanol	1072	744	839
Diclorometano	338	232	264
Terc-butanol	364	250	284

a= Resultados adquiridos na linearidade.

A partir da definição do LOQ, entende-se que abaixo daquele limite quantificável estabelecido de 40% não é possível quantificar com certeza o resultado, por mais que ele seja detectado. Portanto, todos os resultados que demonstrarem teores inferiores aos resultados abaixo serão ser reportados como menor ou igual ao limite de quantificação, sendo ele:

- Metanol: 1197,50 µg por grama de amostra;
- Acetona: 1995,58 µg por grama de amostra;
- Terc-butanol: 398,16 µg por grama de amostra;
- 2-Propanol: 1997,84 µg por grama de amostra;
- Diclorometano: 239,26 µg por grama de amostra.

A agência reguladora estabelece o sinal ruído mínimo de 1:10, como podemos observar com os resultados acima este critério foi atendido e os resultados variaram entre si, isso se dá pela diferença de especificação adotada para dada analito e intensidade frente ao detector. Desta forma, como o sinal ruído reflete a variação da linha de base em relação a um sinal verdadeiro, podendo ele oscilar durante a análise. [4]

A faixa de trabalho a ser utilizada em um método analítico deve ser capaz de contemplar o intervalo definido e garantindo que haja o atendimento da legislação vigente ou superior de acordo com a finalidade pretendida. Durante a etapa de desenvolvimento ocorre a validação da faixa de trabalho em um determinado intervalo linear, e conseqüentemente durante a etapa de validação este intervalo é validado. A concentração estabelecida durante o desenvolvimento do método analítico foi de 40% a 240%, sendo que a distribuição entre os pontos foi realizada de maneira equidistante, e também com um número de réplicas de 4 por ponto. Portanto, temos que a faixa de trabalho vai do limite inferior, ou seja, limite de quantificação até o limite superior de alcance para o método, sendo que essa faixa de resposta depende da limitação do sistema ou equipamento de medição, mais para este caso atendeu fielmente o objetivo do método. [4]

Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão

Para a avaliação da precisão, foi considerado a avaliação dos pontos baixo (40%), médio (120%) e alto (240%). Para este preparo, foram consideradas réplicas puras pois a confirmação deste resultado remete a uma etapa importante da qualidade do método

proposto e a capacidade de reproduzi-lo em meio a uma rotina analítica de transferência e liberação. Com isso, os resultados serão reportados conforme as (TABS. 23, 24, 25, 26 e 27).

Tabela 23: Precisão e exatidão – Metanol

Identificação	Precisão 1º dia		Exatidão		Precisão 2º dia		Intermediária
Identificação	Teor calculado ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Teor teórico ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	Recuperação (%)	Teor calculado ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	DPR (%)
40%	1228,05	1,0	1196,26	103	1203,84	0,7	1
	1220,94		1196,02	102	1199,50		
	1204,01		1194,16	101	1215,58		
120%	3580,92	0,7	3588,77	100	3591,37	1,4	1
	3599,02		3588,05	100	3565,09		
	3550,75		3582,47	99	3665,22		
240%	7100,55	0,8	7177,54	99	7139,65	1,6	1
	7217,19		7176,10	101	7030,21		
	7138,55		7164,94	100	7261,43		
Especificação (%)	≤ 5,3		90 – 107		≤ 5,3		≤ 8

a= Resultados adquiridos na linearidade; b= teor experimental do analito em μg por grama de amostra.

Tabela 24: Precisão e exatidão – Acetona

Identificação	Precisão 1º dia		Exatidão		Precisão 2º dia		Intermediária
Identificação	Teor calculado ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Teor teórico ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	Recuperação (%)	Teor calculado ($\mu\text{g.g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	DPR (%)
40%	1952,15	0,7	1993,51	98	1946,33	2,9	2
	1970,94		1993,11	99	1893,71		
	1980,70		1990,01	100	2005,56		
120%	5943,81	0,7	5980,52	99	5737,19	3,3	2
	5995,26		5979,33	100	5844,13		
	5910,73		5970,02	99	6111,32		
240%	11909,93	0,7	11961,04	100	11548,51	2,1	2
	12072,55		11958,65	101	11857,92		
	12013,35		11940,05	101	12033,46		
Especificação (%)	≤ 5,3		90 – 107		≤ 5,3		≤ 8

a= Resultados adquiridos na linearidade; b= teor experimental do analito em μg por grama de amostra.

Tabela 25: Precisão e exatidão – Diclorometano

Identificação	Precisão 1º dia		Exatidão		Precisão 2º dia		Intermediária
Identificação	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Teor teórico ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	Recuperação (%)	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	DPR (%)
40%	233,75	0,7	239,01	98	235,90	1,6	1
	236,05		238,96	99	237,82		
	236,69		238,59	99	243,25		
120%	711,20	1,8	717,03	99	678,16	4,1	3
	715,16		716,89	100	701,95		
	691,50		715,78	97	735,89		
240%	1415,41	1,6	1434,07	99	1382,70	2,3	2
	1441,50		1433,78	101	1437,87		
	1460,07		1431,55	102	1438,28		
Especificação (%)	$\leq 5,3$		90 – 107		$\leq 5,3$		≤ 8

a= Resultados adquiridos na linearidade; b= teor experimental do analito em μg por grama de amostra.

Tabela 26: Precisão e exatidão – 2-Propanol

Identificação	Precisão 1º dia		Exatidão		Precisão 2º dia		Intermediária
Identificação	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Teor teórico ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	Recuperação (%)	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	DPR (%)
40%	1961,30	0,4	1995,76	98	1920,01	1,1	1
	1978,06		1995,37	99	1934,44		
	1972,44		1992,26	99	1962,76		
120%	5973,88	0,6	5987,29	100	5950,96	2,0	1
	6005,87		5986,10	100	5957,90		
	5936,90		5976,79	99	6166,25		
240%	11946,89	0,7	11974,59	100	12108,20	1,1	1
	12094,77		11972,19	101	12093,43		
	12077,30		11953,57	101	12323,75		
Especificação (%)	$\leq 5,3$		90 – 107		$\leq 5,3$		≤ 8

a= Resultados adquiridos na linearidade; b= teor experimental do analito em μg por grama de amostra.

Tabela 27: Precisão e exatidão – Terc-butanol

Identificação		Precisão 1º dia		Exatidão		Precisão 2º dia		Intermediária
Identificação	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	Teor teórico ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	Recuperação (%)	Teor calculado ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b	DPR (%)	DPR (%)	
40%	391,14	0,4	397,75	98	383,71	1,9	1	
	391,75		397,67	99	394,14			
	394,34		397,05	99	398,14			
120%	1188,83	0,7	1193,24	100	1167,54	2,8	2	
	1195,03		1193,00	100	1184,38			
	1179,64		1191,14	99	1232,63			
240%	2358,10	1,2	2386,48	99	2388,70	1,3	1	
	2398,30		2386,00	101	2394,20			
	2411,33		2382,29	101	2445,91			
Especificação (%)	$\leq 5,3$		90 – 107		$\leq 5,3$		≤ 8	

a= Resultados adquiridos na linearidade; b= teor experimental do analito em μg por grama de amostra.

Os resultados apresentados foram precisos quando avaliado a repetibilidade do método analítico, sendo que a concordância entre os teores a partir de uma triplicata dos pontos baixo, médio e alto sob as condições originais do método. Os resultados obtidos demonstraram o atendimento ao DPR (%) estando ele dentro da especificação para os analitos avaliados. Essa avaliação é efetuada sob as mesmas condições de procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmas condições instrumentais. Este resultado representa repetitividade não sendo a precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra que foi avaliado por meio de seis réplicas de injeções da Solução de *System Suitability*, que tem por função avaliar o DPR (%) da variação instrumental e que garante a resolução entre os picos, a continuidade da análise é condicionada a aprovação do *System Suitability* em todos os parâmetros de uma validação, por a não apresentação do resultado. Os resultados encontrados se trata da adição de padrão sobre a matriz, onde o teor é calculado com o comparativo da amostra a 100% da especificação, em relação aos níveis baixo, médio e alto.

A reprodutibilidade se trata do grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra efetuadas sob condições variadas de analistas, de local, instrumento e condições, ou seja, variações de condições analíticas. No fim desta avaliação é possível comprovar a robustez de um método quando exposto a uma variação sistêmica. É comum encontrar desacordo entre métodos analíticos, pois quando se varia condições de preparo normalmente coloca a prova os possíveis problema na reprodutibilidade, como descrição não clara do método, ausência de informações, variações instrumentais., etc. Além de serem indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, estudos colaborativos também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão entre os teores.

Por fim, a avaliação deste parâmetro coube o comparativo entre os teores da precisão primeiro e segundo dia, onde a diferença avaliada está no preparo em dias e por analistas diferentes, obtendo como resultado o maior DPR entre os níveis foi de 3% bem abaixo da especificação de $\leq 8\%$. Desta forma, entende-se há reprodutibilidade do método e mesmo com as alterações, houve o atendimento aos critérios.

Diante da avaliação da exatidão, podemos constatar que se trata da concordância individuais encontradas em um determinado método analítico após a adição do padrão sobre a matriz estudada, visto que esses resultados demonstram a recuperação do valor verdadeiro adicionado em cada nível, sendo ele baixo (40%), médio (120%) e alto (240%). Podemos verificar que diante dos resultados apresentados não demonstrou tendência na recuperação entre os níveis, assim obtendo consistência do resultado de recuperações bem próximos a 100%, ou seja, tudo aquilo que foi adicionado, foi

recuperado. Ao falarmos de exatidão, automaticamente podemos relacionar a importância da precisão analítica, pois é a junção desses dois parâmetros principais em uma validação que garante uma reprodutibilidade de maneira fidedigna da variação e a representatividade metodológica garantida por meio da repetibilidade entre os níveis, pela comprovação da triplicata de réplicas puras.

A avaliação da robustez foi dividida em duas partes. A primeira foi realizada durante a validação do método analítico contemplando a estabilidade das amostras e variação do lote da coluna cromatográfica, e a outra parte da avaliação foi realizada durante a etapa de desenvolvimento analítico contemplando o fluxo do gás de arraste alto e baixo $\pm 0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura do forno alta e baixa $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Esta será apresentada junto com a avaliação por planejamento experimental de composto central.

A avaliação da robustez de um método analítico compete a variação de algumas pequenas e deliberadas condições durante uma rotina analítica. Portanto, nesta etapa as variações testadas serão a substituição de lote da coluna e a exploração da estabilidade da amostra, conforme será demonstrado na (TAB. 28). Durante a rotina analítica, sabemos que tais variações são importantes para serem testadas e verificadas, pois esta é a garantia que algumas modificações instrumentais e de insumos possa ocorrer sem causar risco ao método analítico.

Tabela 28: Avaliação dos resultados de robustez de coluna e estabilidade

Identificação /Parâmetro	Metanol	Acetona	Diclorometano	2-Propanol	Terc-butanol
Teor da Robustez sem alteração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	2420,68	4146,67	491,49	4009,64	798,19
Recuperação (%)	NA	NA	NA	NA	NA
Teor da Robustez de Coluna ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	2438,28	4182,36	494,76	4037,53	803,99
Recuperação (%)	101	101	101	101	101
Teor da Robustez Estabilidade ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	2434,42	4143,42	490,43	4003,29	804,70
Recuperação (%)	101	100	100	100	101

Os resultados são referentes ao teor no nível 80%, quando comparado ao nível de 100% (Referência). Desta forma, temos que os resultados robusta em tempo de estabilidade do preparo, sendo ele de 126 horas e também robusto a mudança de lote da coluna cromatográfica.

Todos os estudos e avaliações foram realizados sob a adição de padrão na matriz. Logo, alcançamos o atendimento de todos os parâmetros necessários para a validação de um método analítico, demonstrando assim o atendimento do método a finalidade que se propõe, garantindo que a quantificação dos analitos Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano e Terc-butanol é capaz de identificar, quantificar esses analitos durante uma liberação da matéria-prima Cloridrato de Duloxetina.

5.4.2 Definição do Região de Design operável do Método (MODR);

A região de ótima do método (MODR) deve ser comprovada por meio de experimentos entre pontos que provem o efeito da interação para um resultado satisfatório, na qual a partir da alteração do nível $+\sqrt{2}$, $+1$, 0 , -1 , $-\sqrt{2}$ o fator 0 sempre será o alvo já previamente definido com os experimentos anteriores, nas condições testadas quantitativamente, a seletividade também deve ser provada de modo a garantir uma superfície de resposta robusta para o método analítico. O delineamento de composto central (CCD) foi aplicado com o objetivo de identificar a faixa de robustez do método analítico, levando em consideração a variação de fluxo do gás de arraste e a temperatura inicial do forno cromatográfico, conforme demonstrado na (TAB. 29).

Tabela 29: Planejamento CCD

1	2	3	Recuperação Metanol	Recuperação Acetona	Recuperação 2-Propanol	Recuperação Diclorometano	Recuperação Terc-butanol
11	30	1	100	95	97	99	99
13	30	1	101	98	96	99	96
6	33	1	105	106	99	107	99
9	30	1	103	98	98	98	98
3	28	1,2	102	101	99	75	101
12	30	1	101	100	99	99	99
7	30	0,72	107	113	101	110	101
1	28	0,8	104	114	100	110	100
5	27	1	104	107	99	103	99
4	32	1,2	104	106	100	105	100
10	30	1	102	99	99	99	99
8	30	1,28	104	101	99	100	96
2	32	0,8	102	103	98	105	99

1: Ordem aleatória dos experimentos; **2:** Temperatura inicial do forno cromatográfico em °C (-√2: 27; -1: 28; **0:** 30; 1: 32; √2: 33); **3:** Fluxo do gás de arraste em mL.min⁻¹ (-√2: 0,7; -1: 0,8; **0:** 1,0; 1: 1,2; √2: 1,3).

Para a avaliação de cada experimento foi levado em consideração a aprovação de DPR entre três injeções e resolução de *System Suitability*. Com isso, avaliamos o ponto central em quintuplicata e uniplicata do branco, teste, 100% e 40%. O resultado final será a recuperação do nível 40%, sendo este o resultado avaliado normalmente no parâmetro de robustez, onde a escolha deste ponto 40% (LOQ) se deve a criticidade da faixa linear de um método analítico.

Ao realizar a avaliação do quadro ANOVA para análise da variância podemos comparar a variabilidade a partir de um tratamento estatístico capaz de observar a correlação entre os fatores relacionados em função do erro puro, podendo ser identificados que os efeitos não são significativos [45]

Seguem abaixo as TAB. 30 à 34 os resultados apresentados.

Tabela 30: Análise de variância do Metanol

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-value	p-value	
Modelo	24,30	4	6,08	2,47	0,1290	Não significativo
A-Temperatura do Forno	0,2500	1	0,2500	0,1015	0,7582	
B-Fluxo	2,25	1	2,25	0,9137	0,3671	
A ²	7,67	1	7,67	3,11	0,1156	
B ²	16,71	1	16,71	6,79	0,0314	
Residual	19,70	8	2,46			
Falta de ajuste	14,50	4	3,62	2,79	0,1722	Não significativo
Erro puro	5,20	4	1,30			
Total	44,00	12				

Na TAB. 30 o valor do Modelo F de 2,47 demonstra que o modelo não é significativo em relação ao ruído. Há uma chance de 12,90% de que um valor F tão grande possa ocorrer devido ao ruído.

Para os valores de P inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Nesse caso, B² é o único termo do modelo que foi significativo, e para valores maiores que 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos.

O valor F de falta de ajuste de 2,79 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Há uma chance de 17,22% de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido ao ruído. A falta de ajuste não significativa é o esperado, pois queremos que o modelo se ajuste.

Por fim, é possível identificar por meio dos valores de F e P, que o modelo não foi significativo não demonstrando efeitos e falta de ajustes, e neste caso temos o resultado

almejado para este analito, visto que por se tratar de uma análise de robustez não esperamos significância entre os termos, e tão menos a necessidade de ajuste de modelo, portanto, temos um modelo ideal e robusto quando se avaliado o analito metanol. Como o único termo significativo foi o B², sendo ele o fluxo, temos a compreensão de que o termo não apresenta um impacto significativo, por se tratar de um impacto no próprio fator e não trará interferência no modelo quadrático de dois fatores.

Tabela 31: Análise de variância da Acetona

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-value	p-value	
Modelo	377,87	5	75,57	22,20	0,0004	Significativo
A-Temperatura do Forno	6,87	1	6,87	2,02	0,1984	
B-Fluxo	90,93	1	90,93	26,71	0,0013	
AB	64,00	1	64,00	18,80	0,0034	
A ²	114,81	1	114,81	33,73	0,0007	
B ²	129,38	1	129,38	38,01	0,0005	
Residual	23,83	7	3,40			
Falta de ajuste	9,83	3	3,28	0,9359	0,5017	Não significativo
Erro puro	14,00	4	3,50			
Total	401,69	12				

Na TAB. 31 o valor do Modelo F de 22,20 implica que o modelo é significativo. Há apenas 0,04% de chance de que um valor F tão grande ocorra devido ao ruído.

Valores de P inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, B, AB, A², B² são termos de modelo significativos. Valores maiores que 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos.

O valor F de falta de ajuste de 0,94 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Há uma chance de 50,17% de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido ao ruído. A falta de ajuste não significativa conforme o esperado, pois queremos que o modelo se ajuste.

Por fim, é possível identificar por meio do valor de P que o modelo não apresentou a falta de ajuste, porém, ao avaliar os valores de F foi possível observar efeitos significativos no modelo, portanto, esses efeitos serão avaliados de modo compreender o impacto no resultado final da recuperação para o analito acetona, se tratando de um modelo quadrático. Por se tratar de um modelo com termos significativos a avaliação de robustez neste caso levará em consideração a interação entre as respostas e qual é o *Design* que melhor se ajusta.

Tabela 32: Análise de variância do 2-Propanol

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-value	p-value	
Modelo	7,04	2	3,52	2,65	0,1190	Não significativo
B-Fluxo	0,4179	1	0,4179	0,3150	0,5870	
BA ²	6,62	1	6,62	4,99	0,0495	
Residual	13,27	10	1,33			
Falta de ajuste	6,47	6	1,08	0,6340	0,7061	Não significativo
Erro puro	6,80	4	1,70			
Total	20,31	12				

Na TAB. 32 o valor do Modelo F de 2,65 implica que este não é significativo em relação ao ruído. Há uma chance de 11,90% de que um valor F tão grande possa ocorrer devido ao ruído.

Valores de P inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Nesse caso, BA² é um termo de modelo significativo. Valores maiores que 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos.

O valor F de falta de ajuste de 0,63 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Há uma chance de 70,61% de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido ao ruído. A falta de ajuste não significativa conforme esperado, pois queremos que o modelo se ajuste.

Por fim, é possível identificar por meio dos valores de F e P, que o modelo não foi significativo não demonstrando efeitos e falta de ajustes, e neste caso temos o resultado almejado para este analito, visto que por se tratar de uma análise de robustez não esperamos significância entre os termos, e tão menos a necessidade de ajuste de modelo, portanto, temos um modelo ideal e robusto quando se avaliado o analito 2-propanol, e neste caso tivemos um modelo quadrático de dois fatores.

Tabela 33: Análise de variância de Diclorometano

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-value	p-value	
Modelo	725,60	3	241,87	10,41	0,0028	Significativo
A-Temperatura do Forno	117,48	1	117,48	5,05	0,0511	
B-Fluxo	301,87	1	301,87	12,99	0,0057	
AB	306,25	1	306,25	13,18	0,0055	
Residual	209,17	9	23,24			
Falta de ajuste	208,37	5	41,67	208,37	< 0,0001	Significativo
Erro puro	0,8000	4	0,2000			
Total	934,77	12				

Na TAB. 33 o valor do Modelo F de 10,41 implica que o modelo é significativo. Há apenas 0,28% de chance de que um valor F tão grande ocorra devido ao ruído.

Valores de P inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Neste caso, B, AB são termos de modelo significativos. Valores maiores que 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos.

O valor F de falta de ajuste de 208,37 implica que a falta de ajuste é significativa. Há apenas uma chance de 0,01% de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido ao ruído. Neste caso, tivemos um modelo no qual foi verificado a falta de ajuste e que será avaliado graficamente o quanto essa falta de ajuste impacta no modelo, pois um modelo que requer ajuste é ruim para a avaliação do resultado, pois o mesmo apresenta dificuldade a prever e ajustar a inclinação.

Por fim, é possível identificar por meio dos valores de P e F que o modelo apresentou a falta de ajuste e termos significativos, portanto, esses efeitos serão avaliados de modo compreender o impacto no resultado final da recuperação para o analito diclorometano, se tratando de um modelo de regressão de dois fatores. Por se tratar de um modelo com termos significativos a avaliação de robustez e neste caso levará em consideração a interação entre as respostas e qual é o *Design* que melhor se ajusta.

Tabela 34: Análise de variância de Terc-butanol

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-value	p-value	
Model	0,0000	0				
Residual	28,92	12	2,41			
Falta de ajuste	22,12	8	2,77	1,63	0,3358	Não significativo
Erro puro	6,80	4	1,70			
Total	28,92	12				

Na TAB. 34 os valores de P inferiores a 0,05 indicam que os termos do modelo são significativos. Nesse caso, não há termos de modelo significativos. Valores maiores que 0,1 indicam que os termos do modelo não são significativos.

O valor F de falta de ajuste de 1,63 implica que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro puro. Há 33,58% de chance de que um valor F de falta de ajuste tão grande possa ocorrer devido ao ruído. A falta de ajuste não significativa é boa, visto que queremos um modelo que se ajuste.

Por fim, é possível identificar por meio dos valores de F e P, que o modelo não foi significativo não demonstrando efeitos e falta de ajustes, e neste caso temos o resultado almejado para este analito, visto que por se tratar de uma análise de robustez não esperamos significância entre os termos, e tão menos a necessidade de ajuste de modelo,

portanto, temos um modelo ideal e robusto quando se avaliado o analito 2-propanol. Neste caso, não tivemos um modelo que descreve os resultados, e com o auxílio dos dados é possível verificar que por mais que os dados não foram descritos pelo modelo tivemos de fato resultados muitos próximos a 100% de recuperação para o analito Terc-butanol, por isso, não ter um modelo aqui nos leva a um resultado robusto em toda a superfície de variação entre as condições aplicadas.

Em seguida, da TAB. 35 à TAB. 39, serão apresentados os resultados de ajustes estatísticos.

Tabela 35: Ajuste estatístico – Metanol

Desvio padrão	1,57	R²	0,5523
Média	103,00	Ajustado, R²	0,3284
Coefficiente de variação, %	1,52	Predito, R²	-0,5713
Precisão adequada			3,9560

Na TAB. 35 o R² predito negativo implica que a média geral pode ser uma melhor predição de sua resposta do que o modelo atual. Em alguns casos, um modelo de ordem superior também pode prever de forma mais adequada.

A precisão adequada mede a relação sinal-ruído. Uma proporção de 3,96 indica um sinal inadequado, indicando que este modelo não deve ser utilizado para predição.

No entanto, ao utilizar resultados brutos é possível observar que em toda a faixa de fluxo do gás de arraste e temperatura inicial do forno cromatográfico tivemos resultados dentro da especificação, então, por mais que a descrição da regressão não esteja adequada, a faixa testada permanece robusta.

Tabela 36: Ajuste estatístico – Acetona

Desvio padrão	1,84	R²	0,9407
Média	103,15	Ajustado, R²	0,8983
Coefficiente de variação, %	1,79	Predito, R²	0,7716
Precisão adequada			13,3022

Na TAB. 36 o R² Predito de 0,7716 está em razoável concordância com o R² ajustado de 0,8983, ou seja, a diferença é inferior a 0,2.

A precisão adequada mede a relação sinal-ruído. Uma proporção maior que 4 é desejável. Sua proporção de 13,302 indica um sinal adequado. Este modelo pode ser utilizado para navegar no espaço de *Design*.

Tabela 37: Ajuste estatístico – 2-Propanol

Desvio padrão	1,15	R²	0,3467
Média	98,77	Ajustado, R²	0,2160
Coefficiente de variação, %	1,17	Predito, R²	-0,1457
Precisão adequada			4,0809

Na TAB. 37 o R² predito negativo implica que a média geral pode ter uma melhor predição de sua resposta do que o modelo atual. Em alguns casos, um modelo de ordem superior também pode prever de forma mais adequada.

Precisão adequada mede a relação sinal-ruído. Uma proporção maior que 4 é desejável. Sua proporção de 4,081 indica um sinal adequado. Este modelo pode ser utilizado para navegar no espaço de *Design*.

No entanto, ao utilizar resultados brutos é possível observar que em toda a faixa de fluxo do gás de arraste e temperatura inicial do forno cromatográfico tivemos resultados dentro da especificação, então, por mais que a descrição da regressão não seja a adequada, mesmo assim pode-se considerar que na faixa testada apresenta uma robustez desejada.

Tabela 38: Ajuste estatístico – Diclorometano

Desvio padrão	4,82	R²	0,7762
Média	100,69	Ajustado, R²	0,7016
Coefficiente de variação, %	4,79	Predito, R²	0,2894
Precisão adequada			11,1383

Na TAB. 38 o R² predito de 0,2894 não é tão próximo do R² ajustado de 0,7016 como se poderia esperar normalmente, ou seja, a diferença é mais de 0,2. Isso pode indicar um grande efeito de bloqueio ou um possível problema com seu modelo e / ou dados. Os itens a serem considerados são redução do modelo, transformação da resposta, outliers, etc. Todos os modelos empíricos devem ser testados fazendo execuções de confirmação.

Para este caso foi realizado uma nova avaliação do *outlier*, no entanto, o mesmo repetiu observação anterior, e, portanto, este valor representa o nosso conjunto de dados, e por este motivo não houve a exclusão do mesmo deste modelo.

A precisão adequada mede a relação sinal-ruído. Uma proporção maior que 4 é desejável. Sua proporção de 11,138 indica um sinal adequado. Este modelo pode ser usado para navegar no espaço de *design*.

Tabela 39: Ajuste estatístico – Terc-butanol

Desvio padrão	1,55	R²	0,0000
Média	98,92	Adjustado, R²	0,0000
Coefficiente de variação, %	1,57	Predito, R²	-0,1736
Precisão ajustada			NA ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Caso (s) com alavancagem de 1,0000: Pred R² e estatística PRESS não definida.

Na TAB. 39 o R² predito negativo implica que a média geral pode ter uma predição melhor de sua resposta do que o modelo atual. Em alguns casos, um modelo de ordem superior também apresenta melhor previsão.

Em seguida, da TAB. 40 à TAB. 44, serão apresentados os resultados dos termos e coeficientes de fatores.

Tabela 40: Coeficientes em termos de fatores codificados – Metanol

Fator	Estimativa do Coeficiente	Graus de liberdade	Erro padrão	95% CI Baixo	95% CI Alto	VIF
Intercept	101,40	1	0,7018	99,78	103,02	
A-Temperatura do Forno	0,1768	1	0,5548	-1,10	1,46	1,0000
B-Fluxo	-0,5303	1	0,5548	-1,81	0,7491	1,0000
A ²	1,05	1	0,5950	-0,3220	2,42	1,02
B ²	1,55	1	0,5950	0,1780	2,92	1,02

Tabela 41: Coeficientes em termos de fatores codificados – Acetona

Fator	Estimativa do Coeficiente	Graus de liberdade	Erro padrão	95% CI Baixo	95% CI Alto	VIF
Intercepto	98,00	1	0,8251	96,05	99,95	
A-Temperatura do Forno	-0,9268	1	0,6523	-2,47	0,6157	1,0000
B-Fluxo	-3,37	1	0,6523	-4,91	-1,83	1,0000
AB	4,00	1	0,9225	1,82	6,18	1,0000
A ²	4,06	1	0,6995	2,41	5,72	1,02
B ²	4,31	1	0,6995	2,66	5,97	1,02

Tabela 42: Coeficientes em termos de fatores codificados – 2-Propanol

Fator	Estimativa do Coeficiente	Graus de liberdade	Erro padrão	95% CI Baixo	95% CI Alto	VIF
Intercepto	98,17	1	0,4160	97,25	99,10	
B-Fluxo	-0,2286	1	0,4072	-1,14	0,6788	1,0000
B ²	0,9674	1	0,4330	0,0027	1,93	1,0000

Tabela 43: Coeficientes em termos de fatores codificados – Diclorometano

Fator	Estimativa do Coeficiente	Graus de liberdade	Erro padrão	95% CI Baixo	95% CI Alto	VIF
Intercepto	100,69	1	1,34	97,67	103,72	
A-Temperatura do Forno	3,83	1	1,70	-0,0236	7,69	1,0000
B-Fluxo	-6,14	1	1,70	-10,00	-2,29	1,0000
AB	8,75	1	2,41	3,30	14,20	1,0000

Tabela 44: Coeficientes em termos de fatores codificados – Terc-butanol

Fator	Estimativa do Coeficiente	Graus de liberdade	Erro padrão	95% CI Baixo	95% CI Alto
Intercepto	98,92	1	0,4306	97,98	99,86

A estimativa do coeficiente representa a mudança esperada na resposta por unidade do fator, desta forma, todos os fatores restantes são mantidos como constantes. A interceptação em um desenho ortogonal corresponde a média geral observações, e com este valor apresentar os valores ajustados ao longo da reta dos fatores. Ao lidar com fatores ortogonais, os Fatores de inflação variâncias (VIFs) são 1; VIFs maiores que 1 indicam multicolinearidade e quanto maior o VIF, mais severa é a correlação de fatores. Como regra geral, VIFs menores que 10 são toleráveis.

A partir dos resultados acima conseguimos descrever alguns comportamentos que remetem à avaliação dos dados, sendo que o valor de intercepto significa o cruzamento entre o valor real e o ajustado em seus eixos. Com resultados bem próximos à 100 e baixo erro, foram obtidos resultados confiáveis para seguir com o método de forma segura devido à baixa variação encontrada.

Ao realizarmos a avaliação dos coeficientes de interação “95% CI Baixo” e “95% CI alto” temos que quando o coeficiente sai do nível baixo para o alto e não passa pelo zero, este efeito deve ser considerado como não sendo significativo, e quando o valor sai do nível baixo pra o alto e passa pelo zero, temos que este efeito é significativo. Com isso, ao analisar os resultados encontrados para cada analito foi identificado que o metanol apresentou efeito significativo nos fatores A, B, A² e B², a acetona no fator A, o 2-Propanol no fator B, o diclorometano no fator A e Terc-butanol não houve efeito. Desta forma, foi possível observar que não houve interação entre os fatores A e B, e sim apenas o efeito do fator sobre a sua respectiva resposta.

O erro encontrado em cada fator, incluindo o intercepto, será considerado na criação da carta controle contemplando toda a variação analítica para agregar na estratégia de controle.

Na FIG. 12, ao realizar a avaliação do gráfico predito vs atual (d) para o analito Metanol, foi verificado que o ajuste não representa os dados encontrados, ou seja, o modelo

de regressão utilizado para representar os dados não foi o ideal, por mais que houvesse a utilização de um modelo quadrático o dado encontrado sofreu dificuldade em se ajustar ao longo da curva, representando um valor da R^2 baixo.

Já na FIG. 13, durante a avaliação do gráfico predito vs atual (d) para o analito Acetona entre os resíduos predito vs atual, foi possível identificar que a curva ajustada representa os dados encontrados, ou seja, o modelo de regressão utilizado foi o suficiente para estimar os pontos ao longo da curva.

Ao considerar os resultados encontrados ao longo da curva analítica para o analito 2-Propanol na FIG. 14, podemos visualizar por meio do gráfico predito vs atual (d) que a curva ajustada não representa os dados encontrados, pois o modelo de regressão utilizado para a representar os dados não foi o ideal, e o modelo quadrático utilizado sofreu dificuldade em se ajustar, representando um valor da R^2 baixo.

Por meio da FIG. 15, ao apresentarmos o gráfico predito vs atual (d) podemos visualizar que os pontos estão sendo distribuídos ao longo da curva de maneira ajustada para o analito Diclorometano, ou seja, a escolha do modelo de regressão utilizado foi o suficiente para estimar os resultados ao longo da curva.

Já o gráfico predito vs atual (d) para o analito Terc-butanol na FIG. 16, podemos observar a dificuldade ao se encontrar um modelo capaz de prever os resultados, e neste caso não houve modelo de regressão adequado.

Ao avaliar os resultados encontrados nos gráficos (a), (b), (c), (d) das FIGS. 12 à 16, foi realizada uma discussão individualizada para o gráfico (d) de predito vs atual para cada analito por estes apresentarem diferentes resultados. O restante dos gráficos foi possível concentrar a discussão, por terem apresentados respostas semelhantes.

Ao avaliar os gráficos de normalidade (a) para cada analito (Metanol, Acetona, 2-Propanol, Diclorometano, Terc-butanol – FIGS. 12 à 16 respectivamente), pode-se identificar que o valor encontrado nas observações vs probabilidade acumulada não representam dados que se comportam dentro de uma distribuição normal de um nível de confiança de 95%, sendo eles bem ajustados, ou seja, os pontos estão próximos a linha de distribuição ajustada demonstrando assimetria ao longo da curva, utilizando a padronização interna normal.

Já no gráfico (b), é possível observar a dispersão aleatória do resultado representado, não apresentando nenhuma tendência entre o resíduo em função do previsto, ou seja, ocorreu conforme o esperado visto que o objetivo é garantir a dispersão aleatória entre os resíduos gerados.

Por meio do gráfico (c), identificou-se o resíduo quando comparado à ordem de corrida, ou seja, com este resultado é possível verificar que não há dependência entre as

observações, assim demonstrando que os resultados variam entre resíduos positivos e negativos, não identificando dependência de um resultado para o outro.

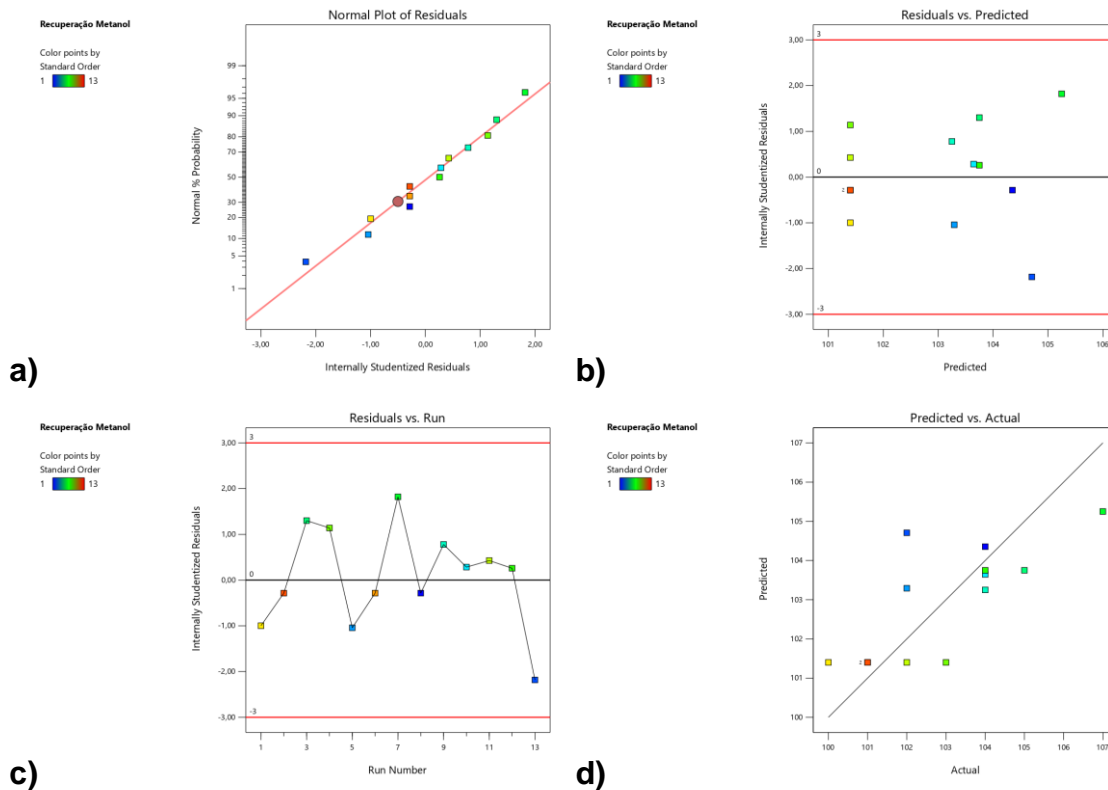


Figura 12: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Metanol

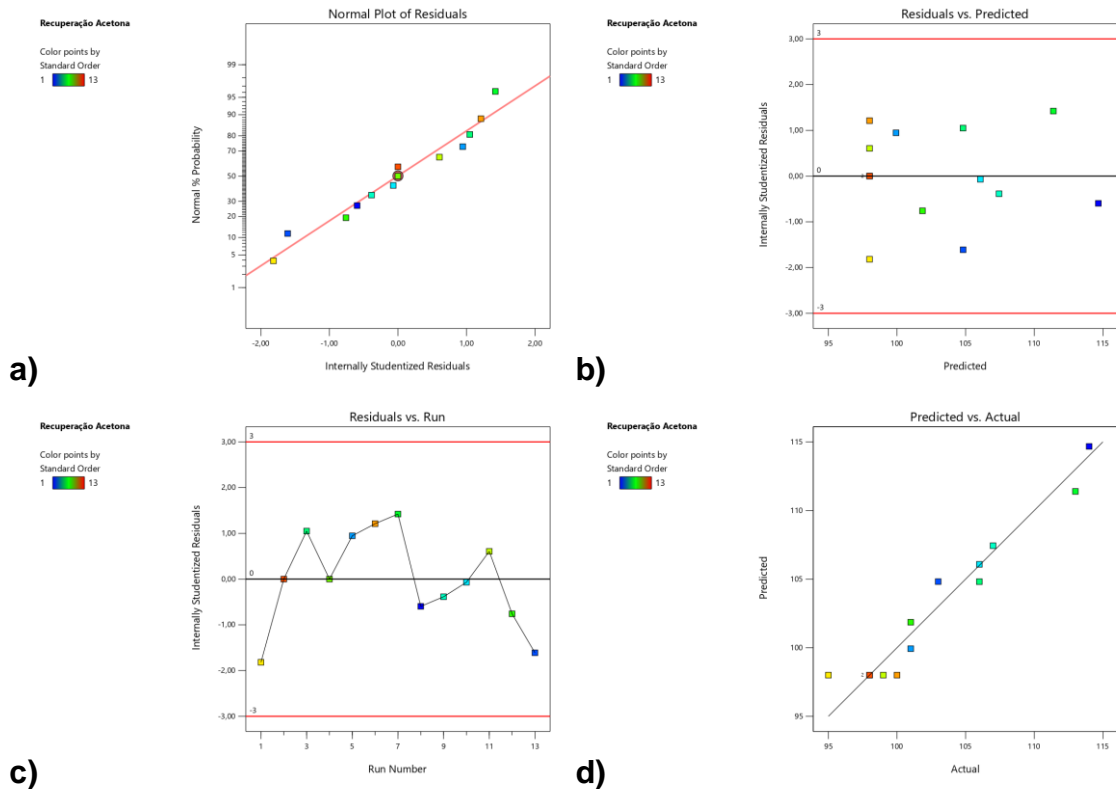


Figura 13: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) da Acetona

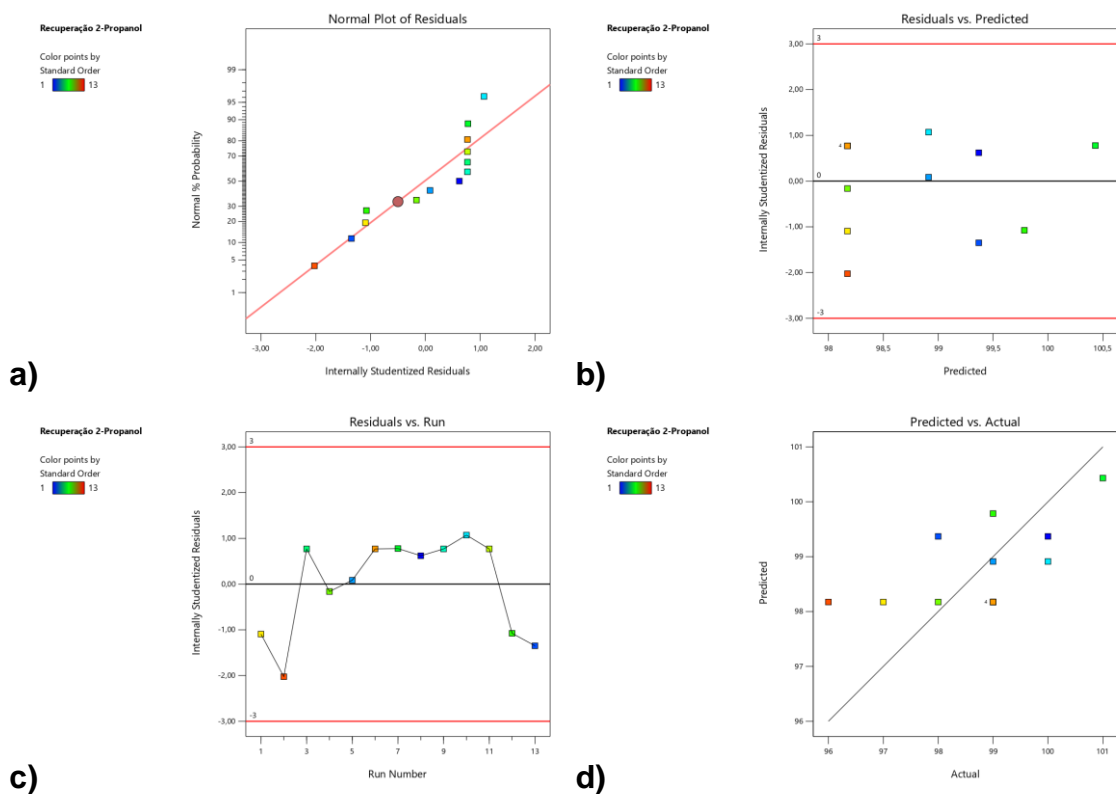


Figura 14: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do 2-Propanol

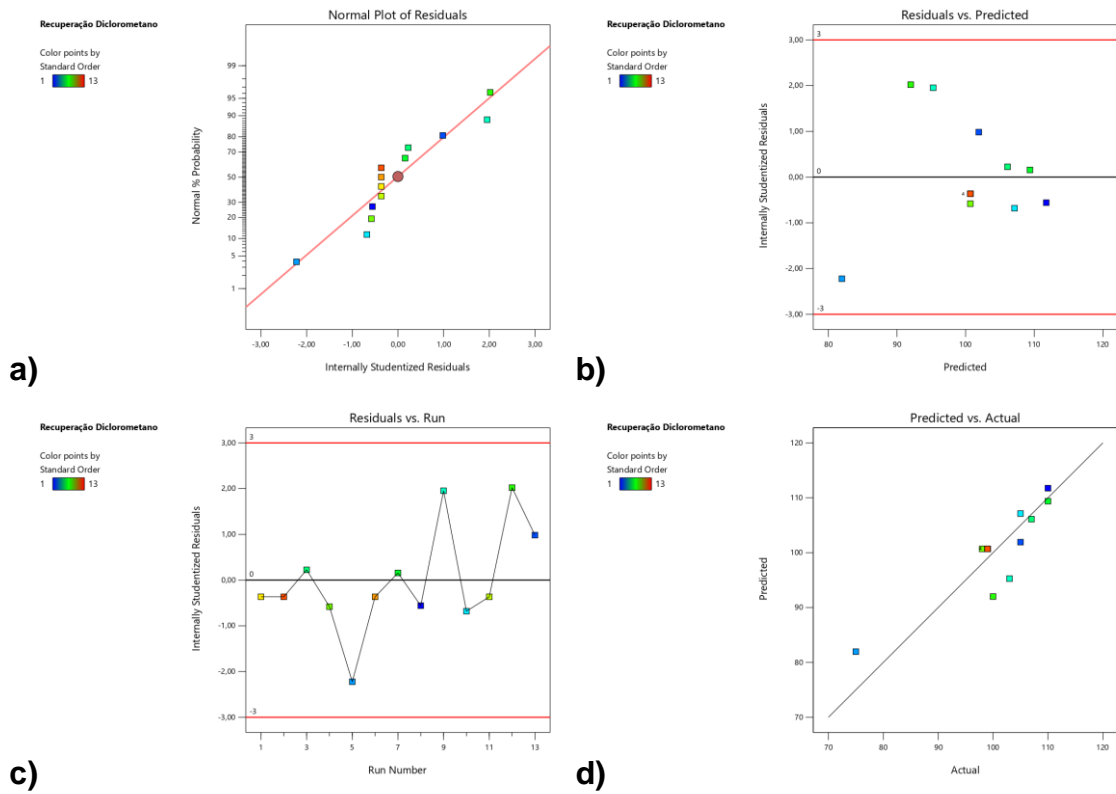


Figura 15: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Diclorometano

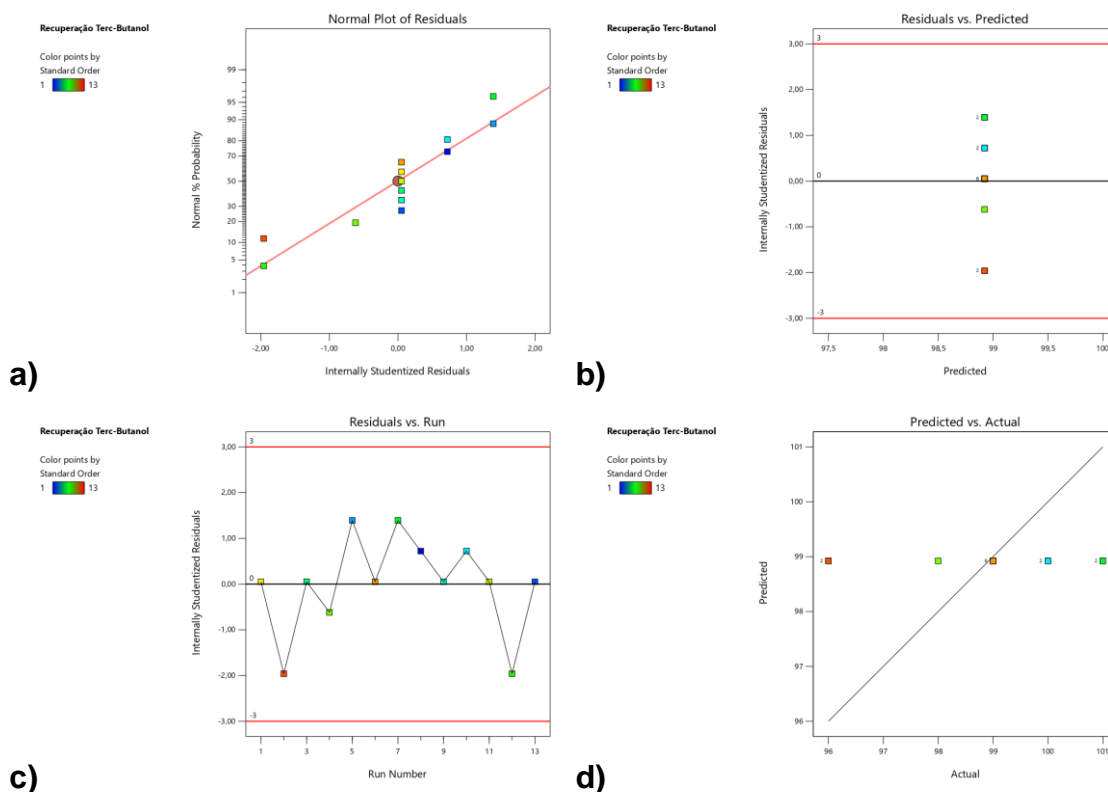
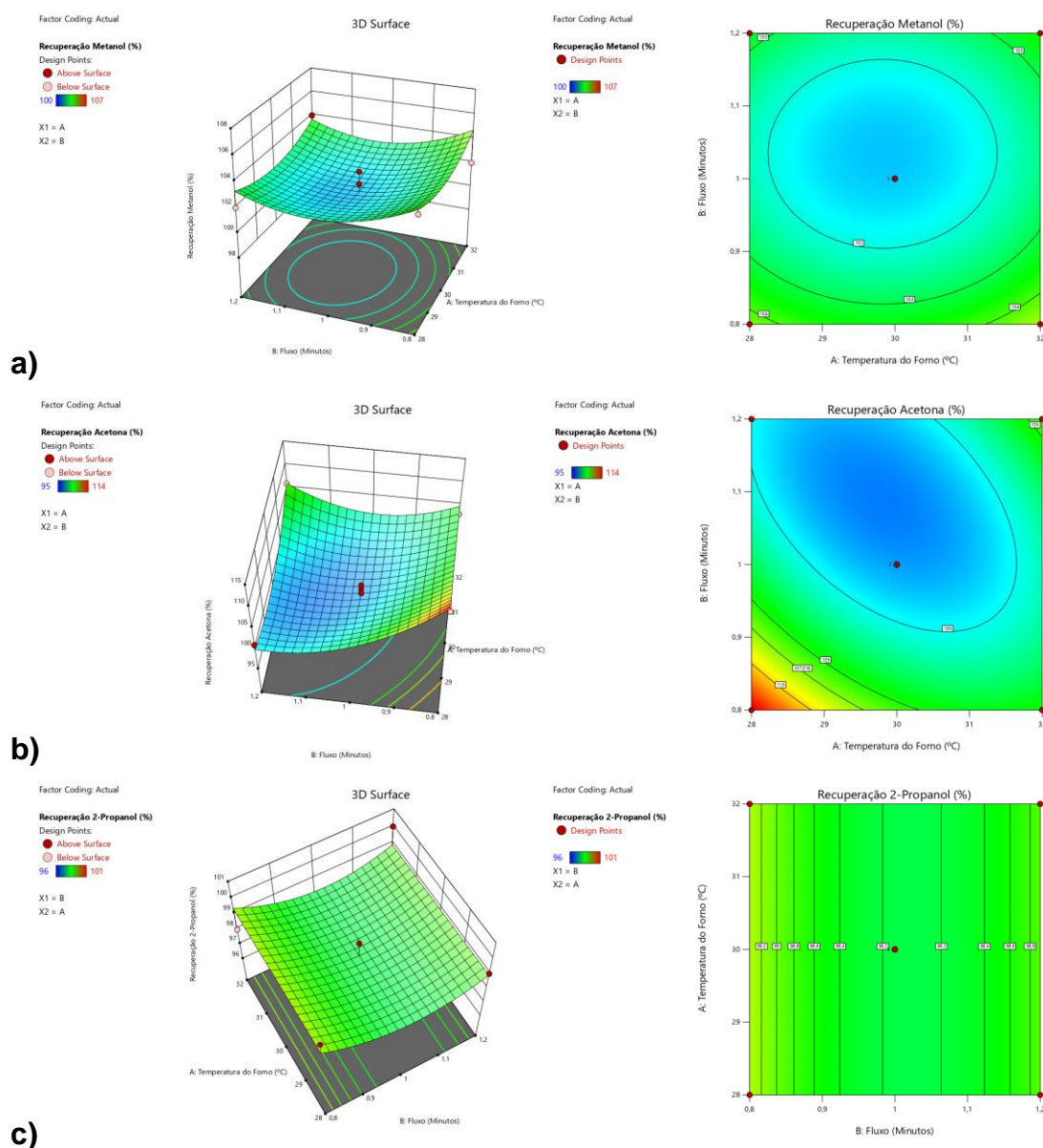


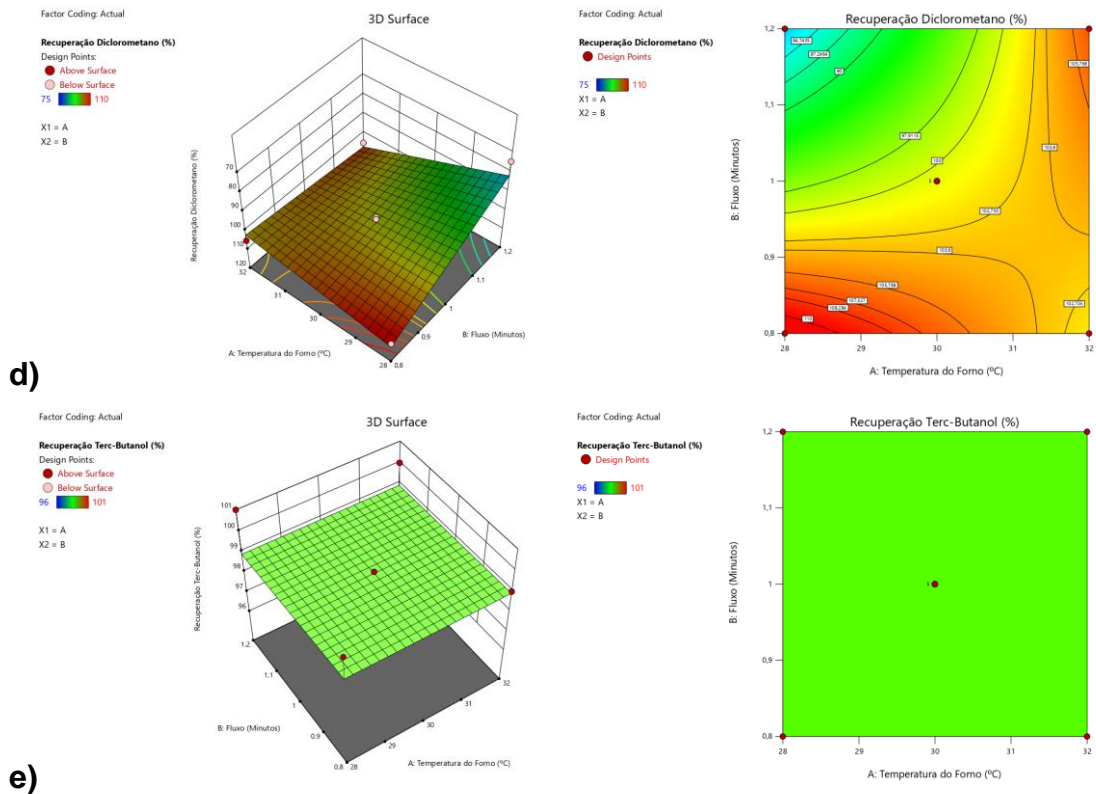
Figura 16: Gráfico de normalidade dos resíduos (a); gráfico resíduos vs predito (b); gráfico residual vs corrida (c); gráfico predito vs atual (d) do Terc-butanol

Ao avaliar os gráficos da superfície de resposta e de contorno (FIG. 17) do Metanol (a), 2-Propanol (c) e Terc-butanol (e) pode ser verificado que as cores azul e verde representam que todos os resultados obtidos de recuperação no nível 40% se encontram dentro da faixa de recuperação esperada, sendo ela de 90 a 107% atendendo à especificação, e que ao longo da faixa testada o resultado se apresentou robusto para a variação de temperatura inicial de forno e fluxo do gás de arraste, ou seja, o resultado pode variar de 27 a 33 °C e 0,7 a 1,3 mL.min⁻¹ respectivamente, dentro da faixa testada. Desta forma, o espaço de *Design* para o Metanol, 2-Propanol e Terc-butanol cobre toda a faixa testada, podendo ele atuar em todas as condições da superfície avaliada.

Já para o gráfico da superfície de resposta e de contorno (FIG. 17) da Acetona (b), podem ser observados que dentro da faixa de recuperação azul e verde os resultados obtidos de recuperação no nível 40% encontra-se dentro da faixa de recuperação esperada, sendo ela de 90 a 107% com atendimento a especificação. Porém, é possível evidenciar em vermelho que fluxos de gás de arraste abaixo de 0,91 mL.min⁻¹ e de temperatura inicial do forno de abaixo de 29,6 °C coloca em risco o resultado de recuperação. Por este motivo, podemos concluir que para este analito a faixa robusta seria de 0,91 a 1,3 mL.min⁻¹ para o fluxo do gás de arraste e de 29,6 e 33 °C para a temperatura inicial do forno. Desta forma, o espaço de *Design* para a Acetona cobrirá uma parte da faixa testada.

Por fim, os gráficos da superfície de resposta e de contorno (FIG. 17) do Diclorometano (d) podem ser observados que dentro da faixa de recuperação de transição do vermelho para o amarelo e verde os resultados obtidos de recuperação no nível 40% encontram-se dentro da faixa de recuperação esperada, sendo ela de 90 a 107%, com atendimento a especificação. No entanto, é possível evidenciar que na faixa em vermelho e azul em que o fluxo de gás de arraste encontra-se abaixo de 0,86 e acima de 1,09 mL.min⁻¹ e de temperatura inicial do forno abaixo de 29,8 °C, o resultado de recuperação é colocado em risco. Por este motivo, podemos concluir que para este analito a faixa robusta seria de 0,86 a 1,09 mL.min⁻¹ para o fluxo do gás de arraste e de 29,8 e 33 °C para a temperatura inicial do forno. Desta forma, o espaço de *Design* para o Diclorometano cobrirá uma parte da faixa testada.





d)

e)

Figura 17: Gráficos de superfície de resposta e gráficos de contorno, com a sequência dos analitos Metanol (a), Acetona (b), 2-Propanol (c), Diclorometano (d) e Terc-butanol (e).

Na FIG. 18 foi apresentado o gráfico de desejabilidade com a sobreposição de todas as respostas em um gráfico de contorno e de perturbação, assim obtendo um resultado de desejabilidade de 0,891101, sendo o resultado ideal de desejabilidade igual a 1. Neste caso, por se tratar da junção de cinco analitos, alcançar uma região de ótima capaz de compreender este intervalo aceitável se trata de um excelente resultado e também pelo atendimento da especificação. A região operacional obtida por meio de um gráfico de contorno nos leva a sobreposição de respostas no eixo Y em funções dos fatores X, assim, é possível determinar o esforço necessário para atingir o alvo. [45]

Factor Coding: Actual

Desirability
● Design Points
0 1
X1 = A
X2 = B

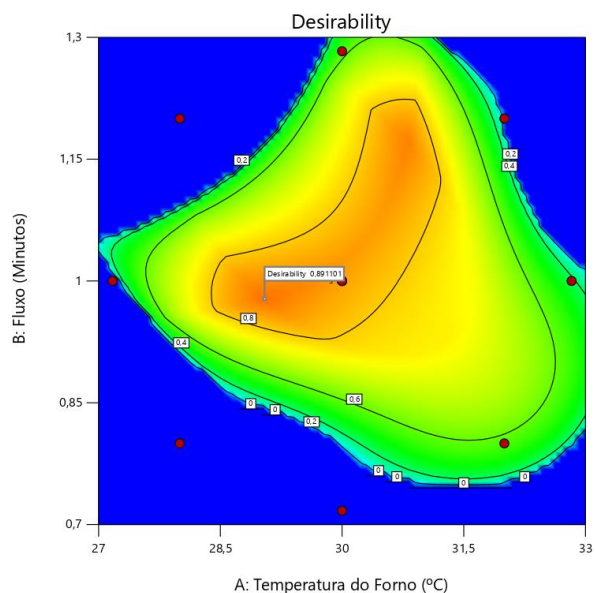


Figura 18: Gráfico de desejabilidade

Ao avaliar os resultados dos gráficos de perturbação da (FIG. 19), é possível identificar os desvios entre A= Temperatura inicial do forno e B= Fluxo do gás de arraste, nos quais podemos evidenciar a intercepção entre as curvas, que é o ponto ideal para cada analito, já que não há interação entre os fatores por se tratar do ponto mais estável. Quando aumentamos o fluxo do gás de arraste é possível observar a redução do tempo de retenção dos analitos, conseqüentemente, com a redução deste fluxo temos uma maior retenção dos analitos, e o mesmo fenômeno ocorre quando aumentamos e diminuimos a temperatura do forno.

No gráfico do 2-Propanol e Terc-butanol (FIG. 19) não houve interação das variáveis, por isso não temos uma apresentação clara do resultado, porém pode ser compreendido como resultados positivos por não apresentarem variação. Já para o Diclorometano (FIG. 19), podemos observar que na medida que a temperatura e fluxo aumentam, os termos seguem caminhos opostos de resposta, onde quanto maior a temperatura menor a recuperação; e, quanto maior o fluxo, maior a recuperação. Conseqüentemente, entende-se que há interação entre as condições, onde o ideal é trabalhar na intersecção das curvas.

Factor Coding: Actual

All Responses

Actual Factors

A = 29,6

B = 0,984

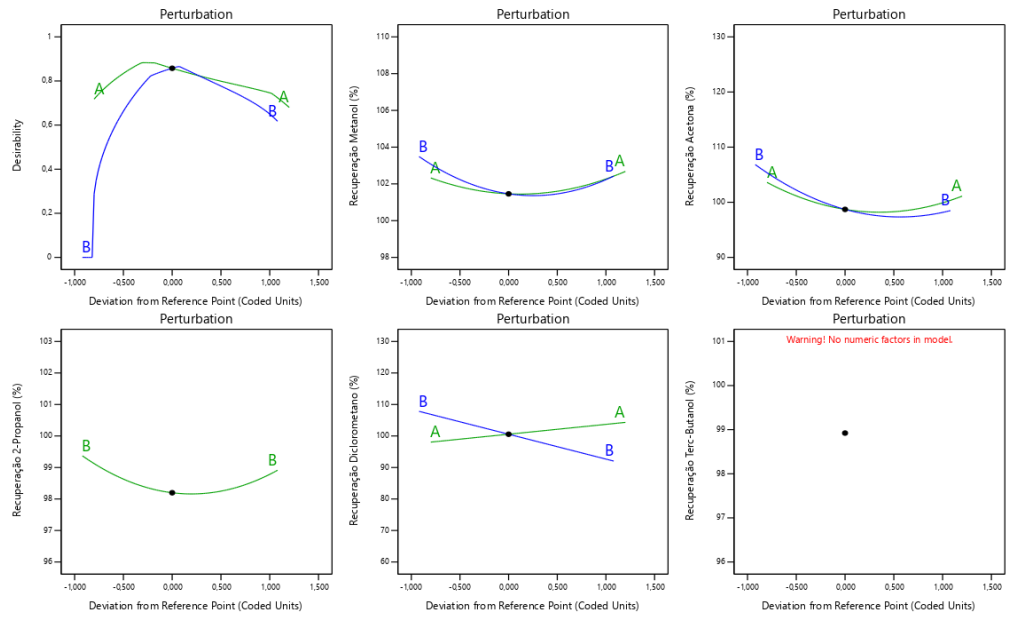


Figura 19: Gráfico de perturbação para cada analito e desejabilidade

Ao realizar a sobreposição dos gráficos de contorno, obtivemos a região de *design* analítico, em que os limites definidos dentro dessa região garantem a flexibilidade analítica e regulatória em função da resposta. Desta forma, podemos observar por meio da FIG. 20 a região amarela como sendo a região de ótima do método analítico e também levando em consideração um nível de confiança de 95%, ou seja, uma faixa de segurança do resultado considerando o erro analítico. [45] Na FIG. 21 foi contemplado o zoom nessa faixa, de modo a delimitar o MODR do método analítico.

Factor Coding: Actual

Overlay Plot

- Recuperação Metanol
- CI Low
- CI High
- Recuperação Acetona
- CI Low
- CI High
- Recuperação 2-Propanol
- CI Low
- CI High
- Recuperação Diclorometano
- CI Low
- CI High
- Recuperação Terc-Butanol
- CI Low
- CI High

● Design Points

X1 = A

X2 = B

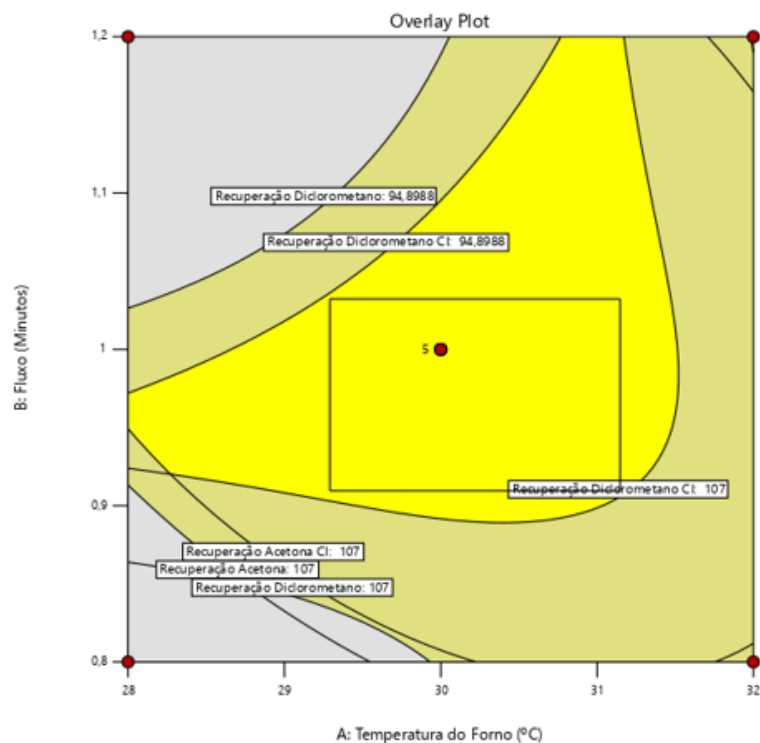


Figura 20: Gráfico de desejabilidade entre as superfícies de respostas sobrepostas

Factor Coding: Actual

Overlay Plot

- Recuperação Metanol
- CI Low
- CI High
- Recuperação Acetona
- CI Low
- CI High
- Recuperação 2-Propanol
- CI Low
- CI High
- Recuperação Diclorometano
- CI Low
- CI High
- Recuperação Terc-Butanol
- CI Low
- CI High

● Design Points

X1 = A

X2 = B

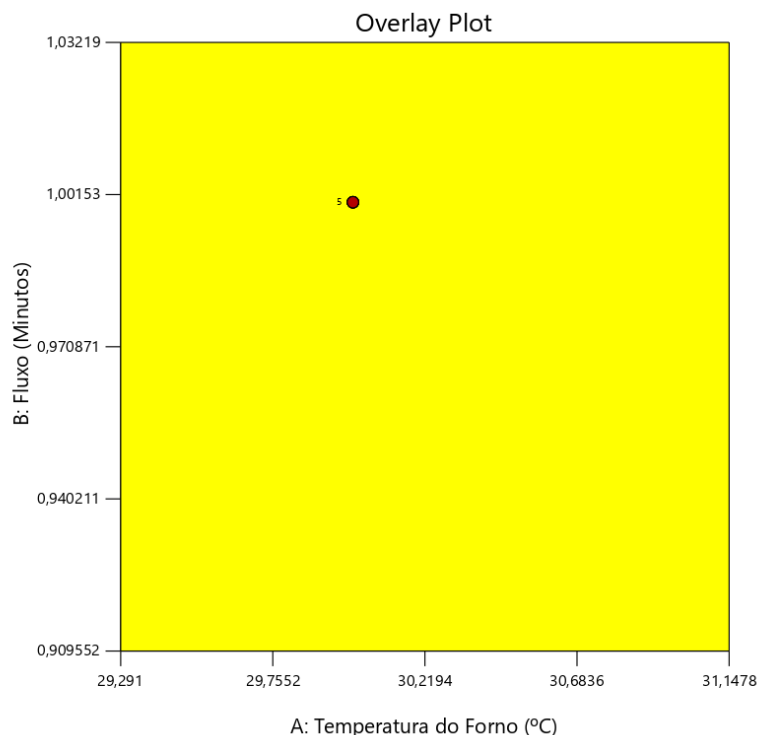


Figura 21: Espaço do *Design* operável ótimo com ampliação

Portanto, com a avaliação da robustez do método analítico podemos delimitar a região das variáveis A, sendo ela temperatura inicial do forno de 29,3 a 31,1 °C e da variável B, sendo ela fluxo de gás de arraste de 0,9 a 1,03 mL.min⁻¹, o MODR do método analítico pode ser compreendido como a região na qual o método pode passar por ajustes, sem que

ofereça riscos ao resultado final. Conforme a RDC 73, a realização de modificações em um método analítico a princípio se enquadraria como uma “mudança maior de método analítico”, que requer o aceite da ANVISA, com o prazo de 6 meses para a avaliação e liberação para produção do fármaco, e mediante publicação no diário oficial. No entanto, com a abordagem AQbD podemos compreender agora com as modificações realizadas dentro do *design* analítico podem ser enquadradas como “mudança menor”, ou seja, que pode ser implementada de maneira imediata, não sendo necessário a submissão a agência reguladora, garantindo assim a tão esperada flexibilidade analítica e regulatória. [30, 32, 40 e 50]

Na prática, essa abordagem remete a uma mudança de conceito de uma abordagem tradicional, onde se tem pouco conhecimento do processo, do produto e das variáveis que o compõem, para uma abordagem multivariada, que garante um maior controle do produto, por possuir um conhecimento aprofundado do mesmo por meio de um estudo da arte, do processo, pela disposição em estar sempre exposto a um melhoramento contínuo e acompanhamento de perto com tomadas de decisões assertivas, por meio do conhecimento das variáveis e aprofundamento em análise de risco que demonstram as falhas a serem tratadas.

5.4.3 Estratégia para controle

As estratégias de controle devem ser definidas em função dos resultados encontrados no desenvolvimento, na qual a variabilidade do método deve estar em conformidade com os CQA's para o atendimento dos ATPs por meio de um monitoramento dos impactos significativos para o método.

A estratégia adotada para o controle será baseada na criação de uma carta controle que visa o acompanhamento do método analítico durante o ciclo de vida do produto, onde o critério de especificação e controle adotado para cada analito será o somatório dos erros padrões obtidos nas FIGS. 40 à 44, tendo como resultado a avaliação de tendência ao longo das liberações.

5.4.4 Monitoramento/ciclo de vida contínuo gestão

O monitoramento deve acontecer durante a execução e avaliação do método analítico, onde se espera que o mesmo seja capaz de detectar, tratar e identificar a presença ou não de tendência ao decorrer do ciclo de vida do produto. Para acompanhamento dos resultados, será feito uma reavaliação semestral da carta controle, podendo ela ser antecipada sob a evidência de uma tendência. A reunião terá como intuito avaliar os dados, definir planos de ação e ajustes na região de *design*.

Essa ação será realizada em conjunto entre as áreas de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento, onde a primeira observação sempre será constatada pelo analista de controle de qualidade responsável da análise. Caso seja constatado um desvio analítico, a tomada de decisão fica sob responsabilidade das áreas envolvidas. Assim, conseguimos garantir o acompanhamento e melhoria contínua no processo, e controle da qualidade do produto final.

6. CONCLUSÃO

As aplicações das ferramentas que compõem o AQbD têm como objetivo garantir o melhor entendimento das variáveis que contemplam o método analítico por Cromatografia em fase gasosa para o controle de solventes residuais metanol, acetona, 2-propanol, diclorometano e terc-butanol na matéria-prima Cloridrato de Duloxetina. Este uso requer um estudo prévio dos analitos, matriz, diluentes e técnicas para obter um alvo, características de análise de risco e ações preventivas a serem tomadas, para a garantia da eficácia e qualidade esperada na quantificação. Com a aplicação de modelos de planejamentos experimentais foi possível otimizar as condições instrumentais e adquirir as características de qualidade esperadas. Com a identificação da região do *design* analítico através da avaliação da robustez, foi possível obter a flexibilidade regulatória de modo a garantir maior rapidez nos ajustes do método, dentro da região do *design* para os fatores temperatura inicial do forno e fluxo de gás de arraste. A validação do método provou precisão, exatidão, linearidade e robustez. Com isso, podemos evidenciar muitos ganhos com essa aplicação e o potencial a ser explorado no desenvolvimento e validação analítica, por meio de todo conhecimento adquirido e a obtenção da melhor condição analítica.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho servirá como modelo para futuras aplicações em diferentes matrizes de fármacos, visando a flexibilidade regulatória com utilização da abordagem AQbD que amplia o conhecimento sobre o produto utilizando a sua variabilidade analítica, podendo ser estendido a todas as técnicas analíticas empregada ao controle analítico.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Oliveira EA, Labra ME, Bermudez J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. *Caderno de Saúde Pública*. 2006;22(11):2379–2389.
- [2] Ahuja S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(1):3-11.
- [3] Nagpal S, Karan, Upadhyay A, Bhardwaj TR, Thakkar A. A review on need and importance of impurity profiling. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2011;7(1):62-70.
- [4] BRASIL. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, [s. l.], v. 2017, p. 22, 2017. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401 Acessado em 08/02/2021.
- [5] Lima LR, Xavier HS, Meira JL, Rolim-Neto PJ. Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006;16(4):562–567.
- [6] MAPA. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf> Acessado em 08/02/2021.
- [7] LANÇAS FM. *Cromatografia em Fase Gasosa*. 1ª ed. São Carlos, SP: Acta Eventos; 1993.
- [8] Leite F. *Validação em análise química*. 5ª ed. Campinas, SP. Editora Átomo; 2008.
- [9] Porto, HSM. *HPLC versus UPLC: Avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos [dissertação]*. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2014.
- [10] Beg S, Hasnain MS. *Pharmaceutical Quality by Design: Principles and Applications*. Elsevier Inc., 2019.
- [11] Panorama Indústria Farmacêutica. *Confederação Nacional do Ramo Químico*. 2015. Disponível em <http://cnq.org.br/system/uploads/publication/9aee2f902857d5d6467b924555af8983/file/panorama-industria-farmacutica-b.pdf>. Acessado em 08/02/2021.
- [12] Akkari ACS, Munhoz IP, Tomioka J, Santos NMBF, Santos RF. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países

farmaemergentes. Gest. Prod. 2016; 23:365-380.

[13] Sangi DP. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. Quim. Nova. 2016; 39:995-1006.

[14] Pandey, S, Pandey, P, Kumar, R, Singh, NP. Residual solvent determination by head space gas chromatography with flame ionization detector in omeprazole API. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011; 47:379-384.

[15] Giordani C, F, A. Desenvolvimento de métodos analíticos e avaliação da toxicidade in vitro de impurezas orgânicas da sitagliptina e vildagliptina [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2018.

[16] Harmonization Conference International (ICH, Q3C, R7), Impurities Residual Solvents, 2016.

[17] Food Drug Administration (FDA). Manual of polices and research, Acceptance Criteria for Residual Solvents, 2017.

[18] Ferroni L, Gardin C, Bellin G, Vindigni V, Pavan C, Zavan B. Effects of novel antidepressant drugs on mesenchymal stem cell physiology. Biomed Pharmacother. 2019;114:108853.

[19] Funao H, Isogai N, Ishii, K. The potential efficacy of serotonin noradrenaline reuptake inhibitor duloxetine in dropped head syndrome: A case report and review of the literature. Heliyon. 2020;6:04774.

[20] Brenna E, Frigoli S, Fronza G, Fuganti C, Malpezzi L. Isolation and characterisation of a phenolic impurity in a commercial sample of duloxetine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007;43:1573–1575.

[21] Liu X, Du Y. Study on the binding of chiral drug duloxetine hydrochloride to human serum albumin. European Journal of Medicinal Chemistry. 2010;45:4043-4049.

[22] Veera Reddy A, Sreenivas Ulareddy BM, Kameshwar Rao C, Madhusudhanreddy B. Stability Indicating Nature of RP-HPLC method for Determination of Impurity profile and Degradation impurities in Duloxetine Hydrochloride. Der Pharma Chemica. 2012;4:1735-1741.

[23] Datar PA, Waghmare RU. Development and validation of an analytical method for the stability of duloxetine hydrochloride. Journal of Taibah University for Science. 2014;8:357–363.

[24] Chahal SK, Sodhi RK, Madan J. Duloxetine hydrochloride loaded film forming dermal gel enriched with methylcobalamin and geranium oil attenuates paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. IBRO Reports. 2020;9:85–95.

[25] Chadha R, Bali A, Bansal G. Characterization of stress degradation products of duloxetine hydrochloride employing LC-UV/PDA and LC-MS/TOF studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016;121:39-55.

[26] Collins C. H., Braga G. L., Bonato PS. Fundamentos de cromatografia.5ª. Campinas, Editora da Unicamp, 2006.

- [27] Douglas F. GC/MS Analysis. Scientific testimony an online journal. Disponível em <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> Acessado em 08/02/2021.
- [28] Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *The AAPS Journal*. 2014; 16:771-783.
- [29] Bezerra MP, Rodrigues LNC. Quality by Design (QbD) como ferramenta para otimização dos processos farmacêuticos. *Infarma Ciências farmacêuticas*. 2017; 29:5-12.
- [30] Grangeia HB, Silva C, Simões SP, Reis MS. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 147:19–37.
- [31] Jain S. Quality by design (QbD): a comprehensive understanding of implementation and challenges in pharmaceuticals development. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014; 6:29-35.
- [32] Fukuda IM, Pinto CFF, Moreira CS, Saviano AM, Lourenço FR. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54:01006.
- [33] Peraman R, Bhadraya K, Padmanabha RY. Analytical quality by design: A tool for regulatory flexibility and robust analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015; 2015:1-9.
- [34] Chaves JAP. Aplicação do princípio de Quality by Design no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade. [monografia] Jacarepaguá: Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos; 2017.
- [35] Moreira CS. Qualidade por Design Analítico (QbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2019.
- [36] Farmacopeia Mercosul: Solventes Residuais. Disponível em http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/acta_115/P_Res_XX_15_Solventes_residuais_PT.pdf Acessado em 08/02/2021.
- [37] Latimer GW. Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, [s. l.], p. 1–18, 2016.
- [38] USP. *The United States Pharmacopeia*, 44. United States Pharmacopeial Convention Inc, Rockville, 2021.
- [39] Dejaegher B, Vander H Y. *Analytical Chemistry and Pharmaceutical Technology (FABI)*, Pharmaceutical Institute, Vrije Universiteit Brussel – VUB, Laarbeeklaan 103, 1090 Brussels, Belgium. *Acta Chromatographica*, 2009.
- [40] Monks K, Molnár I H, Rieger J, Bogáti B, Szabó E. Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation. *TEVA Pharmaceutical Works*

Private Limited Company, Gödöllő, Hungary. Journal of Chromatography A. 2012; 232:218–230.

[41] Pereira J, Gerardo C, Barbero F, Godoy T H, Palmab M, Barrosob G C. Multivariate optimization by statistical methods of ultra-high performance liquid chromatography conditions for the separation of 17 capsaicinoids. Universidade Estadual de Campinas, Journal Royal society of chemistry, 2016.

[42] Candiotti LV, Dezan MM, Cámara SM, Goicoechea CH. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. Journal Elsevier, 2014.

[43] Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. School of Chemistry, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Journal of chromatography B Elsevier, Australia, 2012.

[44] Moreira S. C. Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de método cromatográficos. Universidade de São Paulo. 2019.

[45] Santos R. C. Qualidade por *Design* Analítico (AQbD): Fundamentos e perspectivas. Universidade de São Paulo, 2018.

[46] Pimentel, M. F., Neto, B. B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. Química Nova. V19, n. 3, 1996.

[47] Breusch T. S., Pagan A. R. A simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation, Econometrica, Vol. 47, n. 5, 1979.

[48] Durbin, J., Watson, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression II. Biometrika, 1951.

[49] Royston P. An extension of Shapiro and wilk's W Test for normality to large samples, applied Statistic, 1982.

[50] BRASIL. RDC N° 73, de 7 de Abril de 2016. Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil., p. 32, 2016. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=08/04/2016&pagina=32> Acessado em 29/08/2021.

9. ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

Apêndice 1

Preparo de amostra - Exploratório

Diluyente: Metanol.

Branco: transferir 1,5 mL de diluyente para *vial* de 2,0 mL. Vedar o *vial* com tampa e septo de silicone.

Solução estoque teste: pesar 2,5 g de matéria-prima e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, completar o balão volumétrico com diluyente, homogeneizar por inversão e aferir o menisco. Duloxetina = [100 mg.mL⁻¹]

Solução teste: transferir 2,5mL da solução estoque teste para um balão volumétrico de 5mL, contendo 2mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. Em seguida, transferir 1,5mL desta solução para um *vial* de 2mL. Duloxetina = [50 mg.mL⁻¹]

Solução estoque Padrão Mix I: transferir 0,255 mL do Padrão caracterizado de Tolueno (d = 0,87 g.mL⁻¹); 0,109 mL do Padrão caracterizado de n-Hexano (d = 0,66 g.mL⁻¹) e 0,112 mL do Padrão caracterizado de Diclorometano; 0,231 mL do Padrão caracterizado de Dimetilacetamida (d= 0,94 g.mL⁻¹) para balão volumétrico de 10 mL, contendo 5 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. Tolueno = [22.185,00 µg.mL⁻¹]; n-Hexano = [7.194,00 µg.mL⁻¹]; Diclorometano [14.896,00 µg.mL⁻¹]; Dimetilacetamida = [21.714,00 µg.mL⁻¹].

Solução estoque Padrão Mix II: transferir 0,201 mL do Padrão caracterizado de Clorofórmio (d = 1,48 g.mL⁻¹) e 0,011 mL do Padrão caracterizado de Benzeno (d = 0,88 g.mL⁻¹) para balão volumétrico de 20 mL, contendo 10 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. Clorofórmio = [14.874,00 µg.mL⁻¹]; Benzeno = [484,00 µg.mL⁻¹].

Solução Padrão Mix: transferir 0,113 mL do Padrão caracterizado de Dimetilsulfóxido (d = 1,1 µg.mL⁻¹); 0,159 mL do Padrão caracterizado de 2-Propanol (d = 0,79 µg.mL⁻¹); 0,119 mL do Padrão caracterizado de Ácido acético (d = 1,05 µg.mL⁻¹); 0,138 mL do padrão caracterizado de Acetato de Etila (d = 0,90 µg.mL⁻¹); 0,124 mL do Padrão caracterizado de Ciclohexano (d = 0,78 µg.mL⁻¹); 0,158 mL do Padrão caracterizado de Acetona (d = 0,79 µg.mL⁻¹); 0,171 mL do Padrão caracterizado de Trietilamina (d = 0,73 µg.mL⁻¹); 0,112 mL do Padrão caracterizado de Terc-butanol (d = 0,78 µg.mL⁻¹); 1 mL da Solução estoque Padrão Mix I; 0,1 mL da Solução estoque Padrão Mix II, para balão

volumétrico de 50 mL, contendo 25 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. Dimetilsulfóxido = [2486,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; 2-Propanol = [2496,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Ácido acético = [2499,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Acetato de Etila = [2484,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Ciclohexano = [1934,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Acetona = [2496,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Trietilamina = [2496,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Terc-butanol = [1747,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Tolueno = [443,70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; n-Hexano = [143,88 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Diclorometano = [297,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Dimetilacetamida = [434,28 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Clorofórmio = [29,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Benzeno = [0,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$].

System Suitability: transferir 0,5 mL da Solução Padrão Mix para balão volumétrico de 5 mL, contendo 2,5 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. Dimetilsulfóxido = [248,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; 2-Propanol = [249,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Ácido acético = [249,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Acetato de Etila = [248,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Ciclohexano = [193,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Acetona = [249,64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Trietilamina = [249,66 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Terc-Butanol = [174,72 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Tolueno = [44,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; n-Hexano = [14,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Diclorometano = [29,79 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Dimetilacetamida = [43,43 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Clorofórmio = [2,97 $\mu\text{g.mL}^{-1}$]; Benzeno = [0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$].

Solução qualitativa individual: Transferir 1,5 mL de metanol para um *vial* de 2,0mL e adicionar 10 μL de cada um dos padrões em *vials* individuais, sendo eles: (Dimetilsulfóxido, 2-Propanol, Ácido acético, Acetato de Etila, Ciclohexano, Acetona, Trietilamina, Terc-butanol, tolueno, n-hexano, clorofórmio, benzeno, diclorometano e dimetilacetamida. Por fim, vedar o *vial* com tampa e septo de silicone.

- **Procedimento analítico**

Injetar separadamente a solução do branco, teste, *System Suitability*, qualitativa individual. Excluir os picos gerado pelo branco.

- **Critérios de aceitação**

Devem ser avaliados os seguintes critérios: cauda de >2 , resolução $\geq 1,5$, sinal ruído >10 e perfil cromatográfico livre de impurezas.

Preparo de amostras Otimizado – linearidade, precisão, exatidão e robustez

NOTA – Os materiais utilizados para o preparo devem estar completamente limpos e isentos de etanol e água purificada.

Diluyente – Dimetilformamida;

Branco – Transferir 3 mL de diluyente para *vial de headspace* 20 mL contendo 2 mL de água purificada. Vedar com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Teste – Transferir 2,50 g da matéria prima Cloridrato de Duloxetina acuradamente pesada, para balão volumétrico de 25 mL contendo cerca de 15 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. [Cloridrato de Duloxetina = 100 mg.mL⁻¹].

Solução Estoque Padrão Mix 1 – Transferir 0,120 mL de padrão caracterizado Metanol (d= 0,792 g.mL⁻¹; Pureza= 100%), 0,202 mL de padrão caracterizado Acetona (d= 0,785 g.mL⁻¹; Pureza= 99,88%), 0,202 mL de padrão caracterizado 2-Propanol (d= 0,7851 g.mL⁻¹; Pureza= 99,98%) para balão volumétrico de 10 mL, contendo cerca de 5 mL do diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. [Metanol = 9504,00 µg.mL⁻¹]; [Acetona = 15837,97 µg.mL⁻¹]; [2-Propanol = 15855,85 µg.mL⁻¹].

Solução Estoque Padrão Mix 2 – Transferir 0,143 mL de padrão caracterizado Diclorometano (d= 1,33 g.mL⁻¹; Pureza= 99,84%), 0,409 mL de padrão caracterizado Terc-butanol (d= 0,775 g.mL⁻¹; Pureza= 99,69%) para balão volumétrico de 100 mL, contendo cerca de 50 mL do diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. [Diclorometano = 1898,86 µg.mL⁻¹]; [Terc-butanol = 3159,92 µg.mL⁻¹].

Solução Padrão Mix – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Mix 1, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Mix 2 para balão volumétrico de 20 mL, contendo cerca de 10 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. [Metanol = 598,75 µg.mL⁻¹]; [Acetona = 997,79 µg.mL⁻¹]; [2-Propanol = 998,92 µg.mL⁻¹]; [Terc-butanol = 199,08 µg.mL⁻¹]; [Diclorometano = 119,63 µg.mL⁻¹].

Preparar, conforme o procedimento abaixo, seis soluções *System suitability*.

System Suitability – Transferir 0,5 mL da Solução Padrão Mix para *vial* de *headspace* 20 mL, contendo 2,5 mL de diluente e 2,0 mL de água purificada. Vedar o *vial* com *crimp* de alumínio e septo de silicone e homogeneizar.

Preparar 4 réplicas, utilizando para cada uma, uma Solução Estoque Teste, Solução Estoque Padrão Mix 1, Solução Estoque Padrão Mix 2 e uma Solução Padrão Mix diferente das demais. O preparo das amostras da linearidade será realizado conforme a TAB. 45 abaixo.

Tabela 45: Preparo das soluções da linearidade

Identificação	Analito	Concentração do analito (µg.mL ⁻¹) ^a	Teor do Analito (µg.g ⁻¹)	Volume Água purificada (mL)	Volume da Solução estoque teste (mL)	Volume diluente (mL)	Volume da Solução Padrão Mix (mL)
Teste	-	-	-			2,0	NA
40%	Metanol	119,75	1197,50			1,8	0,2
	Acetona	199,56	1995,58				
	Terc-butanol	39,82	398,16				
	2-Propanol	199,78	1997,84				
	Diclorometano	23,93	239,26				
80%	Metanol	239,50	2395,00			1,6	0,4
	Acetona	399,12	3991,16				
	Terc-butanol	79,63	796,32				
	2-Propanol	399,57	3995,68				
	Diclorometano	47,85	478,52				
100%	Metanol	299,38	2993,75			1,5	0,5
	Acetona	498,90	4988,95				
	Terc-butanol	99,54	995,40				
	2-Propanol	499,46	4994,60				
	Diclorometano	59,82	598,15				
120%	Metanol	359,25	3592,50	2,0	1,0	1,4	0,6
	Acetona	598,68	5986,75				
	Terc-butanol	119,45	1194,48				
	2-Propanol	599,35	5993,52				
	Diclorometano	71,78	717,78				
160%	Metanol	479,00	4790,00			1,2	0,8
	Acetona	798,23	7982,32				
	Terc-butanol	159,26	1592,64				
	2-Propanol	799,14	7991,36				
	Diclorometano	95,70	957,04				
200%	Metanol	598,75	5987,50			1,0	1,0
	Acetona	997,79	9977,90				
	Terc-butanol	199,08	1990,80				
	2-Propanol	998,92	9989,20				
	Diclorometano	119,63	1196,30				
240%	Metanol	718,50	7185,00			0,8	1,2
	Acetona	1197,35	11973,48				
	Terc-butanol	238,90	2388,96				
	2-Propanol	1198,70	11987,04				
	Diclorometano	143,55	1435,56				

a: Concentração do solvente (µg) a partir da solução padrão mix transferido para o *vial*.

Seletividade Otimizada

O preparo de amostras para as análises de seletividade foi realizado conforme descrito abaixo:

NOTA – Os materiais utilizados para o preparo devem estar completamente limpos e isentos de etanol e água purificada.

Diluyente – Dimetilformamida.

Branco – Transferir 3 mL de diluyente para *vial* de *headspace* de 20 mL contendo 2 mL de água purificada. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

Solução Estoque Padrão Metanol 1ª Diluição – Transferir 120 µL de padrão caracterizado Metanol ($d = 0,792 \text{ g.mL}^{-1}$; Pureza = 100%) para balão volumétrico de 10 mL contendo cerca de 5 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. $[\text{Metanol}] = 9504,00 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Solução Estoque Padrão Metanol 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Metanol 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão $[\text{Metanol}] = 598,75 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Solução Padrão Metanol – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluyente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Metanol 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Acetona 1ª Diluição – Transferir 202 µL do padrão caracterizado Acetona ($d = 0,785 \text{ g/cm}^3$; pureza: 99,88%) para balão volumétrico de 10 mL contendo cerca de 5 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão $[\text{Acetona}] = 15837,97 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Solução Estoque Padrão Acetona 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Acetona 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. $[\text{Acetona}] = 997,79 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Solução Padrão Acetona – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluyente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Acetona 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Terc-butanol 1ª Diluição – Transferir 409 µL do padrão caracterizado Terc-Butanol ($d = 0,775 \text{ g/cm}^3$; pureza: 99,69%) para balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 50 mL de diluyente. Completar o volume do balão com diluyente e homogeneizar por inversão. $[\text{Terc-Butanol}] = 3159,92 \text{ µg.mL}^{-1}$.

Solução Estoque Padrão Terc-butanol 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Terc-butanol 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Terc-butanol] = 199,08 µg.mL⁻¹

Solução Padrão Terc-butanol – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Terc-butanol 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão 2-Propanol 1ª Diluição – Transferir 202 µL do padrão caracterizado 2-Propanol (d= 0,7851 g/cm³; pureza: 99,98%) para balão volumétrico de 10 mL contendo cerca de 5 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. [2-Propanol] = 15855,85 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão 2-Propanol 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão 2-Propanol 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. [2-Propanol] = 998,92 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão 2-Propanol – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão 2-Propanol 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Diclorometano 1ª Diluição – Transferir 143 µL do padrão caracterizado Diclorometano (d= 1,33 g/cm³; pureza: 99,84%) para balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 50 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Diclorometano] = 1898,86 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Diclorometano 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Diclorometano 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 5 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Diclorometano] = 119,63 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Diclorometano – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Diclorometano 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Trietilamina 1ª Diluição – Transferir 436 µL do padrão caracterizado Trietilamina (d= 0,726 g/cm³; pureza: 99,83%) para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 10 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Trietilamina] = 15799,89 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Trietilamina 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Trietilamina 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Trietilamina] = 995,39 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Trietilamina – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Trietilamina 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Acetato de Etila 1ª Diluição – Transferir 440 µL do padrão caracterizado Acetato de Etila (d= 0,900 g/cm³; pureza: 99,88%) para balão volumétrico de 25 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Acetato de Etila] = 15820,99 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Acetato de Etila 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Acetato de Etila 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Acetato de Etila] = 996,72 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Acetato de Etila – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Acetato de Etila 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Ciclohexano 1ª Diluição – Transferir 393 µL do padrão caracterizado Ciclohexano (d= 0,780 g/cm³; pureza: 99,98%) para balão volumétrico de 25 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Ciclohexano] = 12259,15 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Ciclohexano 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Ciclohexano 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Ciclohexano] = 772,33 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Ciclohexano – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Ciclohexano 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Tolueno 1ª Diluição – Transferir 163 µL do padrão caracterizado Tolueno (d= 0,870 g/cm³; pureza: 99,98%) para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. [Tolueno] = 7089,08 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Tolueno 2ª Diluição – Transferir 500 µL da Solução Estoque Padrão Tolueno 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Tolueno] = 177,23 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Tolueno – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Tolueno 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Clorofórmio 1ª Diluição – Transferir 100 µL do padrão caracterizado Clorofórmio (d= 1,492 g/cm³; pureza: 99,81%) para balão volumétrico de 100 mL contendo cerca de 50 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Clorofórmio] = 1489,17 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Clorofórmio 2ª Diluição – Transferir 160 µL da Solução Estoque Padrão Clorofórmio 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Clorofórmio] = 11,91 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Clorofórmio – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Clorofórmio 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Padrão Dimetilsulfóxido 1ª Diluição – Transferir 289 µL do padrão caracterizado Dimetilsulfóxido (d= 1,10 g/cm³; pureza: 99,80%) para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Dimetilsulfóxido] = 15863,21 µg.mL⁻¹.

Solução Estoque Padrão Dimetilsulfóxido 2ª Diluição – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Dimetilsulfóxido 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 15 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão.[Dimetilsulfóxido] = 999,38 µg.mL⁻¹.

Solução Padrão Dimetilsulfóxido – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Padrão Dimetilsulfóxido 2ª Diluição para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Solução Estoque Seletividade – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Trietilamina 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Dimetilsulfóxido 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Terc-butanol 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Diclorometano 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão 2-Propanol 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Acetona 1ª diluição; 1,26 mL da Solução

Estoque Padrão Acetato de Etila 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Metanol 1ª diluição; 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Ciclohexano 1ª diluição, 160 µL da Solução Estoque Padrão Clorofórmio 1ª diluição, 500 µL da Solução Estoque Padrão Tolueno 1ª diluição, para balão volumétrico de 20 mL contendo cerca de 5 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão [Metanol = 598,75 µg.mL⁻¹]; [Acetona = 997,79 µg.mL⁻¹]; [2-Propanol = 998,92 µg.mL⁻¹]; [Terc-butanol = 199,08 µg.mL⁻¹]; [Diclorometano = 119,63 µg.mL⁻¹]; [Trietilamina = 995,39 µg.mL⁻¹]; [Acetato de Etila = 996,72 µg.mL⁻¹]; [Tolueno = 177,23 µg.mL⁻¹]; [Dimetilsulfóxido = 999,38 µg.mL⁻¹]; [Ciclohexano = 772,33 µg.mL⁻¹]; [Clorofórmio = 11,91 µg.mL⁻¹].

Solução Seletividade – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de diluente e 0,5 mL da Solução Estoque Seletividade para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Preparar as Soluções Teste e Seletividade Teste com a matéria-prima de cada fabricante (1,2 e 3).

Solução Estoque Teste – Transferir 500 mg da matéria prima Cloridrato de Duloxetina acuradamente pesada, para balão volumétrico de 5 mL. Adicionar 4 mL de diluente e levar ao vórtex até completa solubilização. Completar o volume com diluente e homogeneizar. [Cloridrato de Duloxetina] = 100 mg.mL⁻¹.

Solução Teste – Transferir 1 mL da Solução Estoque Teste para *vial* de *headspace* de 20 mL contendo 2 mL de água purificada e 2,0 mL de diluente. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

Solução Teste Seletividade – Transferir 2,0 mL de água purificada, 1,5 mL de diluente, 0,5 mL da Solução Estoque Seletividade e 1,0 mL da Solução Estoque Teste para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio.

Solução Padrão Mix – Transferir 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Metanol 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Terc-butanol 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Diclorometano 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão 2-Propanol 1ª diluição, 1,26 mL da Solução Estoque Padrão Acetona 1ª diluição para balão volumétrico de 20 mL, contendo 10 mL de diluente. Completar o volume do balão com diluente e homogeneizar por inversão. [Metanol = 598,75 µg.mL⁻¹]; [Acetona = 997,79 µg.mL⁻¹]; [2-Propanol = 998,92 µg.mL⁻¹]; [Terc-butanol = 199,08 µg.mL⁻¹]; [Diclorometano = 119,63 µg.mL⁻¹].

Preparar, conforme o procedimento abaixo, seis soluções *system suitability*.

Solução System Suitability – Transferir 2,0 mL de água purificada, 2,5 mL de dimetilformamida e 0,5 mL da Solução Padrão Mix para *vial* de *headspace* de 20 mL. Vedar o *vial* com septo de silicone e *crimp* de alumínio e homogeneizar.

Cálculos utilizados para as avaliações

Procedimento analítico

Após estabilização do sistema cromatográfico conforme procedimento operacional padrão do equipamento, injetar separadamente 1,0 mL do Branco. Em seguida, injetar 1,0 mL de cada uma das soluções *System Suitability*.

Para que o sistema esteja válido, o desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas das seis injeções para os solventes Metanol, Acetona, 2-Propanol, Terc-butanol e Diclorometano deve ser no máximo 5,3%. Integrar as áreas dos picos referentes aos analitos de interesse em todas as soluções. A resolução entre os picos dos analitos de interesse e seus adjacentes deve ser maior ou igual a 1,5.

Após o sistema estar adequado, injetar 1,0 mL da Solução Teste e 1,0 mL da Solução Teste Contaminada e registrar os cromatogramas. Desconsiderar os picos obtidos no Branco.

Cálculos

Para calcular a concentração experimental, utilizar a Equação 1:

$$C (Exp) = \frac{V_p \times D_f}{V_B} \times \left(\frac{P_1 \dots P_n}{B_1 \dots B_n} \right) \times 1.000.000 \quad \text{Equação 1}$$

Em que C (Exp) é a concentração, em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, do analito na Solução Padrão Mix; V_p é o volume pipetado do frasco do padrão, em mL; D_f é a densidade do padrão, em $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, informada no rótulo do frasco; V_B é o volume do balão volumétrico, em mL, onde será pipetado o volume retirado do frasco; P_1, \dots, P_n são os volumes pipetados, em mL, no preparo da Solução Padrão Mix; B_1, \dots, B_n são os volumes dos balões volumétricos, em mL, utilizados no preparo da Solução Padrão Mix.

Calcular o teor, em $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, encontrado na amostra pela Equação 2:

$$T (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = 25 \times \left(\frac{C \times V}{m} \right) \times \left(\frac{A_t}{A_{tc} - A_t} \right) \times \frac{P}{100} \quad \text{Equação 2}$$

Em que, T é o teor, em $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, do solvente analisado; 25 é o fator de diluição; C é a concentração, em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, do solvente analisado na Solução Padrão Mix; V é o volume

pipetado, em mL, da Solução Padrão Mix transferido para o *vial no preparo da Solução Teste Contaminada*; m é a massa, em g, pesada para o preparo da Solução Estoque Teste; A_t é a área do solvente analisado na Solução Teste; A_{tc} é a área do solvente analisado na Solução Teste Contaminada; P é a pureza do padrão utilizado, em %.

As amostras são estáveis desde que armazenadas nos respectivos vials fechados na rack do equipamento por 126 horas, e sob condições ambiente do laboratório (temperatura de 15 a 30 °C e umidade relativa do ar <70%).

Caso o resultado seja inferior ao limite de quantificação, o resultado deve ser reportado como menor ou igual a 1197,50 µg de Metanol por grama de amostra; 1995,58 µg de Acetona por grama de amostra, 398,16 µg de Terc-butanol por grama de amostra, 1997,84 µg de 2-Propanol por grama de amostra e 239,26 µg de Diclorometano por grama de amostra de Cloridrato de Duloxetina matéria-prima.

Especificação

Para o fabricante 1 analisar os solventes Metanol, Acetona, 2-Propanol e Diclorometano conforme especificações abaixo:

- Metanol $\leq 3000 \mu\text{g.g}^{-1}$
- Acetona $\leq 5000 \mu\text{g.g}^{-1}$
- Diclorometano $\leq 600 \mu\text{g.g}^{-1}$
- 2-propanol $\leq 5000 \mu\text{g.g}^{-1}$

Para o fabricante 3 analisar os solventes Metanol, Acetona, 2-Propanol e Terc-butanol conforme especificações abaixo:

- Metanol $\leq 3000 \mu\text{g.g}^{-1}$
- Acetona $\leq 5000 \mu\text{g.g}^{-1}$
- 2-Propanol $\leq 5000 \mu\text{g.g}^{-1}$
- Terc-butanol $\leq 1000 \mu\text{g.g}^{-1}$

Para o fabricante 2 analisar o solvente Metanol, conforme especificações abaixo:

- Metanol $\leq 3000 \mu\text{g.g}^{-1}$