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

*ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN (*AQbD*)* COMO FERRAMENTA NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Monalisa Castro Teixeira

Toledo – PR
2023

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

ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN (AQbD) COMO FERRAMENTA NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Monalisa Castro Teixeira

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

Orientador: Dr. Rodrigo Sequinel
Coorientador: Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti

Toledo – PR
2023

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

Castro Teixeira, Monalisa
ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN (AQBD) COMO FERRAMENTA NO DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA / Monalisa Castro Teixeira; orientador Rodrigo Sequinel; coorientador Reinaldo Aparecido Bariccatti. -- Toledo, 2023.
78 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, 2023.

1. Planejamento de Experimentos. 2. Otimização Multivariada. 3. Quimiometria. 4. Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos . I. Sequinel, Rodrigo , orient. II. Aparecido Bariccatti, Reinaldo, coorient. III. Título.

SUMÁRIO

Resumo **9**
Abstract **10**
1. INTRODUÇÃO **11**
2. OBJETIVOS **12**
2.1. Objetivo Geral 12
2.2. Objetivos Específicos 12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **13**
3.1. Cenário Regulatório Nacional Atual 13
3.2. Analytical Quality by Design 13
3.2.1. Perfil Analítico Alvo 14
3.2.2. Atributos Críticos do Método 14
3.2.3. Avaliação de Risco 14
3.2.4. Planejamento de Experimentos (DoE) 14
3.2.4.1. Delineamentos de Triagem **15**
3.2.4.2. Delineamentos de Otimização **16**
3.2.5. *Design Space*/Região Operável do Método 16
3.2.6. Estratégia de Controle e Melhoria Contínua 17
3.2.7. Solventes Residuais 17
3.2.8. Cromatografia em Fase Gasosa 17
3.2.9. Hemifumarato de Bisoprolol 18
3.2.10. Validação de Métodos Analíticos 19
4. MATERIAIS E MÉTODOS **21**
4.1. Amostra 21
4.2. Equipamentos e condições cromatográficas 21
4.3. Software 21
4.4. Padrões e reagentes 21
4.5. Preparo das amostras e soluções 22
5. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS **24**
5.1. Delineamento para Triagem 24
5.1.1 Resultados e Discussão **26**
5.1.3. Análise de Variância **28**
5.1.4. Parâmetros Críticos 28
5.1.5. Considerações Finais do Experimento de Triagem 31
5.2. Delineamentos para Otimização 33
5.2.1. Respostas Avaliadas **33**
5.2.2. Criação de experimentos **33**
5.2.3. Resultados e Discussão **34**

5.2.4. Análise de Variância e Regressão 35
5.3.1. Método Analítico Otimizado.....42
5.3.1.1. Solventes Residuais em Hemifumarato de Bisoprolol Matéria-Prima.....42
6. ROBUSTEZ 44
6.1. Criação dos experimentos.....44
6.2. Resultados e Discussão 44
7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO 48
7.1. Resultados 48
8. CONCLUSÕES.....53
9. REFERÊNCIAS.....54
Apêndice.....58

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQbD – Qualidade por *Design* Analítico – do inglês, *Analytical Quality by Design*

ATP – Perfil Analítico Alvo – do inglês, *Analytical Target Profile*

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMA – Atributos Críticos do Material – do inglês, *Critical Material Attributes*

CQA – Atributos Críticos de Qualidade – do inglês, *Critical Quality Attributes*

DMF – Arquivo Mestre do Fármaco – do inglês, *Drug Maste File*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DoE – Planejamento de Experimentos – do inglês, *Design of Experiments*

DPR – Desvio Padrão Relativo

DS - Região Operacional – do inglês, *Design Space*

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*

HILIC - Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica – do inglês, Hydrophilic Interaction Chromatography

HS – do inglês, *Headspace*

ICH – Conferência Internacional de Harmonização – do inglês, *International Conference on Harmonisation*

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

LTA – Laboratório de Tecnologia Analítica

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

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

PIC/S – Esquema de Cooperação de Inspeção Farmacêutica – do inglês Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme

ppm – partes por milhão

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

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

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

SQC – Substância Química de Referência Caracterizada

SWOT - Forças, Fraquezas, Oportunidades, e Ameaças – do inglês *Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats*

SR – Solvente Residual

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

VOCS – Composto Orgânico Volátil – *do inglês Volatile Organics Compounds*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamentos empregados na triagem 15
Tabela 2 - Delineamentos empregados na etapa de otimização 16
Tabela 3 - Características do ativo* 18
Tabela 4 – Características físico-químicas das principais impurezas orgânicas voláteis controladas no ativo 19
Tabela 5 - Variáveis avaliadas no delineamento experimental de triagem 24
Tabela 6 - Respostas avaliadas no delineamento experimental de triagem 25
Tabela 7 – Relação de ensaios realizados e as respectivas condições experimentais. 25
Tabela 8 – Resultados obtidos para os 6 experimentos aos quais foi possível obter respostas na matriz de planejamento experimental. 28
Tabela 9 - Respostas avaliadas no delineamento experimental 33
Tabela 10 - Variáveis avaliadas no delineamento experimental de triagem 34
Tabela 11 - Experimentos 34
Tabela 12 – Resultados obtidos do delineamento composto central para as respostas R1 a R5 35
Tabela 13 **-** Programação da rampa de aquecimento do forno 42
Tabela 14 - Parâmetros avaliados na robustez 44
Tabela 15 - Delineamento experimental utilizado na robustez 44
Tabela 16 - Resultados de recuperação para a robustez 45
Tabela 17 - Tempos de retenção e resolução dos analitos de interesse na solução amostra contaminada . 49
Tabela 18 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente acetona 49
Tabela 19 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente metanol 49
Tabela 20 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente diclorometano 50
Tabela 21 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente clorofórmio 50
Tabela 22 - Resultados de precisão e exatidão para acetona 51
Tabela 23 - Resultados de precisão e exatidão para metanol 51
Tabela 24 - Resultados de precisão e exatidão para diclorometano 51
Tabela 25 - Resultados de precisão e exatidão para clorofórmio 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cromatograma obtido após injeção do branco (diluente), com zoom de alta aproximação, demonstrando ausência dos analitos. 27
Figura 2 - Cromatograma obtido após injeção da amostra controle (amostra + diluente) 27
Figura 3 - Gráfico de Efeitos Principais para R1 29
Figura 4 – Gráfico de Pareto para R1 29
Figura 5 - Resultado ANOVA para R1 30
Figura 6 - Gráfico de Efeitos Principais para R15 30
Figura 7 – Gráficos de Pareto para R15 31
Figura 8 - Resultado ANOVA para R15 31
Figura 9 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R1 36
Figura 10 - Avaliação dos Resíduos para R1 37
Figura 11 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R2 37
Figura 12 - Avaliação d/os Resíduos para R2 38
Figura 13 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R3 38
Figura 14 - Avaliação dos Resíduos para R3 39
Figura 15 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R4 39
Figura 16 - Avaliação dos Resíduos para R4 40
Figura 17 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R5 40
Figura 18 - Avaliação dos Resíduos para R5 41
Figura 30 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação da acetona 45
Figura 31 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do metanol 46
Figura 32 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do diclorometano . 46
Figura 33 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do clorofórmio 47
Figura 34 - Cromatograma da solução amostra contaminada com os analitos de interesse 48

Analytical Quality By Design (AQbD) como Ferramenta no Desenvolvimento e Validação de Método Analítico por Cromatografia Gasosa

Monalisa Castro Teixeira

Resumo

O Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos, por meio dos guias ICH, descrevem Qualidade por Design (QbD) como “uma abordagem sistemática para o desenvolvimento farmacêutico que começa com objetivos predefinidos e enfatiza o produto, entendimento e controle dos processos, baseado em dados científicos sólidos e gestão do risco da qualidade”. O conceito de QbD pode e deve ser aplicado aos métodos analíticos, uma vez que são parte integrante do desenvolvimento farmacêutico. Assim, surge a Qualidade por Design Analítico (AQbD), um procedimento justificável e recomendado para se reduzir os resultados fora da especificação, obter alto grau de robustez, um método analítico econômico e obter flexibilidade regulatória. O Planejamento de Experimentos (DoE) é um conjunto de ferramentas importantes que inclui delineamentos de triagem e otimização para se estudar variação de fatores e determinar seus efeitos nas respostas, identificando-se assim, quais fatores são mais significantes. Este trabalho teve como objetivo aplicar os conceitos de ferramentas do AQbD no desenvolvimento e validação de método analítico dos solventes residuais acetona, metanol, diclorometano e clorofórmio na matéria-prima Hemifumarato de Bisoprolol por cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização em chama (FID) e modo de injeção *headspace transferline* (HS). Na primeira etapa do estudo, foi realizada uma triagem de fatores utilizando o delineamento Plackett-Burman para se definir as melhores condições de resposta com maximização dos sinais e recuperação dos analito. Na primeira etapa do estudo, foi realizada uma triagem de fatores utilizando o delineamento Plackett-Burman para se definir as melhores condições de resposta com maximização dos sinais e recuperação dos analitos. Com as variáveis pressão de preenchimento e temperatura de incubação sendo as mais significativas, utilizou-se como experimento de otimização o planejamento composto central (CCD) em 5 níveis e 11 ensaios, sendo 4 em cubo, 4 em axial e 3 pontos centrais, com $\alpha=\sqrt{2}$ onde, ao fim, uma tendência de obtenção de melhores resultados foi obtida. Um estudo de robustez, parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento de um método, seguiu-se com a melhor condição dos parâmetros pressão de preenchimento e temperatura de incubação, além de outros tipicamente usados na robustez. Em seguida, a etapa de validação analítica foi realizada conforme RDC 166/2017 demonstrando ser um método seletivo, linear, preciso e exato. A aplicação das ferramentas do AQbD permitiu um melhor entendimento das variáveis, levando a um desenvolvimento de método analítico por cromatografia em fase gasosa de forma racional e alcançando todos critérios de qualidade

Palavras chave: Planejamento de experimentos; Planejamentos de Triagem; Otimização multivariada; Quimiometria.

Analytical Quality By Design (AQbD) as a Tool in Gas Chromatography Method Development and Validation

Monalisa Castro Teixeira

Abstract

The U.S. Department of Health, through their ICH guides, describes Quality by Design (QbD) as "a systematic approach to pharmaceutical development that begins with predefined objectives and emphasizes product, process understanding and control, based on sound scientific data and quality risk management." The concept of QbD can and should be applied to analytical methods, since they are an integral part of pharmaceutical development. Thus, arises Analytical Quality by Design (AQbD), a justifiable and recommended procedure to reduce out-of-specification results, achieve a high degree of robustness, and a cost-effective analytical method and regulatory flexibility. Design of Experiments (DoE) is an important tool set that includes screening and optimization designs to study variation in factors and determine their effects on responses, thus identifying which factors are most significant. This work aimed to apply the concepts of AQbD tools in the development and validation of an analytical method for the residual solvents acetone, methanol, dichloromethane and chloroform in the raw material Bisoprolol Hemifumarate by gas chromatography with flame ionization detection (FID) and headspace transferline (HS) injection mode. In the first step of the study, a factor screening was performed using the Plackett-Burman design to define the best response conditions with maximization of signals and recovery of analytes. With the variables filling pressure and incubation temperature being the most significant, the central composite design (CCD) was used as an optimization experiment in 5 levels and 11 trials, 4 in cube, 4 in axial and 3 central points, with $\alpha=\sqrt{2}$ where, at the end, a tendency to better results was obtained. A robustness study, a parameter typically performed in method development, followed with the best condition of the parameters fill pressure and incubation temperature, in addition to others typically used in robustness. Then, the analytical validation step was performed according to RDC 166/2017 demonstrating that the method is selective, linear, precise and accurate method. The application of the AQbD tools allowed a better understanding of the variables, leading to the development of an analytical method by gas chromatography in a rational way and achieving all the criteria required.

Keywords: Design of Experiments; Screening designs; Multivariate Optimization; Chemometry.

1. INTRODUÇÃO

A busca pela criação de ferramentas analíticas mais eficientes e tecnológicas sempre impulsionou a indústria farmacêutica, visto que é um setor em constante crescimento econômico não apenas nacional como também mundial. Desta maneira, a tecnologia torna-se dinâmica e é explorada ao máximo, como forma de aumentar a produtividade mantendo-se a eficácia e segurança dos processos [1]. A implantação destas tecnologias traz inúmeras oportunidades para toda a indústria, mas levam também desafios econômicos e principalmente regulamentares, que devem ser avaliados.

Na indústria farmacêutica, para que o desenvolvimento alcance os objetivos predefinidos, é fundamental que se conheça todo o processo e o controle dos produtos. A *Food and Drug Administration* (FDA), agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, tem encorajado uma conduta proativa para introduzir inovações e benefícios associados ao processo de produção farmacêutica. Surgiu assim o termo *Quality by Design* (QbD), ou "Qualidade por Projeto" que traz a concepção de que a qualidade, segurança e eficácia devem ser pensados desde a concepção inicial do projeto, e controlados em cada etapa do processo para maximizar as chances de que o produto alcance seus atributos de qualidade e as especificações [2]. Essa abordagem sistemática vem sendo empregada como modelo racional de planejamento de método, e utiliza softwares ou ferramentas estatísticas para tal fim.

O desenvolvimento e validação de um determinado procedimento analítico almejam demonstrar a obtenção de um método que seja reprodutível 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 dos resultados analíticos para as tomadas de decisões e garantia de adequação ao que foi proposto. O conceito de QbD aplicado ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos é denominado AQbD (*Analytical Quality by Design*) e permite o desenvolvimento de métodos analíticos robustos e flexíveis, e que contrastam com a prática baseada em "um fator por vez" (*one factor at a time* – OFAT) ainda muito presente nos dias atuais [3-4].

A cromatografia em fase gasosa (CG) é frequentemente usada na indústria farmacêutica para se determinar os traços de impurezas voláteis em produtos farmacêuticos [5]. Ao adotar esta técnica cromatográfica, uma série de parâmetros devem ser ajustados para atingir a melhor condição analítica, dentre os quais, temperatura da coluna, taxas de aquecimento do forno, vazão do gás de arraste, modo de injeção, condições de amostragem quando aplicável, além de parâmetros da coluna, como dimensões e constituição da fase estacionária.

O AQbD pode ser o caminho de escolha para a otimização destes parâmetros, visando o desenvolvimento de um método adequado e com a melhor eficiência possível, em acordo com a criticidade esperada pelas agências regulatórias nacionais e internacionais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Utilizar as ferramentas do *Quality by Design* para o desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia em fase gasosa para o controle de solventes residuais na matéria-prima Hemifumarato de Bisoprolol.

2.2. Objetivos Específicos

Estabelecer o perfil analítico alvo (ATP) contemplando as características dos solventes residuais usados na síntese do insumo farmacêutico ativo (IFA) e as características iniciais do método de análise;

Utilizar planejamentos fatoriais para realizar a triagem das condições analíticas relevantes que afetam as respostas cromatográficas de interesse;

Analisar os resultados do planejamento fatorial, selecionar e estudar as variáveis mais relevantes em detalhe por meio do delineamento de otimização, visando definir a melhor condição de operação do método analítico;

Avaliar a robustez do método cromatográfico para análise de solventes residuais relacionados à matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol;

Validar o método analítico através dos parâmetros de validação precisão, exatidão, linearidade e seletividade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cenário Regulatório Nacional Atual

Com todo o avanço das inovações tecno-científicas, as indústrias farmacêuticas nacionais estão cada vez mais incentivadas a se modernizarem regularmente e a melhorarem a qualidade de seus processos. Para isso, a ANVISA publicou em 2019, após quase dez anos sem sofrer atualização, a RDC 301 que tem como objetivo definir novas diretrizes de boas práticas de fabricação. Na prática, a RDC 301/19 aumenta o rigor na gestão de qualidade. O objetivo é fazer com que os fabricantes brasileiros consigam acessar mercados internacionais com mais facilidade, aumentando assim as exportações e se tornando mais competitivos [6].

Impulsionada por esse pensamento, a ANVISA se filiou, em novembro de 2020, ao Esquema de Cooperação em Inspeção Farmacêutica (PIC/S, do inglês *Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme*), uma ação cooperativa mundial entre agências sanitárias reguladoras de mais de 50 países que visa harmonizar os conceitos relacionados a Boas Práticas de Fabricação (BPF) com olhar crítico para o desenvolvimento farmacêutico [7].

Nesse processo, a ANVISA passa a exigir da indústria farmacêutica nacional a adoção de abordagens mais robustas e de formalização da avaliação dos riscos numa ótica do ciclo de vida. As estratégias para tal são livres, mas tomam uma nova base para a introdução do QbD em todas as fases de desenvolvimento do produto, inclusive no desenvolvimento de um método analítico.

O conceito de QbD foi primeiramente atribuído ao doutor Joseph M. Juran em 1990, 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 especificações. No contexto analítico, esse conceito vem sendo ampliado e é denominado de Qualidade por Design Analítico (AQbD), em que se visa o desenvolvimento de métodos analíticos robustos que possam ser aplicados durante todo o ciclo de vida do produto [8-9].

3.2. Analytical Quality by Design

Desde que foi apresentado pela primeira vez em 2008 pelo *US Food and Drug Administration* (FDA) por meio do *International Conference on Harmonization* (ICH) Q8(R1) – Q11, o QbD tem sido um grande desafio para as industrias farmacêuticas buscarem um processo bem definido, que seja modelo, e reconhecendo que qualidade não é alcançada aumentando-se o número de análises, mas sim construída junto com o produto [10-11].

Atualmente, estimulado pelos órgãos regulatórios, esse conceito vem se estendendo para a área analítica, e sendo bastante aplicável principalmente em métodos cromatográficos. A implementação do AQbD garante alto grau de robustez, flexibilidade regulatória e um total entendimento do método analítico. Porém, para adotar essa abordagem, é necessário aplicação de várias etapas até chegar ao almejada região ótima de trabalho [12].

3.2.1. Perfil Analítico Alvo

O primeiro passo na construção do AQbD é definir o ATP (do inglês, *Analytical Target Profile*). O ATP é o conjunto dos alvos analíticos que define o que será medido (insumo farmacêutico ativo – IFA; ou uma impureza), a técnica analítica a ser utilizada (cromatografia em fase líquida de alta eficiência – CLAE; cromatografia em fase gasosa – CG, etc.) e os critérios de desempenho a serem alcançados (precisão, exatidão etc.). O ATP é a base para o desenvolvimento de método que seja adequado para o propósito ao qual foi definido [13-15].

3.2.2. Atributos Críticos do Método

Os atributos críticos do método, nomeado CMA (*Critical Method Attributes*) são as respostas que serão medidas para controlar o desempenho do método. Também chamada de CQA (*Critical Quality Attributes*), é uma etapa diretamente ligada ao tipo de técnica analítica que será aplicada no estudo. Em CLAE, um CMA/CQA são a fase móvel, o pH, o diluente e a seleção da coluna por exemplo. Já em CG seria considerado CMA/CQA a vazão do gás de arraste, a temperatura do forno ou sua programação de temperatura, por exemplo. [14].

3.2.3. Avaliação de Risco

A fim de facilitar a escolha dos CMA/CQA de alto risco, ou seja, aquele parâmetro que apresenta potencial risco para o método, são sugeridas como etapa do QbD, o uso de ferramentas de avaliação de risco. O gerenciamento da avaliação de risco na indústria farmacêutica é um processo sistemático que garante as decisões praticadas [2].

Ela pode ser realizada de várias formas, seja informal/empírica, como utilizando ferramentas mais consolidadas, como o diagrama de Ishikawa, o FMEA, 5W2H, SWOT, entre outros.

3.2.4. Planejamento de Experimentos (DoE)

O *design* ou planejamento de experimentos, mais conhecido como DoE, é uma ferramenta importante do AQbD e consiste em aplicar modelos matemáticos e estatísticos na etapa de avaliação dos principais fatores (variáveis independentes) que afetam as respostas (variáveis dependentes) de um experimento, um produto, ou mesmo um método analítico. Com ele é possível determinar a relação entre os fatores que afetam o processo e seus *outputs*, tendo como premissa a avaliação multivariada da influência de cada fator e entre fatores. O resultado é um melhor desempenho laboratorial realizando-se poucos experimentos, requerendo o mínimo de investimento e oferecendo o máximo de retorno em termos de informações de interações de múltiplos fatores [16-18].

No caso da otimização de um método analítico ao se utilizar o DoE na etapa de desenvolvimento, todos os fatores que podem causar alguma influência na resposta são avaliados de forma simultânea. Trata-se de uma importante alternativa ao modelo de otimização univariada, em que cada um dos fatores que afetam a resposta é verificado de forma isolada. Desta forma o DoE pode ser utilizado para indicar melhor caminho para otimização com um número reduzido de experimentos. Ao

final do DoE, a região de operação aceitável do método é definida, o MODR (do inglês, *Method Operable Design Region*) [16-18].

Para eleger o melhor delineamento experimental, é preciso considerar os objetivos definidos, o número de fatores estudados e a eficácia de cada delineamento. No geral, os delineamentos experimentais podem ser divididos em dois tipos: Delineamentos de triagem e delineamentos de otimização.

3.2.4.1. Delineamentos de Triagem

Os delineamentos de triagem são usados para reduzir o número de experimentos quando há muitos fatores a serem considerados. A triagem é uma alternativa de se identificar efeitos principais significativos assumindo que as interações entre os fatores possuem magnitude menos relevante. As principais ferramentas de triagem são delineamento fatorial fracionado, Taguchi e Plackett-Burman. Cada delineamento juntamente com suas principais características é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamentos empregados na triagem

Delineamento	Número de fatores	Resolução	Número de experimentos
Fatorial fracionado	> 4	III ou >	2^{k-p}
Taguchi	> 6	IV	Matrizes ortogonais L4 – L18
Plackett-Burman	n – 1	III	n (múltiplo de 4)

k = número de fatores; p = número de fracionamento, L = níveis.

O delineamento fatorial fracionado são os mais amplamente utilizados para a triagem quando os fatores estudados excedem em 4 ou 5 e representam uma parte de um planejamento fatorial completo. Sua principal limitação está relacionada à confusão, ou *alias*, de efeitos principais e interações.

O termo “resolução” refere-se à capacidade de um delineamento de estimar efeitos e interações sem confundir. Delineamentos com resolução III apresentam efeitos principais confundidos com efeitos de segunda ordem, e os efeitos de segunda ordem confundidos entre si. Em delineamentos com resolução IV, os efeitos principais são confundidos com efeitos de terceira ordem. Já os delineamentos com resolução V, os efeitos principais são confundidos com efeitos de quarta ordem, e interações de segunda ordem com efeitos de terceira ordem. Resumidamente, quanto menor a resolução, maior a imprecisão durante a interpretação dos resultados [19].

O planejamento Taguchi são métodos comumente aplicados em projetos e produtos de engenharia para determinação de configurações de um parâmetro produzindo melhores níveis de desempenho com mínima variação do processo. Nesse estudo, são utilizadas matrizes ortogonais para se reduzir o número de experimentos e realizar o controle de qualidade “off-line” a um custo relativamente baixo [20-21].

Os delineamentos Plackett-Burman são matrizes úteis quando se objetiva produzir uma estimativa de todos os efeitos principais com o menor número de experimentos possíveis. São usados para investigar um número de variáveis com n - 1 experimentos propondo n projetos experimentais para mais de

sete fatores e especialmente para experimentos n × 4 (múltiplos de 4), ou seja, 8, 12, 16, 20, etc., que são adequados para estudar até 7 , 11, 15, 19, etc. fatores, respectivamente [22].

3.2.4.2. Delineamentos de Otimização

Os delineamentos fatoriais completos de 3 níveis, delineamentos de compósito central e delineamentos Box-Behnken são os delineamentos de otimização mais usados, pois permitem modelar superfícies de respostas complexas [19]. No entanto, devido ao maior número de experimentos necessários, eles são geralmente usados para estudar um número reduzido de fatores, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamentos empregados na etapa de otimização

Delineamento	Níveis de fatores	Número de experimentos
Composto central (CCD)	5	2^k+2k+Cp
Box-Behnken (BBD)	3	2k(k-1)+Cp
Fatorial completo (3 níveis)	3	3^k

k = número de fatores Cp: ponto central

O delineamento fatorial completo de 3 níveis é geralmente usado apenas quando no máximo 2 ou 3 fatores são estudados devido ao grande número de experimentos necessários. O Delineamento Composto Central (CCD) é um dos modelos de otimização mais usados, pois permite a avaliação de 5 níveis para cada fator com um número reduzido de experimentos necessários quando comparado ao delineamento fatorial completo de 3 níveis. Esse delineamento consiste em pontos do delineamento fatorial, pontos axiais e ponto central. O delineamento Box-Behnken é um tipo especial de delineamento fatorial fracionado de 3 níveis, que permite a modelagem de superfícies respostas de 1ª e 2ª ordem. Esse modelo apresenta melhor custo-benefício do que os delineamentos fatoriais completos de 3 níveis, quando se estuda um número grande de fatores [19].

A principal vantagem dos delineamentos de otimização é que eles podem ser ajustados com base em uma função linear + quadrática, ou seja, permitem avaliar a curvatura da superfície resposta [23].

3.2.5. *Design Space*/Região Operável do Método

Um dos conceitos que mais é apresentado quando se trabalha com QbD, tem sido o *design space* (DS). Aplicado em AQbD o DS vira a região de design operável do método (do inglês, *method operable design region* – MODR). O MODR nada mais é do que combinações multidimensionais de variáveis de entrada e variáveis de saída, atribuídas pelo pesquisador, para se discriminar uma região ótima na qual serão limitadas as zonas de robustez e que possuem garantia de desempenho do método analítico frente aos órgãos regulatórios, podendo o método analítico variar dentro dessa região [24].

3.2.6. Estratégia de Controle e Melhoria Contínua

A estratégia de controle é responsável por assegurar que o método mantenha seu desempenho, garantindo que o CMA esteja dentro do limite esperado e os requisitos do ATP sejam atingidos [25].

No AQbD, a estratégia de controle é obtida por meio de dados coletados durante o desenvolvimento e validação do método. O Monitoramento contínuo do desempenho do método permite detectar, identificar e direcionar resultados fora de tendência do método analítico [4].

Aplicar a abordagem AQbD permite a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do método analítico, reduzindo a variabilidade do produto e reduzindo resultados fora da especificação, por exemplo.

3.2.7. Solventes Residuais

Durante a síntese de IFAs, excipientes e até mesmo na fabricação do produto acabado, muitos solventes orgânicos são utilizados [26] seja em etapas reacionais como meio de reação como em etapas de purificação e cristalização. Porém, esses solventes orgânicos não são desejáveis no produto final, pois podem exercer influência na característica cristalina, pureza ou solubilidade do produto, e ainda, ser um risco potencial para a saúde humana devida à sua toxicidade [27].

Mesmo após a aplicação de processos para eliminação destes solventes orgânicos, pequenas quantidades ainda permanecem na matéria-prima ou produto acabado, sendo conhecidos como compostos orgânicos voláteis (do inglês *Volatile Organics Compounds*, VOCS). Portanto, faz-se necessário o constante monitoramento do controle de qualidade de solventes residuais (SR), sendo necessária a utilização de guias internacionais. O ICH, por exemplo, finalizou em 1997 o Guia Q3C sobre SR, que classifica os solventes orgânicos comumente utilizados em três classes de acordo com seu possível risco à saúde humana. Solventes de Classe 1, são aqueles considerados mais tóxicos devendo ser evitados (exemplo: benzeno, 1,2 dicloroetano); Classe 2, são os solventes que devem ser limitados por serem menos tóxicos do que a Classe 1 (exemplo: acetonitrila, metanol) e os de Classe 3, são os solventes com menores potenciais de toxicidade (exemplo: acetona, 2-propanol) [28].

3.2.8. Cromatografia em Fase Gasosa

A cromatografia em fase gasosa (CG) é a técnica mais recomendada para análise de solventes residuais devido sua compatibilidade com o baixo ponto de ebulição dos solventes voláteis, a diversidade de fases estacionárias disponíveis e pela eficiência das colunas capilares. Apresentada pela primeira vez em 1952 por A.J. Martin e A.T. James, CG é uma técnica baseada nas diferenças de comportamento e de partição entre uma fase móvel (gás inerte) e uma fase estacionária entre os componentes de uma mistura (amostra) na fase gasosa. Algumas técnicas de amostragem em CG incluem injeção *on-collumn* (injeção direta na coluna), *flash vaporization* (vaporização rápida) e amostragem por *headspace* (HS), uma técnica direta de análise [29-30].

Dentre os detectores em CG, o detector FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*) é o mais empregado devido à sua universalidade, sensibilidade e linearidade com mínima interferência de fatores como temperatura do detector e fluxo do gás, sendo empregado em diversos setores, como de fragrâncias, alimentos, farmacêuticos e indústria petroquímica [29-32]. Além disso, a resposta FID é previsível, por ser baseada no número de átomos de carbono presentes na molécula orgânica. O carbono, devido às condições de temperatura do detector, passa pelo processo de combustão, produzindo CO_2(g), H_2O(g) e espécies carregadas, como o íon CHO^+, este sim é o responsável pela resposta no FID. Caso haja heteroátomos na estrutura do analito, como oxigênio, o processo de oxidação produzirá menos íons CHO^+, diminuindo o sinal no detector [33].

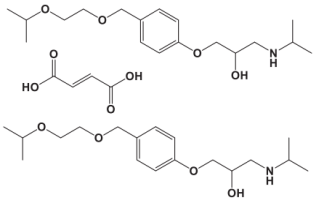
3.2.9. Hemifumarato de Bisoprolol

Hemifumarato de Bisoprolol é um *β*-bloqueador cardiosseletivo usado como tratamento de primeira linha no controle da hipertensão, *angina pectoris* e insuficiência cardíaca congestiva, quase completamente absorvida pelo trato gastrointestinal e sofre um metabolismo mínimo de primeira passagem, resultando em uma biodisponibilidade oral de cerca de 90%. No entanto, a dosagem múltipla de vários comprimidos convencionais de liberação imediata é necessária para manter o nível terapêutico desejado. Portanto, formulações de liberação sustentada do fármaco podem ser benéficas para reduzir a frequência de dosagem com melhor adesão do paciente [34].

Quimicamente designado pela IUPAC como *but-2-enedioic acid;1-(propan-2-ylamino)-3-[4-(2-propan-2-yloxyethoxy methyl)phenoxy] propan-2-ol* [30], o Hemifumarato de Bisoprolol é um pó branco ou quase branco, ligeiramente higroscópico. Possui massa molar de 766,96 g/mol, é muito solúvel em água e metanol, facilmente solúvel em clorofórmio e ácido acético e ligeiramente solúvel em acetona e acetato de etila [35-36].

As características físico-químicas da molécula estão reunidas na Tabela 3 e são uma ferramenta para se melhor conhecer um composto de interesse e melhor nortear quais técnicas analíticas podem ser aplicadas de acordo com o interesse do estudo.

Tabela 3 - Características do ativo*

Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	pKa	Log P	Termodinamicamente estável?
Hemifumarato de Bisoprolol	104344-23-2		$C_{40}H_{66}N_2O_{12}$	9,5	2,15	Sim

*Fonte: PubChem [35]

Os solventes residuais, ou impurezas orgânicas voláteis, utilizados na rota sintética do Hemifumarato de Bisoprolol, sejam como material de partida, ou intermediário, bem como suas características físico-químicas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características físico-químicas das principais impurezas orgânicas voláteis controladas no ativo

Impureza/Analito	Massa molar (g/mol)	Temperatura de ebulição (°C)	Pressão de vapor (mmHg 25°C)	Polaridade
Metanol[37]	32,04	64,7	127,0	Polar
Acetona[38]	58,08	56,0	231,0	Polar
Diclorometano[39]	84,93	40,0	435,0	Apolar
Clorofórmio[40]	119,37	62,0	197,0	Apolar

Essas características físico-químicas dos analitos em estudo podem ser usadas para definir as condições cromatográficas iniciais. 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 ao se utilizar o modo de injeção *headspace*, por exemplo. Com isso, para analitos que atendam essas características, a escolha de outro modo de injeção, como a injeção direta, se faz necessária.

A partir destas informações presentes no documento de fabricação da matéria-prima fornecido pelo fabricante do material, foi dado continuidade no desenvolvimento com os testes iniciais e aplicação do AQbD.

3.2.10. Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação. Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos são adequados para o uso desejado [41-42].

No processo de validação analítica vários parâmetros são avaliados, tais como exatidão, precisão, seletividade, linearidade e limite de detecção e quantificação.

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Já a precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Esta última deve ser avaliada nas condições de repetibilidade ou reprodutibilidade [42].

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz [42].

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para isso,

utiliza-se uma curva de resposta que é construída por meio de gráficos de calibração e tratamentos estatísticos [42].

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 precisão determinada [42] Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação. Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos são adequados para o uso desejado [41-42].

No processo de validação analítica vários parâmetros são avaliados, tais como exatidão, precisão, seletividade, linearidade e limite de detecção e quantificação.

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Já a precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Esta última deve ser avaliada nas condições de repetibilidade ou reprodutibilidade [42].

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz [42].

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Para isso,19

utiliza-se uma curva de resposta que é construída por meio de gráficos de calibração e tratamentos
estatísticos [42].

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 precisão determinada [42]

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Tecnologia Analítica (LTA) de uma Empresa Farmacêutica, fora da rotina de trabalho. Trata-se de planejamento de experimentos, multivariado, que passará por análise crítica e poderá ser considerada para uso futuro em etapas de desenvolvimento de métodos analíticos para controle de qualidade. As informações de localidade e identidade da empresa foram preservadas.

4.1. Amostra

A amostra utilizada no trabalho corresponde ao Hemifumarato de Bisoprolol matéria-prima, adquirida junto a fornecedores. As informações sobre as impurezas orgânicas voláteis presente na amostra encontra-se no documento denominado *Drug Master File* (DMF, em português, Arquivo Mestre do Fármaco). Esse documento também traz outros dados sobre o insumo farmacêutico como rota produtiva, polimorfismo, dados de estudo de estabilidade, impurezas relacionadas, conservação e manuseio além de certificados analíticos.

4.2. Equipamentos e condições cromatográficas

Por tratar-se de uma amostra sólida e os analíticos de interesse serem solventes residuais voláteis, foi escolhida a técnica de cromatografia em fase gasosa com amostragem por sistema *Headspace* e detector do tipo ionização por chama.

O equipamento utilizado corresponde ao cromatógrafo a gás da marca Agilent, modelo 7890 A, acoplado ao amostrador para injeção *Headspace Transferline* modelo 7697 A e detector FID, com coluna cromatográfica DB-WAX (fase estacionária polietilenoglicol) com dimensões 30 m x 0,53 mm e 1,0 µm de espessura de filme da marca Agilent. A rampa de aquecimento do forno foi programada na seguinte condição, temperatura inicial (variável otimizada no desenvolvimento) mantida por 10 min, seguida de aquecimento a uma taxa de 20 °C min^{-1} até atingir a temperatura de 200 °C, mantida por 5 min.. A temperatura do injetor foi mantida em 200 ºC e a temperatura do detector em 250 °C. Ar sintético e hidrogênio em um fluxo de 300 mL/min e 40 mL/min, respectivamente, foram utilizados para manter a chama. Gás nitrogênio de alto grau de pureza (>99,998%) do fornecedor White Martins foi utilizado como gás de arraste (vazão otimizada no desenvolvimento). Foi utilizado modo de injeção com divisão da amostra na razão de 5:1. O controle do instrumento e a aquisição e análise de dados foram realizados com o *software ChemStation* (Versão 3.2 (3.2.4)).

4.3. Software

Para elaboração do planejamento experimental, análise dos dados e avaliação estatística dos resultados foi utilizado o software *Minitab*® 18, licença teste.

4.4. Padrões e reagentes

Foram utilizadas substâncias químicas de referência caracterizadas (SQC) dos solventes de interesse metanol, acetona, diclorometano e clorofórmio. Dimetilsulfóxido (DMSO) da Merck foi usado como diluente no preparo das soluções.

4.5. Preparo das amostras e soluções

O preparo das soluções seguiu conforme a especificação de máxima exposição diária para cada solvente por grama de amostra, segundo os guias nacionais e internacionais. Metanol, diclorometano e clorofórmio, solventes de classe 2, possuem especificação de 3000 ppm, 600 ppm e 60 ppm, respectivamente. Já a acetona, solvente de classe 3, possui uma especificação de 5000 ppm [28].

Solução branco foi preparada a partir de 5,0 mL de diluente transferidos diretamente para *vial* de HS, e as amostras controles foram preparadas pesando 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol diretamente para *vial* de HS e adicionando 5,0 mL de diluente.

Solução estoque padrão A: foram pesados 300 mg do padrão de metanol, 500 mg do padrão de acetona e 60 mg do padrão de diclorometano para balão de 100 mL, completado com diluente.

Solução estoque padrão B: foi pesado 60 mg do padrão de clorofórmio para balão de 100 mL, completado com diluente.

Solução amostra contaminada a 100% da especificação: transferiu-se 5,0 mL da solução estoque padrão A e 0,5 mL da solução estoque padrão B para balão de 50 mL, completado com diluente. Dessa solução pipetou-se 5,0 mL para *vial* de HS contendo 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Esta solução continha aproximadamente 3000 ppm de metanol, 5000 ppm de acetona, 600 ppm de diclorometano e 60 ppm de clorofórmio.

Solução amostra contaminada a 120% da especificação: pipetou-se 6,0 mL da solução estoque padrão A e 0,6 mL da solução estoque padrão B para balão de 50 mL, completado com diluente. Dessa solução pipetou-se 5,0 mL para *vial* de HS contendo 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Esta solução continha aproximadamente 3600 ppm de metanol, 6000 ppm de acetona, 720 ppm de diclorometano e 72 ppm de clorofórmio.

Solução amostra contaminada no Limite de Quantificação (LQ) de 1% da especificação: pipetou-se 0,05 mL da solução estoque padrão A e 0,005 mL da solução estoque padrão B para balão de 50 mL, completado com diluente. Dessa solução pipetou-se 5, 0mL para *vial* de HS contendo 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Esta solução continha aproximadamente 30 ppm de metanol, 50 ppm de acetona, 6 ppm de diclorometano e 0,6 ppm de clorofórmio.

Solução amostra contaminada no Limite de Quantificação (LQ) de 3% da especificação: pipetou-se 0,15 mL da solução estoque padrão A e 0,015 mL da solução estoque padrão B para balão de 50 mL, completado com diluente. Dessa solução pipetou-se 5,0 mL para *vial* de HS contendo 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Esta solução continha aproximadamente 90 ppm de metanol, 150 ppm de acetona, 18 ppm de diclorometano e 1,8 ppm de clorofórmio.

Solução amostra contaminada no Limite de Quantificação (LQ) de 30% da especificação: pipetou-se 1,5 mL da solução estoque padrão A e 0,15 mL da solução estoque padrão B para balão de 50 mL, completado com diluente. Dessa solução pipetou-se 5,0 mL para *vial* de HS contendo 500 mg da matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Esta solução continha aproximadamente 900 ppm de metanol, 1500 ppm de acetona, 180 ppm de diclorometano e 18 ppm de clorofórmio.

5. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1. Delineamento para Triagem

Durante a primeira etapa de triagem, o objetivo foi avaliar a relevância dos fatores em relação às respostas de interesse. Esta etapa é importante pois a partir dela seleciona-se apenas os fatores significativos para o desenvolvimento analítico.

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental do tipo Plackett-Burman com 8 fatores e 2 níveis. Na Tabela 5 são apresentadas todas as variáveis sendo que A a F estão relacionados às condições de amostragem no *headspace* e as variáveis G e H relacionadas às condições da separação na coluna. Nas Tabelas 6 e 7 são aparesentadas as variáveis estudadas e a matriz de ensaios de cada ensaio com sua respectiva condição experimental, respectivamente.

Tabela 5 - Variáveis avaliadas no delineamento experimental de triagem

Variável	Nome	Unidade	Nível Inferior	Nível Superior
A	Temperatura de Incubação	ºC	70	80
B	Tempo de incubação	Min	15	25
C	Velocidade de agitação do *vial*	agitações/min com aceleração de cm/s²	0	2
D	Fluxo de preenchimento	mL/min	45	55
E	Pressão de preenchimento	Psi	10	20
F	Tempo de equilíbrio de pressão	Min	0,1	0,3
G	Temperatura inicial do forno da coluna	ºC	35	45
H	Vazão do gás de arraste	mL/min	2	3

Tabela 6 - Respostas avaliadas no delineamento experimental de triagem

Respostas	Nome
R1	Recuperação no LQ* Acetona (1%)
R2	Recuperação no LQ* Metanol (1%)
R3	Recuperação no LQ* Diclorometano (3%)
R4	Recuperação no LQ* Clorofórmio (30%)
R5	Recuperação no 100% Acetona
R6	Recuperação no 100% Metanol
R7	Recuperação no 100% Diclorometano
R8	Recuperação no 100% Clorofórmio
R9	Recuperação no 120% Acetona
R10	Recuperação no 120% Metanol
R11	Recuperação no 120% Diclorometano
R12	Recuperação no 120% Clorofórmio
R13	S/N** no LQ Acetona
R14	S/N** no LQ Metanol
R15	S/N** no LQ Diclorometano
R16	S/N** no LQ Clorofórmio
R17	Resolução no 120% Metanol
R18	Resolução no 120% Diclorometano
R19	Resolução no 120% Clorofórmio

*LQ: Limite de Quantificação. **S/N: razão sinal/ruído

Tabela 7 – Relação de ensaios realizados e as respectivas condições experimentais.

Experim. \ Variável	A	B	C	D	E	F	G	H
1	80	15	2	45	10	0,1	45	3
2	80	25	0	55	10	0,1	35	3
3	70	25	2	45	20	0,1	35	2
4	80	15	2	55	10	0,1	35	2
5	80	25	0	55	20	0,1	45	2
6	80	25	2	45	20	0,3	35	3
7	70	25	2	55	10	0,3	45	2
8	70	15	2	55	20	0,1	45	3
9	70	15	0	55	20	0,3	35	3
10	80	15	0	45	20	0,3	45	2
11	70	25	0	45	10	0,3	45	3
12	70	15	0	45	10	0,1	35	2

5.1.1 Resultados e Discussão

O perfil analítico alvo do método foi definido como o desenvolvimento de um método analítico para quantificação dos solventes residuais metanol, acetona, diclorometano e clorofórmio na matéria-prima Hemifumarato de Bisoprolol e que se demonstre ser seletivo, linear, preciso e exato dentro da faixa de especificação do método. Em análise de solventes residuais, as recomendações de precisão e exatidão são DPR ≤ 20% e recuperação de 80% - 120%, respectivamente [41].

Para definição das condições cromatográficas iniciais para o desenvolvimento do método foram adotadas as condições descritas no relatório técnico do fabricante da matéria-prima. A partir destas condições foram propostas as condições de teste descritas anteriormente na Tabela 7.

O objetivo de utilizar uma abordagem DOE é fornecer testes suficientes para ajustar as equações que correlacionam a função de resposta com parâmetros independentes [42]. Para essa finalidade, foi empregado primeiramente um estudo de triagem dos fatores, seguida de otimização do método, para então propor uma superfície de resposta.

5.1.2. Verificação e otimização das Condições Cromatográficas

Inicialmente, uma injeção do branco (contendo somente diluente) foi realizada para fins de verificação do sistema (Figura 1). Em seguida foi realizada injeção da amostra controle (amostra + diluente) para avaliação da presença ou ausência de algum solvente residual na matéria-prima (Figura 2). Com essa injeção, verificou-se que o solvente residual acetona já estava presente na amostra em concentração aproximada de 5 ppm. Por fim, os experimentos delineados na Tabela 3 puderam ser então executados.

Para cada experimento realizado foram injetadas uma solução branco, uma solução amostra controle, uma solução amostra contaminada no LQ 1%, uma solução amostra contaminada no LQ 3%, uma solução amostra contaminada no LQ 30%, uma solução amostra contaminada a 100% da especificação do solvente e uma solução amostra contaminada a 120% da especificação do solvente.

A injeção da amostra controle em cada experimento serviu para que a concentração de acetona presente fosse descontada de cada injeção de amostra contaminada com padrão e assim obter o real valor de concentração e recuperação do solvente nas devidas injeções.

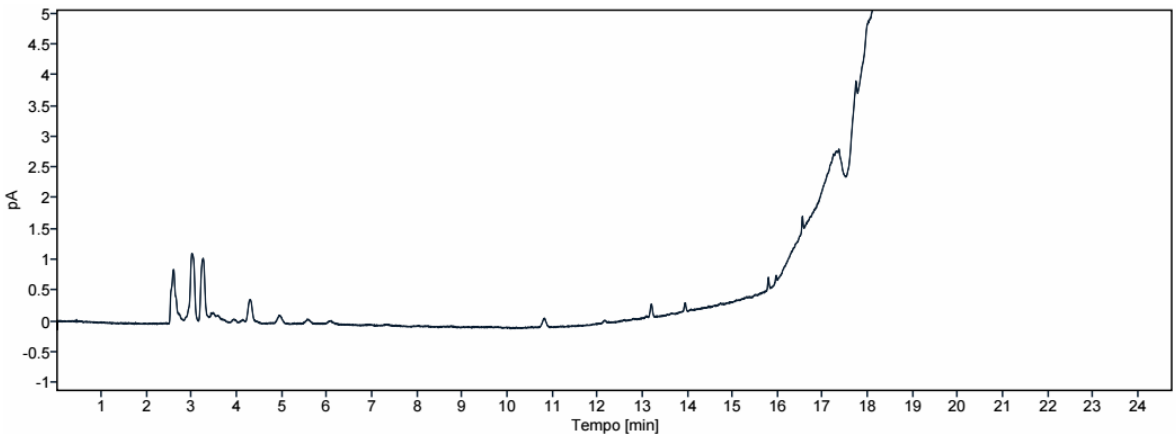


Figura 1 – Cromatograma obtido após injeção do branco (diluente), com zoom de alta aproximação, demonstrando ausência dos analitos.

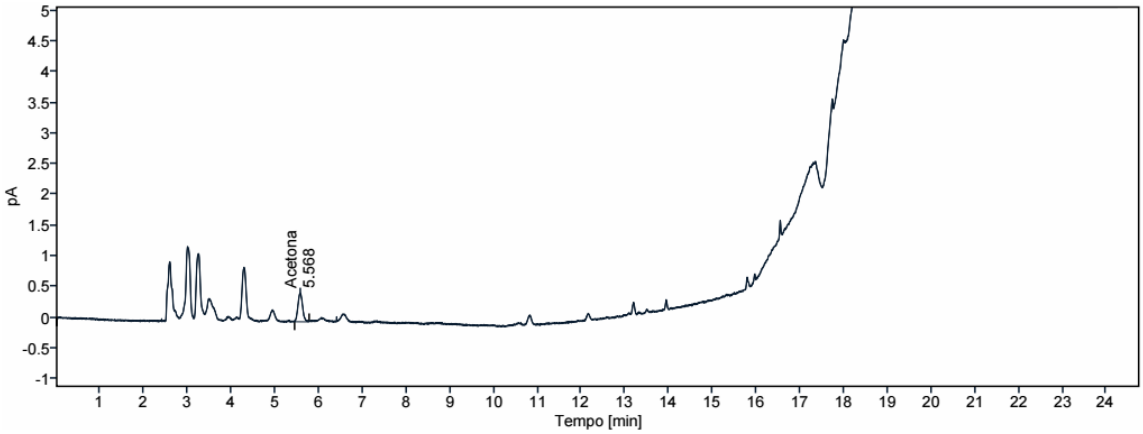


Figura 2 - Cromatograma obtido após injeção da amostra controle (amostra + diluente)

Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 8. Dentre os fatores avaliados nesta etapa de triagem, algumas condições estabelecidas contribuíram de forma sistemática para a não obtenção de respostas nos experimentos 1, 2, 4, 7, 11 e 12. Desta forma, os valores destes experimentos foram reportados como “zero” e considerados na análise crítica dos resultados. Porém, foram suprimidos na apresentação na Tabela 8 para melhor entendimento das demais variáveis que exercem algum efeito nas respostas da matriz do planejamento experimental. . As respostas obtidas e que estão descritas na tabela foram plotadas no software *Minitab* 18 para análise estatística.

Tabela 8 – Resultados obtidos para os 6 experimentos aos quais foi possível obter respostas na matriz de planejamento experimental.

Exp./Res.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19
3	124	127	137	139	86	100	92	96	113	129	118	117	465	57	87	0	17	7	20
5	93	111	122	120	108	112	109	110	104	105	110	101	312	27	32	9	12	5	18
6	98	86	97	107	79	99	80	94	101	105	102	100	431	28	25	10	15,2	7,6	17,7
8	93	111	113	111	99	104	101	102	98	99	104	98	323	27	18	7	11	5	23
9	122	126	128	123	84	101	90	94	114	134	119	123	607	42	54	13	15	8	18
10	99	102	110	112	80	101	82	95	102	104	103	102	225	24	32	10	11,7	5,4	18

Exp: Experimento. Res: Resposta.

5.1.3. Análise de Variância

A análise de variância (ANOVA) usa modelos estatísticos para comparar a variabilidade dado ao tratamento com a variabilidade do erro residual. Partindo desta comparação foi possível avaliar quais foram as variáveis relevantes para cada resposta obtida experimentalmente.

Os p-valores determinaram se os coeficientes foram relevantes ou não. Se o p-valor encontrado foi menor que 0,05 considerou-se que esse coeficiente foi significativamente diferente de 0 e, assim, a resposta foi experimentalmente afetada pela variação do nível desse fator. Do contrário, se o p-valor foi maior que 0,05 significa que a resposta não foi afetada pela variação do nível desse fator e então não foi relevante para a resposta avaliada.

5.1.4. Parâmetros Críticos

Os resultados obtidos para as respostas de R1 a R19 obtiveram grande semelhança sentre si. Desta forma, serão apresentados e discutidos abaixo os resultados obtidos para a Resposta 1 (R1 - Recuperação no LQ Acetona (1%)), que é semelhante ao bloco de resultados obtidos para as respostas R2-R14 e R16-R19. Também serão discutidos os resultados para a Resposta 15 (R15 – S/N no LQ% do Diclorometano). Para estes resultados de R1 e R15 serão apresentados e discutidos as figuras com os Gráficos de Pareto e as figuras com os resultados da Tabela ANOVA. Todos os demais resultados estão disponíveis no Apêndice.

Na análise dos resultados do planejamento fatorial, na Resposta 1 (R1) foi avaliada a recuperação no LQ da acetona (1%). No gráfico dos efeitos principais (Figura 3) nota-se que quanto maior a pressão de preenchimento, maior a recuperação no LQ para a acetona. Observou-se também, por meio do gráfico de Pareto e da tabela ANOVA (Figura 4 e Figura 5) que, o parâmetro significativo foi a pressão de preenchimento (E), estando este fator à direita da linha de significância.

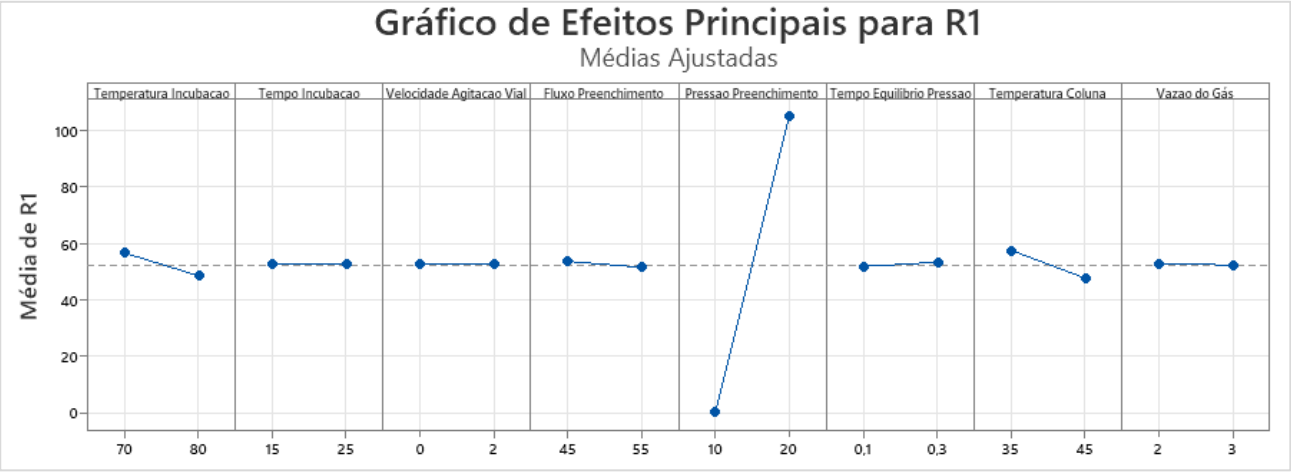


Figura 3 - Gráfico de Efeitos Principais para R1

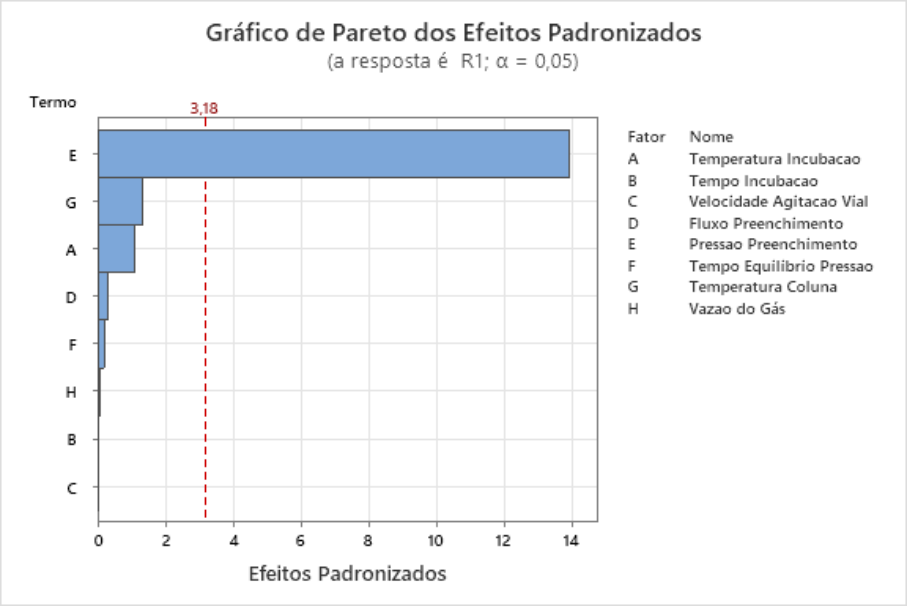


Figura 4 – Gráfico de Pareto para R1

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	33482,0	4185,3	24,57	0,012
Linear	8	33482,0	4185,3	24,57	0,012
Temperatura Incubacao	1	200,1	200,1	1,17	0,358
Tempo Incubacao	1	0,1	0,1	0,00	0,984
Velocidade Agitacao Vial	1	0,1	0,1	0,00	0,984
Fluxo Preenchimento	1	14,1	14,1	0,08	0,792
Pressao Preenchimento	1	32970,1	32970,1	193,59	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	6,7	6,7	0,04	0,855
Temperatura Coluna	1	290,1	290,1	1,70	0,283
Vazao do Gás	1	0,8	0,8	0,00	0,951
Erro	3	510,9	170,3		
Total	11	33992,9			

Figura 5 - Resultado ANOVA para R1

Da mesma forma que R1, a partir do p-valor gerado pela tabela ANOVA, e do gráfico de Pareto para as todas as outras respostas, exceto R15, observa-se que o parâmetro mais significativo também foi a pressão de preenchimento (E). Adicionalmente, nos gráficos de efeitos principais, nota-se que quanto maior a pressão de preenchimento, maior foi cada resposta obtida. As tabelas e gráficos para essas respectivas respostas podem ser encontrados no Apêndice deste trabalho.

Por outro lado, para R15, nota-se por meio do gráfico de efeitos principais (Figura 6) que quanto maior a pressão de preenchimento, maior a relação S/N no LQ para o diclorometano. Observou-se também, por meio do gráfico de Pareto e da tabela ANOVA (Figura 7 e Figura 8) que, embora a pressão de preenchimento tenha sido o fator mais importante dentre todos, nenhum dos fatores se mostrou significativo no intervalo estudado, visto que todos ficaram à esquerda da linha de significância.

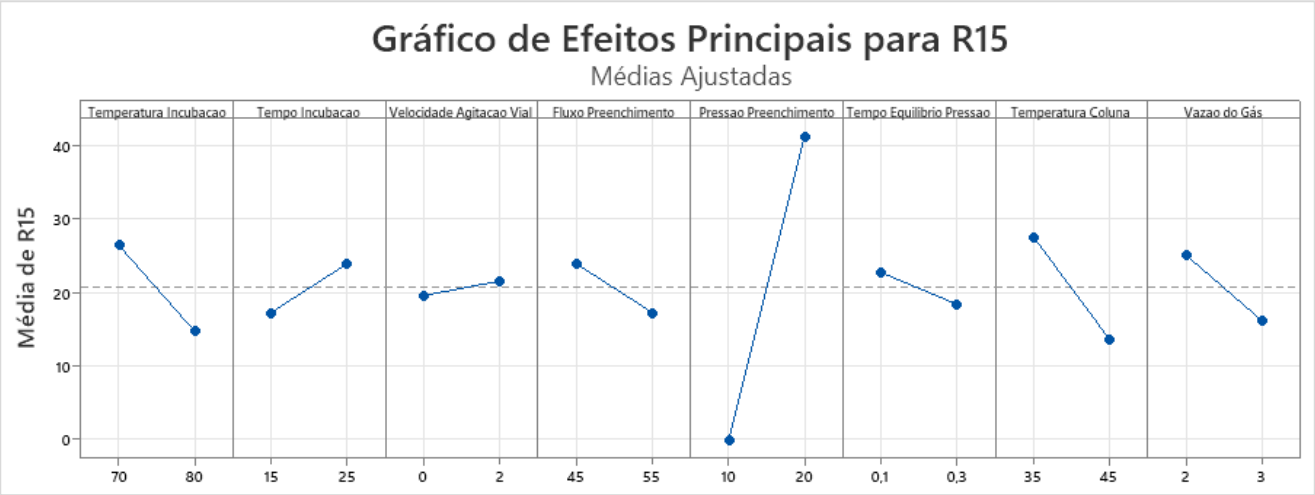


Figura 6 - Gráfico de Efeitos Principais para R15

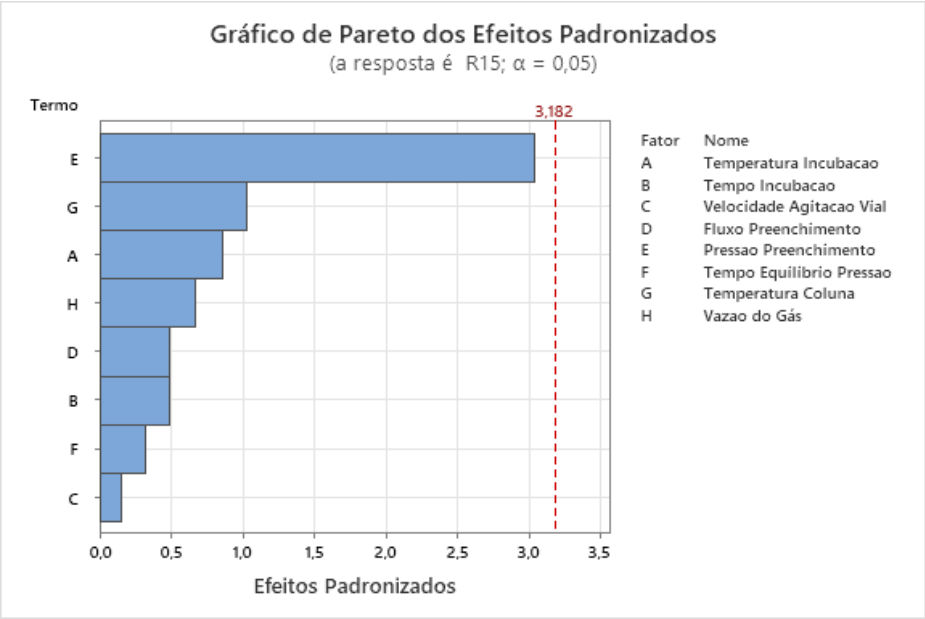


Figura 7 – Gráficos de Pareto para R15

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	6699,67	837,46	1,52	0,400
Linear	8	6699,67	837,46	1,52	0,400
Temperatura Incubacao	1	408,33	408,33	0,74	0,453
Tempo Incubacao	1	133,33	133,33	0,24	0,657
Velocidade Agitacao Vial	1	12,00	12,00	0,02	0,892
Fluxo Preenchimento	1	133,33	133,33	0,24	0,657
Pressao Preenchimento	1	5125,33	5125,33	9,28	0,056
Tempo Equilibrio Pressao	1	56,33	56,33	0,10	0,770
Temperatura Coluna	1	588,00	588,00	1,06	0,378
Vazao do Gás	1	243,00	243,00	0,44	0,555
Erro	3	1657,00	552,33		
Total	11	8356,67			

Figura 8 - Resultado ANOVA para R15

5.1.5. Considerações Finais do Experimento de Triagem

Como evidenciado anteriormente, apenas em seis experimentos as condições experimentais foram satisfatórias para obtenção de repostas, foram eles: experimentos 3, 5, 6, 8, 9 e 10. Com ajuda da Tabela 7 pode-se observar que todos esses experimentos possuíam uma condição de variável em comum: a variável pressão de preenchimento (E) no seu nível superior de 20 psi. Uma vez que se trabalha com CG no modo HS de fluxo para pressão, o HS mantém uma taxa de fluxo especificada de gás de arraste no *vial* até que a pressão dentro do *vial* atinja o *setpoint* da pressão de enchimento. O HS mantém essa pressão durante o tempo de espera também estipulado. Ao final do tempo de espera, o preenchimento do *loop* de amostra é iniciado. Portanto, essa pressão do *vial* deve

ser alta suficiente para transferir toda a amostra do *loop* para o injetor e, subsequentemente, para a coluna cromatográfica [43].

Por esse motivo, o parâmetro pressão de preenchimento (E) mostrou ser relevante para praticamente todas as respostas e, trabalhar em seu nível inferior de 10 psi, aliado às outras combinações de variáveis, não foi suficiente para gerar uma resposta cromatográfica que fosse possível ser estudada.

Apesar de este ser o único parâmetro determinante entre todos avaliados, é importante destacar que o estudo de triagem escolhido não possibilitou avaliar a magnitude da interação entre as variáveis. Nesta triagem realizada por planejamento fatorial saturado foi possível avaliar somente a magnitude dos efeitos individuais de cada variável.

Sendo assim, o parâmetro pressão de preenchimento (E) foi escolhido para ser melhor estudado na etapa de otimização, considerando um novo intervalo de estudo, entre 18 e 32 psi. Considerando que a pressão de preenchimento no *vial* tem relação direta com a temperatura da incubação, decidiu-se por avaliar também esta variável na etapa seguinte de otimização. O parâmetro temperatura de incubação (A) mostrou importância secundária para quatro respostas, porém, na etapa seguinte de otimização será avaliado o comportamento desta variável frente ao novo intervalo de otimização da pressão de preenchimento. Deste modo, a temperatura de incubação foi estudada na etapa seguinte de otimização, considerando intervalo de 68°C a 82°C.

Outros parâmetros que apresentaram efeito secundário foram fixados em seus níveis mais adequados pensando em otimização do tempo de análise. O parâmetro temperatura do forno da coluna (G) mostrou importância secundária para 10 respostas, sendo que, a temperatura de 45°C foi fixada para a próxima etapa do estudo, resultando numa maior temperatura de início e consequentemente um menor tempo total de corrida cromatográfica para separar todos os analitos.

O mesmo critério foi adotado em relação ao tempo de incubação do *vial* para a amostragem HS, sendo fixado o tempo de 15 minutos. Sendo assim, os parâmetros que foram mantidos fixos para a etapa de otimização e seus níveis foram:

- Tempo de incubação: 15 min
- Velocidade de agitação do *vial*: 2 agitações/min com aceleração de cm/s²
- Fluxo de preenchimento: 20 psi
- Tempo de equilíbrio de pressão: 0,2 min
- Temperatura do forno da coluna: 45°C
- Vazão do gás de arraste na coluna: 3,0 mL/min

Por outro lado, os parâmetros escolhidos para a próxima etapa e seus respectivos pontos centrais foram:

- Temperatura de incubação: 75°C
- Pressão de preenchimento: 25 psi

Algumas das condições fixadas são observadas em procedimentos descritos em compêndios oficiais, como nas Farmacopeias Europeia e Americana, por exemplo [46]. E outras também foram estudadas por autores a fim de se estabelecer uma melhor condição e resposta cromatográfica [47-48].

5.2. Delineamentos para Otimização

O objetivo do delineamento composto central foi estudar em mais detalhes as respostas do método para solventes residuais em Hemifumarato de Bisoprolol matéria-prima, com recuperação mais próxima de 100% no LQ dos solventes, e maior relação S/N.

5.2.1. Respostas Avaliadas

As respostas avaliadas no delineamento de otimização encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Respostas avaliadas no delineamento experimental

Respostas	Nome	Tipo de Amostra	Meta
R1	Recuperação no LQ Acetona (1%)	Amostra contaminada no LQ 1%	~100%
R2	Recuperação no LQ Metanol (1%)		
R3	Recuperação no LQ Diclorometano (3%)	Amostra contaminada no LQ 3%	
R4	Recuperação no LQ Clorofórmio (30%)	Amostra contaminada no LQ 30%	
R5	S/N no LQ Clorofórmio	Amostra contaminada no LQ 30%	≥10

As respostas denominadas no delineamento de triagem de R5 a R15, R17 a R19 não foram avaliadas na etapa de otimização, pois foram consideradas de resultado adequado em praticamente todos os experimentos anteriores.

Para essa etapa do estudo foi proposto o delineamento composto central (CCD) com 2 fatores em 5 níveis, com distância máxima (α) de √2 unidades codificadas do ponto central e totalizando 11 ensaios, sendo 4 pontos no cubo, 4 pontos axiais e triplicata no ponto central; que permitiu modelar superfícies de respostas complexas com um número reduzido de experimentos. As variáveis e seus respectivos níveis estudados estão descritas nas Tabelas 10 e 11.

5.2.2. Criação de experimentos

As coordenadas do CCD foram geradas com auxílio do software *Minitab* 18 e são mostrados na Tabela 10 e Tabela 11.

Tabela 10 - Variáveis avaliadas no delineamento experimental de triagem

Variável	Nome	Unidade	Nível Inferior	Nível Superior
A	Pressão de preenchimento	psi	20	30
B	Temperatura de Incubação	ºC	70	80

Tabela 11 - Experimentos

Experim. \ Variável	A	B
1	20	70
2	30	70
3	20	80
4	30	80
5	25	75
6	25	75
7	25	75
8	25	82
9	25	68
10	18	75
11	32	75

5.2.3. Resultados e Discussão

Na literatura, alguns métodos já reportados ao FDA são baseados na implementação do QbD no desenvolvimento de métodos analíticos [4]. Embora os trabalhos encontrados na literatura com projetos de delineamento de experimentos tenham sido aplicados com sucesso para otimizar outros métodos cromatográficos, como cromatografia líquida em fase reversa e cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) [44, 49-50], é interessante observar que, até o momento são poucas as publicações onde autores utilizaram da abordagem AQbD no desenvolvimento de métodos por cromatografia em fase gasosa.

Oliveira (2021) trabalhou no desenvolvimento e validação de um método analítico para o controle de solventes residuais por cromatografia em fase gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina onde usou planejamentos análogos e condições do *headspace* equivalentes aos estudados no presente trabalho [51].

Após a execução dos experimentos delineados na tabela 11, as respostas obtidas para cada experimento, conforme apresentado na Tabela 12, foram plotadas no software *Minitab* 18 para posterior análise crítica e estatística.

Tabela 12 – Resultados obtidos do delineamento composto central para as respostas R1 a R5

Experim. \ Variável	R1	R2	R3	R4	R5
1	91	111	107	95	14
2	88	114	96	118	14
3	90	107	103	92	18
4	101	115	99	103	10
5	98	107	101	96	17
6	91	109	103	99	10
7	92	112	110	94	15
8	99	121	109	109	14
9	76	90	89	100	11
10	82	103	91	115	13
11	78	100	90	105	11

5.2.4. Análise de Variância e Regressão

O ajuste do modelo de regressão múltipla deve ser avaliado baseado nos coeficientes de determinação (R^2, R^2 ajustado e R^2 predição). O coeficiente de determinação (R^2) é a proporção da variância na resposta que é predita pelos fatores, isto é, o quanto da resposta é explicada pelos fatores. Entretanto, em modelos de regressão com diferentes números de termos este coeficiente não se torna uma boa maneira de comparar modelos [52].

O R^2 ajustado é uma versão modificada do R^2 que foi ajustada para o número de termos no modelo de regressão. O valor de R^2 ajustado aumenta se o novo termo acrescentado melhora o modelo de regressão, e diminui se o novo termo não melhora o modelo de regressão. Desta forma o R^2 ajustado permite comparar modelos com diferentes números de termos. Já o R^2 predição indica o quão bem um modelo de regressão prediz respostas para novas observações e é calculado pela remoção sistemática de cada observação do conjunto de dados, estimando a equação de regressão e determinando o quão bem o modelo prediz a observação removida [52-53]. No *Minitab* versão 18, se um valor de qualquer R^2 for negativo, o resultado mostrará 0% [53].

Também se comparou a variabilidade devido à falta de ajuste do modelo de regressão à variabilidade devido ao erro puro aleatório para avaliar o ajuste do modelo de regressão. O modelo de regressão é considerado mal ajustado quando o erro fornecido pela falta de ajuste do modelo de regressão foi significativamente maior que o erro puro aleatório (p-valor menor que 0,05). Por outro lado, o modelo de regressão foi considerado bem ajustado quando o erro devido à falta de ajuste do modelo de regressão foi significativamente menor que o erro puro aleatório (p-valor maior que 0,05).

A análise de regressão avaliada somente pode ser considerada válida se os resíduos apresentarem distribuição normal, homocedasticidade e independência.

A distribuição normal foi avaliada por meio do gráfico de probabilidade normal, no qual os resíduos apresentaram-se distribuídos de forma linear (normal) para todos os modelos ajustados. A homocedasticidade da variância dos resíduos padronizados foi comprovada para todos os modelos através do gráfico de dispersão de resíduos, no qual foi possível observar se os pontos estão aleatoriamente distribuídos em torno do 0, sem nenhum comportamento ou tendência, apresentando indícios de que a variância dos resíduos foi homocedástica. A independência dos resíduos foi observada através dos gráficos de resíduos como função da ordem de aquisição, demonstrando que não houve padrão nos resíduos.

Os resultados da ANOVA para cada uma das respostas avaliadas no experimento de otimização encontram-se nas figuras abaixo.

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
7,18018	62,01%	24,02%	0,00%

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

R1 = -46 - 1,1 Pressao Preenchimento + 3,0 Temperatura Incubacao
- 0,186 Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento
- 0,036 Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao
+ 0,140 Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	420,771	84,154	1,63	0,302
Linear	2	248,517	124,259	2,41	0,185
Pressao Preenchimento	1	0,686	0,686	0,01	0,913
Temperatura Incubacao	1	247,831	247,831	4,81	0,080
Quadrado	2	123,254	61,627	1,20	0,376
Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento	1	121,885	121,885	2,36	0,185
Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao	1	4,532	4,532	0,09	0,779
Interação com 2 Fatores	1	49,000	49,000	0,95	0,374
Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao	1	49,000	49,000	0,95	0,374
Erro	5	257,775	51,555		
Falta de ajuste	3	229,108	76,369	5,33	0,162
Erro puro	2	28,667	14,333	*	*
Total	10	678,545			

Figura 9 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R1

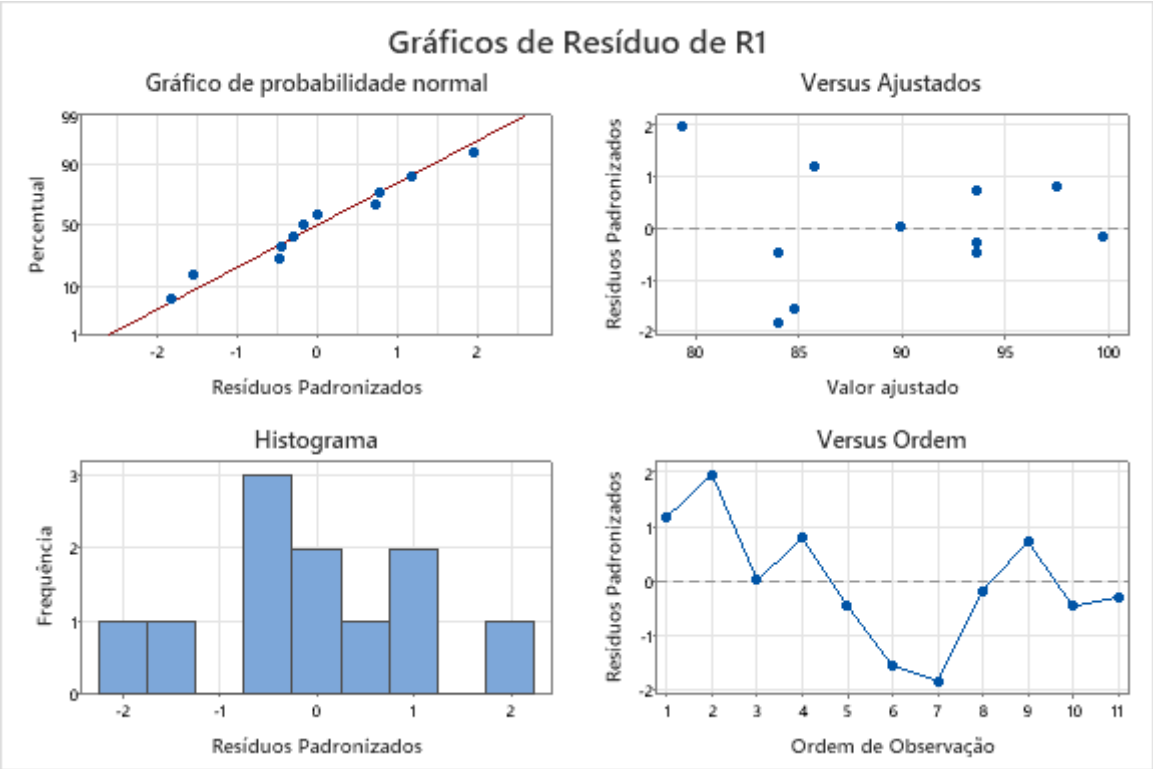


Figura 10 - Avaliação dos Resíduos para R1

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
9,50883	34,94%	0,00%	0,00%

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

R2 = 109 + 0,1 Pressao Preenchimento - 1,1 Temperatura Incubacao
- 0,074 Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento
+ 0,006 Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao
+ 0,050 Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	242,820	48,564	0,54	0,744
Linear	2	214,202	107,101	1,18	0,379
Pressao Preenchimento	1	5,708	5,708	0,06	0,812
Temperatura Incubacao	1	208,495	208,495	2,31	0,189
Quadrado	2	22,367	11,184	0,12	0,886
Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento	1	19,414	19,414	0,21	0,663
Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao	1	0,120	0,120	0,00	0,972
Interação com 2 Fatores	1	6,250	6,250	0,07	0,803
Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao	1	6,250	6,250	0,07	0,803
Erro	5	452,089	90,418		
Falta de ajuste	3	439,423	146,474	23,13	0,042
Erro puro	2	12,667	6,333	*	*
Total	10	694,909			

Figura 11 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R2

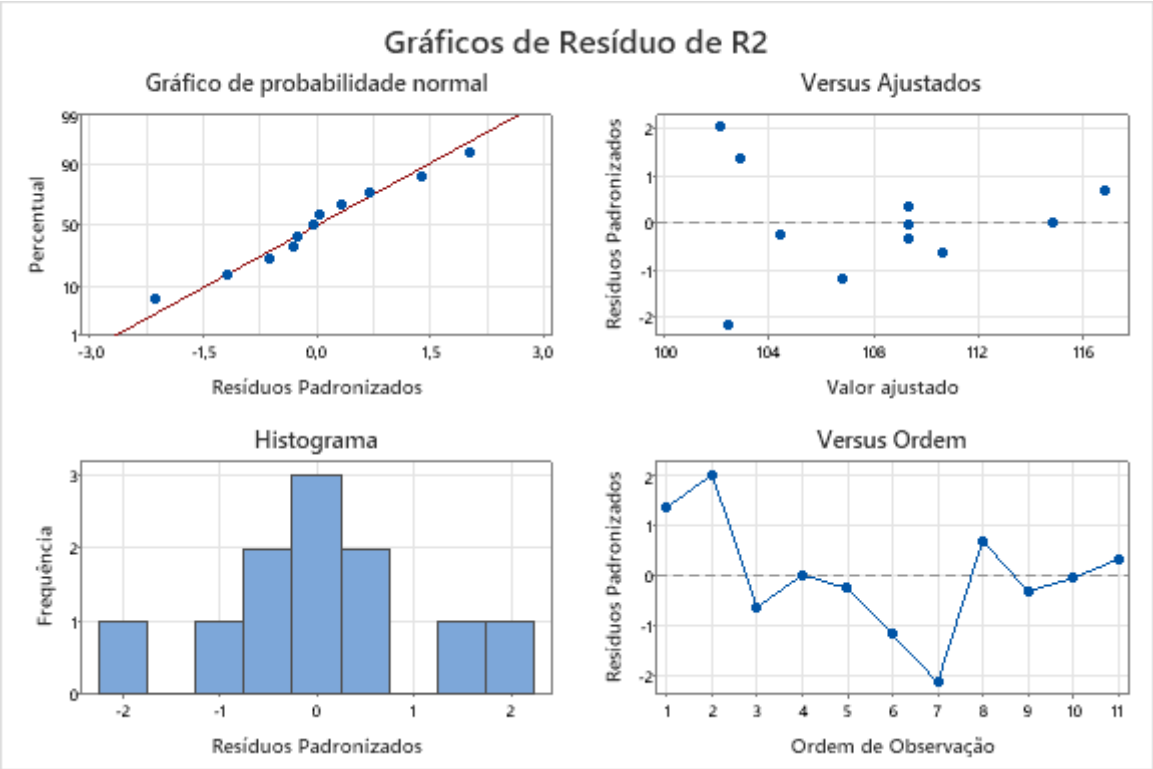


Figura 12 - Avaliação dos Resíduos para R2

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
7,20326	54,30%	8,59%	0,00%

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

R3 = -213 + 5,3 Pressao Preenchimento + 6,2 Temperatura Incubacao
- 0,218 Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento
- 0,048 Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao
+ 0,070 Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	308,202	61,640	1,19	0,427
Linear	2	126,732	63,366	1,22	0,370
Pressao Preenchimento	1	33,678	33,678	0,65	0,457
Temperatura Incubacao	1	93,054	93,054	1,79	0,238
Quadrado	2	169,220	84,610	1,63	0,285
Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento	1	168,245	168,245	3,24	0,132
Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao	1	8,245	8,245	0,16	0,707
Interação com 2 Fatores	1	12,250	12,250	0,24	0,648
Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao	1	12,250	12,250	0,24	0,648
Erro	5	259,434	51,887		
Falta de ajuste	3	214,768	71,589	3,21	0,247
Erro puro	2	44,667	22,333	*	*
Total	10	567,636			

Figura 13 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R3

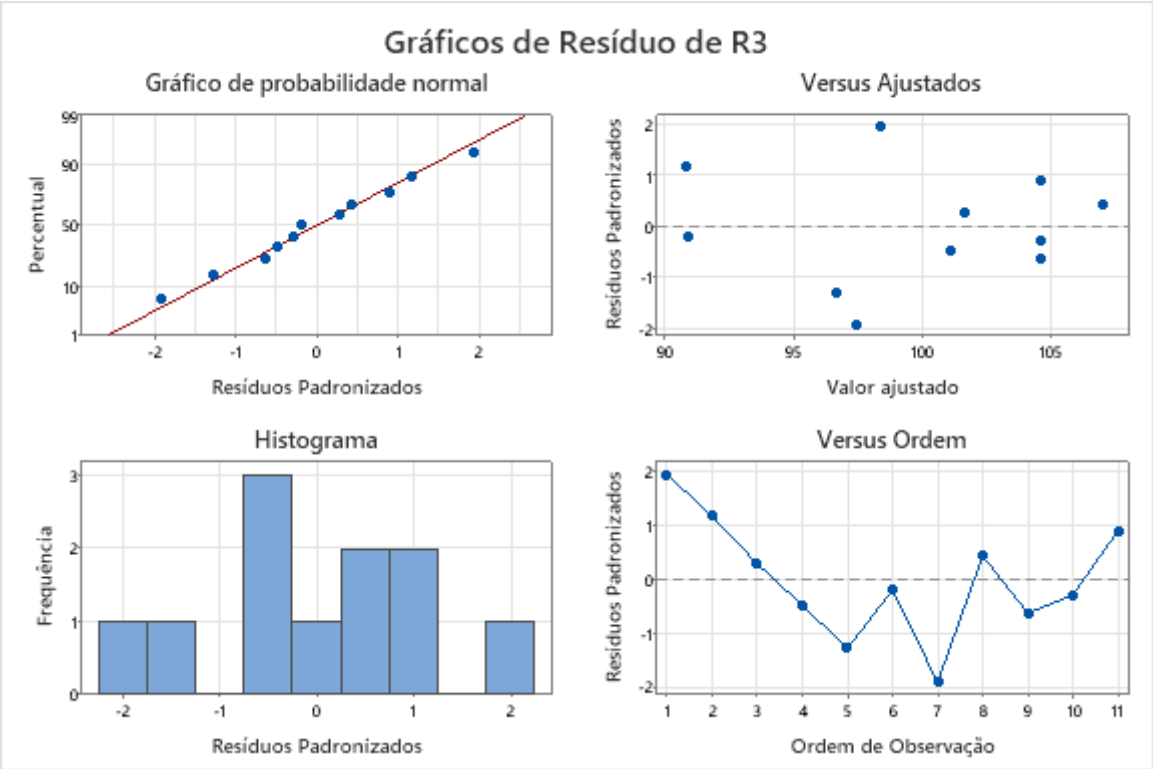


Figura 14 - Avaliação dos Resíduos para R3

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
9,75218	36,13%	0,00%	0,00%

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

R4 = 630 - 1,5 Pressao Preenchimento - 13,8 Temperatura Incubacao
+ 0,221 Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento
+ 0,111 Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao
- 0,120 Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	269,020	53,804	0,57	0,726
Linear	2	52,766	26,383	0,28	0,769
Pressao Preenchimento	1	49,292	49,292	0,52	0,504
Temperatura Incubacao	1	3,474	3,474	0,04	0,856
Quadrado	2	180,254	90,127	0,95	0,448
Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento	1	172,120	172,120	1,81	0,236
Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao	1	43,355	43,355	0,46	0,530
Interação com 2 Fatores	1	36,000	36,000	0,38	0,565
Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao	1	36,000	36,000	0,38	0,565
Erro	5	475,525	95,105		
Falta de ajuste	3	462,859	154,286	24,36	0,040
Erro puro	2	12,667	6,333	*	*
Total	10	744,545			

Figura 15 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R4

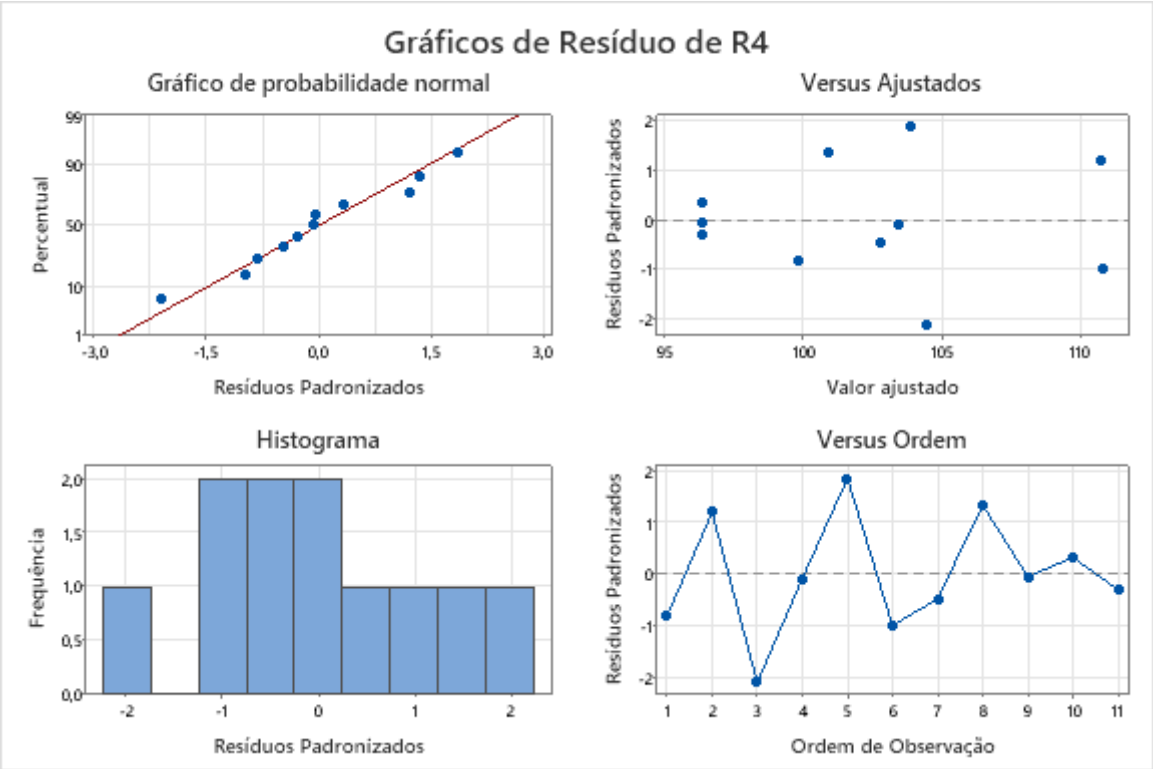


Figura 16 - Avaliação dos Resíduos para R4

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
2,74657	48,01%	0,00%	0,00%

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

R5 = -222 + 6,85 Pressao Preenchimento + 3,98 Temperatura Incubacao
- 0,0225 Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento
- 0,0125 Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao
- 0,0800 Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	34,8273	6,9655	0,92	0,534
Linear	2	16,9069	8,4534	1,12	0,396
Pressao Preenchimento	1	14,6569	14,6569	1,94	0,222
Temperatura Incubacao	1	2,2500	2,2500	0,30	0,608
Quadrado	2	1,9205	0,9602	0,13	0,883
Pressao Preenchimento*Pressao Preenchimento	1	1,7868	1,7868	0,24	0,647
Temperatura Incubacao*Temperatura Incubacao	1	0,5515	0,5515	0,07	0,798
Interação com 2 Fatores	1	16,0000	16,0000	2,12	0,205
Pressao Preenchimento*Temperatura Incubacao	1	16,0000	16,0000	2,12	0,205
Erro	5	37,7181	7,5436		
Falta de ajuste	3	11,7181	3,9060	0,30	0,827
Erro puro	2	26,0000	13,0000	*	*
Total	10	72,5455			

Figura 17 - Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R5

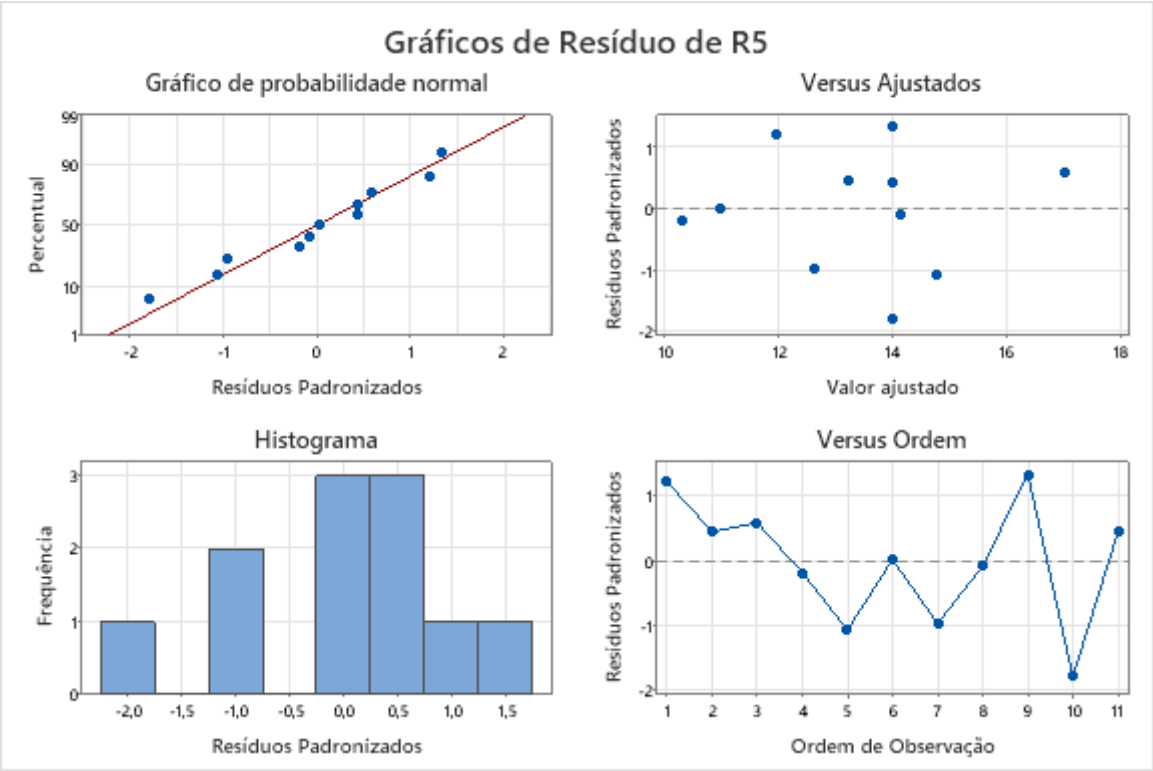


Figura 18 - Avaliação dos Resíduos para R5

Considerando que os modelos empíricos são limitados aos intervalos e às condições experimentais estudadas e que os valores de R para regressão apresentaram baixo percentual de explicação para a regressão e falta de ajuste, não foram plotadas as respectivas superfícies de resposta. Tampouco foram feitas interpolações e extrapolações para as condições de pressão e temperatura estudadas com este modelo.

Deste modo, embora os resultados obtidos não pudessem ser ajustados a um modelo matemático quadrático a fim de se obter uma superfície de resposta com a melhor condição experimental em seu ponto ótimo, os gráficos mostraram uma tendência em direção à obtenção de melhores resultados quando a pressão de preenchimento era trabalhada com 20 psi e temperaturas de incubação trabalhadas nas faixas de intermediária a altas, conforme apontado no experimento de triagem. Sendo assim, as condições analíticas fixadas para o método de solventes residuais foram:

- Pressão de preenchimento: 21 psi
- Temperatura de incubação: 76 °C

Com estas condições fixas, abaixo são apresentados todos os parâmetros cromatográficos otimizados e, na sequencia, os resultados dos ensaios de robustez e validação.

5.3.1. Método Analítico Otimizado

5.3.1.1. Solventes Residuais em Hemifumarato de Bisoprolol Matéria-Prima

Diluente: DMSO

Substâncias Químicas de Referência Caracterizadas (SQC): Acetona, Metanol, Diclorometano e Clorofórmio.

Preparo da Solução Padrão Estoque Solventes:

Transferir 300 mg do padrão de metanol, 500 mg do padrão de acetona e 60 mg do padrão de diclorometano para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizar.

Preparo da Solução Padrão Estoque Clorofórmio:

Pesar 60,0 mg do padrão de clorofórmio para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizar.

Preparo da Solução Padrão:

Transferir 5,0 mL da solução padrão estoque solventes e 0,5 mL da solução padrão estoque clorofórmio para balão volumétrico de 50 mL, completar o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizar. Pipetar 5,0 mL da solução para *vial* de *headspace* de 20 mL, tampar e homogeneizar.

Solução Amostra:

Pesar 500,0 mg da amostra para *vial* de *headspace* de 20 mL. Adicionar 5,0 mL de diluente, tampar e homogeneizar.

Condições Cromatográficas:

Coluna: DB-WAX (30m x 0,53 mm x 1,0 µm)

Gás de arraste: Nitrogênio

Temperatura do injetor: 200 °C

Razão de separação (*split*): 5:1

Fluxo: 3,0 mL/min

Temperatura do detector (FID): 250 °C

Fluxo do ar sintético: 300 mL/min

Fluxo do hidrogênio: 40 mL/min

Fluxo de complementação (*Makeup* - nitrogênio): 27,5 mL/min

Rampa de aquecimento (forno):

Tabela 13 - Programação da rampa de aquecimento do forno

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Permanência (min)	Total (min)
---	40	10	10
20	220	5	24

Parâmetros operacionais do amostrador *headspace*:

Tempo de equilíbrio (incubação do *vial*): 15 min

Duração da injeção: 1,0 min

Ciclo do CG: 25 min

Agitação do *vial*: Nível 2

Fluxo de preenchimento: 45 mL/min

Pressão de preenchimento: 21 psi

Tempo de pressurização: 0,2 min

Taxa de rampa do loop: 20 psi/min

Pressão final do loop: 10 psi

Equilíbrio do loop: 0,1 min

Temperatura de incubação: 76 ºC

Temperatura do *vial*: 85 °C

Temperatura da linha de transferência: 95 °C

Volume de injeção: 1,0 mL

6. ROBUSTEZ

Na avaliação da robustez, um delineamento Plackett-Burman foi novamente utilizado para estudar o considerável número de variáveis em um número reduzido de experimentos.

Além dos fatores avaliados na etapa de otimização, outras variáveis habitualmente analisados nesse parâmetro foram incluídos. Todos os fatores avaliados estão dispostos na tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros avaliados na robustez

Parâmetro	Nível Inferior	Nível Superior
Pressão de preenchimento (psi)	20	21
Temperatura de incubação (ºC)	75	77
Temperatura da coluna (ºC)	40	50
Temperatura da rampa de programação (ºC)	19	21
Temperatura do injetor (ºC)	190	210
Vazão do gás de arraste (mL/min)	2,5	3,5
Coluna	1	2

6.1. Criação dos experimentos

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento Plackett-Burman com 7 fatores e 2 níveis, conforme tabela 15.

Tabela 15 - Delineamento experimental utilizado na robustez

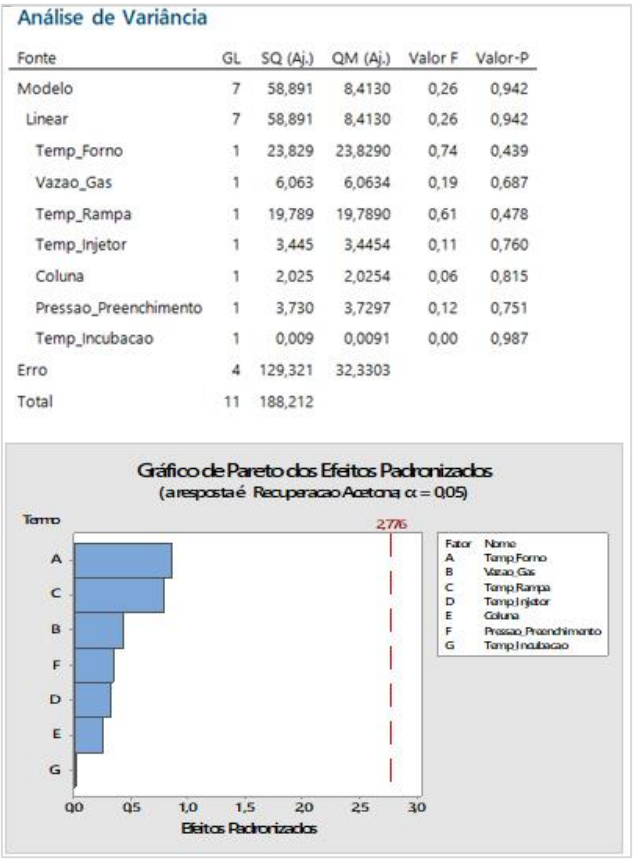
Exp./Variável	Temp. Forno	Vazao Gas	Temp Rampa	Temp Injetor	Coluna	Pressao Preenchimento	Temp Incubacao
1	50	3,5	19	210	2	20	77
2	40	3,5	21	190	2	20	75
3	50	2,5	21	190	1	20	77
4	50	3,5	21	190	2	21	75
5	40	3,5	21	210	1	21	77
6	40	2,5	19	210	2	21	75
7	40	2,5	19	190	1	20	75
8	50	2,5	21	210	1	21	75
9	40	2,5	21	210	2	20	77
10	50	3,5	19	210	1	20	75
11	40	3,5	19	190	1	21	77
12	50	2,5	19	190	2	21	77

6.2. Resultados e Discussão

A recuperação da amostra foi avaliada frente a uma amostra controle preparada conforme o método definido no item 5.3.1.1. A confirmação de que pequenas alterações no nível de cada fator testado não impactam e não são estatisticamente relevantes para causar mudanças na resposta, foi realizada pelo software Minitab 18.

Tabela 16 - Resultados de recuperação para a robustez

Experimento	Recuperação Acetona (%)	Recuperação Metanol (%)	Recuperação Diclorometano (%)	Recuperação Clorofórmio (%)
Controle	100	100	100	100
1	99	99	100	107
2	100	103	101	103
3	97	107	99	103
4	100	100	101	100
5	96	99	95	94
6	98	98	99	101
7	96	90	93	92
8	99	98	99	96
9	97	98	100	103
10	88	91	89	86
11	102	100	101	97
12	89	96	95	101



Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	58,891	8,4130	0,26	0,942
Linear	7	58,891	8,4130	0,26	0,942
Temp_Forno	1	23,829	23,8290	0,74	0,439
Vazao_Gas	1	6,063	6,0634	0,19	0,687
Temp_Rampa	1	19,789	19,7890	0,61	0,478
Temp_Injetor	1	3,445	3,4454	0,11	0,760
Coluna	1	2,025	2,0254	0,06	0,815
Pressao_Preenchimento	1	3,730	3,7297	0,12	0,751
Temp_Incubacao	1	0,009	0,0091	0,00	0,987
Erro	4	129,321	32,3303		
Total	11	188,212			

Figura 19 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação da acetona

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	131,410	18,7729	0,82	0,616
Linear	7	131,410	18,7729	0,82	0,616
Temp_Forno	1	0,725	0,7252	0,03	0,867
Vazao_Gas	1	1,802	1,8019	0,08	0,793
Temp_Rampa	1	73,359	73,3591	3,21	0,148
Temp_Injetor	1	16,263	16,2634	0,71	0,446
Coluna	1	7,285	7,2852	0,32	0,602
Pressao_Preenchimento	1	1,159	1,1594	0,05	0,833
Temp_Incubacao	1	30,816	30,8161	1,35	0,310
Erro	4	91,405	22,8512		
Total	11	222,815			

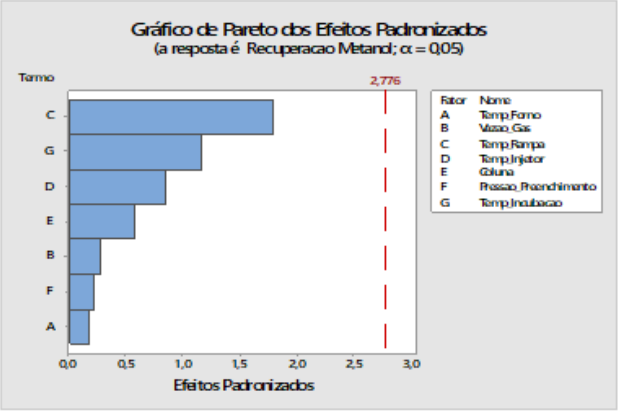


Figura 20 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do metanol

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	76,088	10,8697	0,55	0,770
Linear	7	76,088	10,8697	0,55	0,770
Temp_Forno	1	3,707	3,7074	0,19	0,687
Vazao_Gas	1	0,715	0,7154	0,04	0,858
Temp_Rampa	1	22,386	22,3860	1,13	0,347
Temp_Injetor	1	4,189	4,1890	0,21	0,669
Coluna	1	36,855	36,8551	1,87	0,244
Pressao_Preenchimento	1	3,510	3,5100	0,18	0,695
Temp_Incubacao	1	4,725	4,7251	0,24	0,650
Erro	4	79,004	19,7510		
Total	11	155,092			

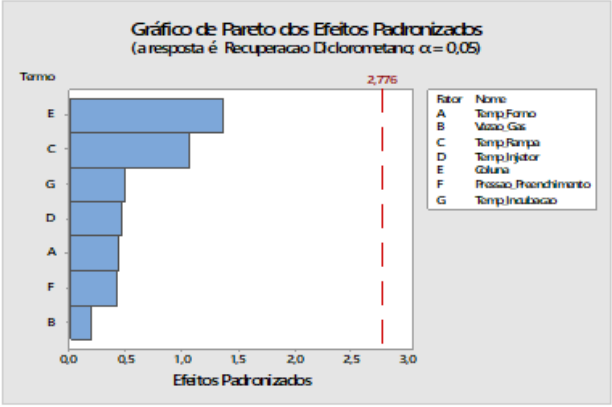


Figura 21 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do diclorometano

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	280,148	40,021	1,81	0,296
Linear	7	280,148	40,021	1,81	0,296
Temp_Forno	1	0,504	0,504	0,02	0,887
Vazao_Gas	1	6,279	6,279	0,28	0,623
Temp_Rampa	1	18,204	18,204	0,82	0,416
Temp_Injetor	1	5,713	5,713	0,26	0,638
Coluna	1	179,878	179,878	8,12	0,046
Pressao_Preenchimento	1	2,168	2,168	0,10	0,770
Temp_Incubacao	1	67,403	67,403	3,04	0,156
Erro	4	88,594	22,149		
Total	11	368,742			

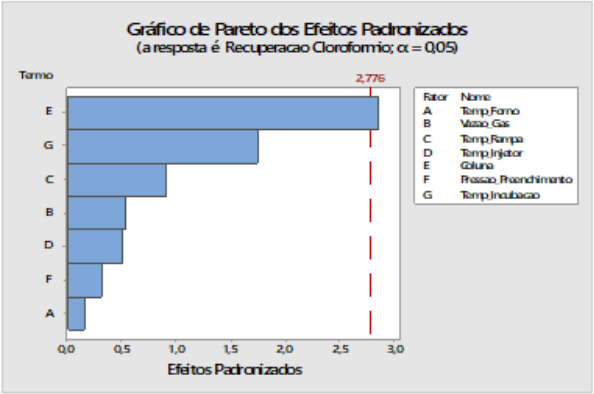


Figura 22 - Resultados da análise de variância e gráfico de Pareto para a recuperação do clorofórmio

Em todos os experimentos as recuperações estiveram dentro do critério de especificação adotado em relação a amostra controle (80 a 120%). As análises estatísticas demonstram que nenhuma variável testada apresentou efeito sobre o resultado de recuperação dos solventes acetona, metanol e diclorometano, todos obtendo p-valor > 0,05.

Para a recuperação do clorofórmio, apenas a variável coluna apresentou um efeito na resposta, resultando em um p-valor de 0,046. Essa pequena significância provavelmente se deu devido aos resultados abaixo de 100%, todos provenientes da coluna 01, mas que não ficaram fora da especificação e, portanto, podem ser vistos como pontuais para esse analito na coluna utilizada.

Sendo assim, pode-se afirmar com 95% de confiança que o método é robusto dentro da região avaliada nesse experimento.

7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico de solventes residuais foi submetido aos testes de validação analítica conforme solicita a Anvisa, para comprovar que é adequado ao uso. Para ser considerado validado, os seguintes requisitos devem ser atendidos pelo método [42]:

1. Seletividade: o método deve ser capaz de quantificar o analito de interesse, de forma inequívoca, na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra.
2. Linearidade: o método deve ser capaz de obter respostas diretamente proporcionais à concentração do analito.
3. Precisão: o método deve atender ao critério de desvio padrão relativo conforme o preconizado.
4. Exatidão: o método deve apresentar recuperação em conformidade com o preconizado.
5. Robustez: o método deve apresentar recuperação em conformidade com o preconizado. Esse parâmetro foi avaliado no item 6. Robustez.

7.1. Resultados

Para avaliação da seletividade, a eluição dos analitos foi avaliada nas seguintes soluções: branco, padrão, amostra controle, amostra contaminada com os solventes, padrão isolado de acetona, padrão isolado de metanol, padrão isolado de diclorometano, padrão isolado de clorofórmio, e ainda uma leitura do gás de arraste feita pelo equipamento.

Na figura 34 é apresentado um cromatograma da solução amostra contaminada composta por todos os analitos controlados, e na tabela 17 são apresentados os tempos de retenção e resolução de cada analito nesta solução.

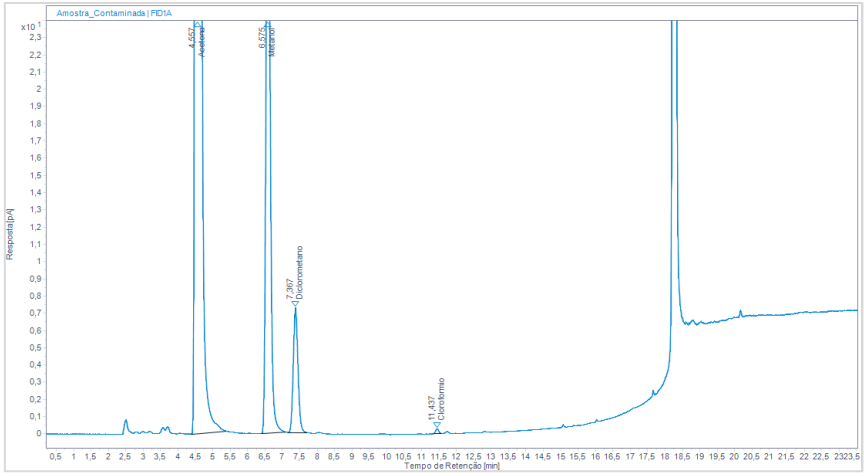


Figura 23 - Cromatograma da solução amostra contaminada com os analitos de interesse

Tabela 17 - Tempos de retenção e resolução dos analitos de interesse na solução amostra contaminada

Pico de Interesse	Tempo de retenção (min)	Resolução (>1,5)
Acetona	4,56	Na
Metanol	6,57	10,2
Diclorometano	7,37	3,4
Clorofórmio	11,44	19,8

Com o cromatograma e resultados tabelados mostrados acima, é possível verificar que todos analitos obtiveram uma separação com resolução maior ou igual a 1,5, conforme solicita as boas práticas de cromatografia. Comparando este cromatograma com os cromatogramas individuais das soluções das substâncias puras, a seletividade do método foi comprovada, uma vez que não houve coeluição de nenhum dos solventes entre si, e nem com impurezas do diluente, e o critério de especificação empregado foi atendido.

Para avaliação da linearidade, as respostas dos solventes foram avaliadas dentro de uma faixa de trabalho construída a partir de 5 concentrações diferentes com 3 réplicas autênticas de cada nível. A avaliação estatística desse parâmetro foi realizada pelo *software Minitab 18*. Nas tabelas 18 a 20 são mostrados o resultado final obtido para cada solvente analisado.

Tabela 18 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente acetona

Teste	Critério de Aceitação	Resultado
Linearidade	Coeficiente de correlação (R) > 0,990	0,999
	Coeficiente de determinação (R^2) > 0,90	0,9997
	F > 4,67	47237
	Dependência dos resíduos	Resíduos Independentes
	Homocedasticidade dos resíduos	Resíduos Homocedásticos
	Normalidade dos resíduos	Distribuição normal
	Ausência de valores extremos na resposta (*outliers*)	Não foi detectado pontos extremos
Equação da regressão	y= 1257x + 1,141	
Faixa de trabalho	24,95 µg/mL (solução 1,0%) a 2993,47 µg/mL (solução 120,0%), o que corresponde a 49,89 µg/g (Solução 1,0%) a 5986,94 µg/g (solução 120,0%).	

Tabela 19 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente metanol

Teste	Critério de Aceitação	Resultado
Linearidade	Coeficiente de correlação (R) > 0,990	0,997
	Coeficiente de determinação (R^2) > 0,90	0,997
	F > 4,67	42468
	Dependência dos resíduos	Resíduos Independentes
	Homocedasticidade dos resíduos	Resíduos Homocedásticos
	Normalidade dos resíduos	Distribuição normal
	Ausência de valores extremos na resposta (*outliers*)	Não foi detectado pontos extremos
Equação da regressão	y = 192,493x + 0,1912	
Faixa de trabalho	14,98 µg/mL (solução 1,0%) a 1797,54 µg/mL (solução 120,0%), o que corresponde a 29,96 µg/g (Solução 1,0%) a 3595,08 µg/g (solução 120,0%).	

Tabela 20 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente diclorometano

Teste	Critério de Aceitação	Resultado
Linearidade	Coeficiente de correlação (R) > 0,990	0,999
	Coeficiente de determinação (R^2) > 0,90	0,9991
	F > 4,67	14217
	Dependência dos resíduos	Resíduos Independentes
	Homocedasticidade dos resíduos	Resíduos Homocedásticos
	Normalidade dos resíduos	Distribuição normal
	Ausência de valores extremos na resposta (*outliers*)	Não foi detectado pontos extremos
Equação da regressão	y = 209,89x + 1,774	
Faixa de trabalho	8,95 µg/mL (solução 3,0%) a 357,89 µg/mL (solução 120,0%), o que corresponde a 17,89 µg/g (Solução 3,0%) a 715,78 µg/g (solução 120,0%).	

Tabela 21 - Resultados da avaliação da linearidade para o solvente clorofórmio

Teste	Critério de Aceitação	Resultado
Linearidade	Coeficiente de correlação (R) > 0,990	0,992
	Coeficiente de determinação (R^2) > 0,90	0,9966
	F > 4,67	3767
	Dispersão dos resíduos	Resíduos Independentes
	Homocedasticidade dos resíduos	Resíduos Homocedásticos
	Normalidade dos resíduos	Distribuição normal
	Ausência de valores extremos na resposta (*outliers*)	Não foi detectado pontos extremos
Equação da regressão	y = 67,21x + 0,00336	
Faixa de trabalho	8,58 µg/mL (solução 30,0%) a 34,33 µg/mL (solução 120,0%), o que corresponde a 17,17 µg/g (Solução 30,0%) a 68,66 µg/g (solução 120,0%).	

A partir dos resultados das análises estatísticas, o cumprimento dos critérios estabelecidos para a linearidade foi demonstrado. Considera-se então, o método linear, homocedástico, normal, independente e sem valores extremos para a análise dos solventes acetona, metanol, diclorometano e clorofórmio.

Para avaliação da precisão e exatidão do método, foi considerado a quantificação dos pontos baixo (LQ de cada solvente), médio (100% da especificação) e alto (120% da especificação), conforme dita a legislação [42]. Estes ensaios ocorreram em dois blocos, sendo o primeiro chamado de repetibilidade, que mediu a concordância dos valores a partir de uma triplicada de cada ponto no mesmo dia (intraday); e o segundo bloco chamado de precisão intermediária, onde novamente foram avaliados os pontos em triplicata, porém em um segundo dia de análise feito por um segundo analista.

Para estes preparos, foram consideradas réplicas autênticas de cada nível avaliado, pois a confirmação deste resultado remete a uma etapa importante na qualidade do método analítico proposto e sua capacidade de repetibilidade em uma rotina de transferência e liberação de lotes industriais.

Os resultados de DPR e recuperações encontrados para cada solvente analisado são mostrados nas tabelas 22 a 25. Nas mesmas tabelas é demonstrado o valor da razão sinal ruído para o nível baixo de cada solvente.

Tabela 22 - Resultados de precisão e exatidão para acetona

Teste	Critério de Aceitação	Resultado		
			Repetibilidade	**Intermediária**
Precisão	DPR ≥ 20%	**Baixo:**	0,5	0,9
		Médio:	1,3	0,8
		Alto:	1,0	1,2
Exatidão	Recuperação entre 80% e 120%	Mínimo: 97% Máximo: 110% Média: 102%		
Média Sinal/ruído ponto baixo	10:1	279		

Tabela 23 - Resultados de precisão e exatidão para metanol

Teste	Critério de Aceitação	Resultado		
			Repetibilidade	**Intermediária**
Precisão	DPR ≥ 20%	**Baixo:**	2,3	4,0
		Médio:	3,4	0,5
		Alto:	2,8	1,1
Exatidão	Recuperação entre 80% e 120%	Mínimo: 94% Máximo: 106% Média: 100%		
Média Sinal/ruído ponto baixo	10:1	35		

Tabela 24 - Resultados de precisão e exatidão para diclorometano

Teste	Critério de Aceitação	Resultado		
			Repetibilidade	**Intermediária**
Precisão	DPR ≥ 20%	**Baixo:**	2,4	3,2
		Médio:	1,6	0,4
		Alto:	1,2	0,7
Exatidão	Recuperação entre 80% e 120%	Mínimo: 98% Máximo: 116% Média: 104%		
Média Sinal/ruído ponto baixo	10:1	64		

Tabela 25 - Resultados de precisão e exatidão para clorofórmio

Teste	Critério de Aceitação	Resultado		
			Repetibilidade	**Intermediária**
Precisão	DPR ≥ 20%	**Baixo:**	1,9	9,8
		Médio:	4,2	1,3
		Alto:	3,9	2,4

Exatidão	Recuperação entre 80% e 120%	Mínimo: 93% Máximo: 103% Média: 96%
Média Sinal/ruído ponto baixo	10:1	22

Os resultados obtidos demonstram o atendimento ao DPR (%) e recuperações dentro da especificação para cada nível estudado, alcançando valores médios bem próximos ao 100% e assim comprovando mais uma vez a eficiência do método analítico.

Todos os resultados e avaliações demonstraram o atendimento do método a finalidade que se propõe, e garantindo a identificação e quantificação dos analitos acetona, metanol, diclorometano e clorofórmio durante uma liberação da matéria-prima Hemifumarato de Bisoprolol.

8. CONCLUSÕES

O método cromatográfico desenvolvido teve seus principais parâmetros avaliados pelas ferramentas quimiométricas do AQbD, a partir das quais as condições ideais para a realização das análises foram determinadas. O delineamento experimental de triagem permitiu a identificação dos fatores mais críticos e assim construir as condições instrumentais com características de qualidade esperada. Os resultados obtidos na etapa de otimização permitiram direcionar os fatores de pressão de preenchimento e temperatura de incubação nas melhores condições de operação do método analítico. Por fim, o método de solventes residuais foi considerado validado, atendendo aos critérios estabelecidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Destaque para este último critério de validação, que também foi avaliado por meio de planejamento multivariado com número reduzido de experimentos.

Diante disso, concluímos que os conceitos e ferramentas da abordagem AQbD permitiram obter um melhor entendimento das variáveis que compõem o sistema, um conhecimento integral dos dados matemáticos e estatísticos para o desenvolvimento e otimização racional do método cromatográfico para solventes residuais para a matéria-prima de Hemifumarato de Bisoprolol. Por fim, o trabalho concedeu uma parceria da universidade pública com a instituição privada a fim de unir conhecimentos teóricos e práticos na construção da produção técnico-científica de qualidade.

9. REFERÊNCIAS

[1] SERENO, V. M. B., SILVA, A. S., DA SILVA, G. C. Perfil epidemiológico das intoxicações por medicamentos no Brasil entre os anos de 2013 a 2017. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, pp.33892-33903, 2020.

[2] FDA. **Food & Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research: Medication Guides**, 2006.

[3] VOGT, F. G., KORD, A. S. Development of quality-by-design analytical methods. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 3, pp.797-812, 2011.

[4] PERAMAN, R., BHADRAYA, K., PADMANABHA REDDY, Y. Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, 2015.

[5] BERNARDONI, F., HALSEY, H. M., HARTMAN, R., NOWAK, T., REGALADO, E. L. Generic gas chromatography flame ionization detection method using hydrogen as the carrier gas for the analysis of solvents in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 165, pp.366-373, 2019.

[6] BRASIL. RDC 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2019.

[7] BRUNNER, D. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S). **The Quality Assurance Journal: The Quality Assurance Journal for Pharmaceutical, Health and Environmental Professionals**, v. 8, n. 3, pp. 207-211, 2004.

[8] YU, L. X., AMIDON, G., KHAN, M. A., HOAG, S. W., POLLI J., RAJU, G. K, WOODCOCK, J. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. **The AAPS Journal**. v.16, pp. 771-783, 2014.

[9] BEZERRA, M. P., RODRIGUES, L. N. C. Quality by Design (QbD) como ferramenta para otimização dos processos farmacêuticos. **Infarma Ciências farmacêuticas**.v. 29, pp. 5-12, 2017.

[10] ORLANDINI, S., PINZAUTI, S., FURLANETTO, S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. **Analytical and bioanalytical chemistry,** v. 405, n. 2, pp.443-450, 2013.

[11] FUKUDA, I. M., PINTO, C. F. F., MOREIRA, C. D. S., SAVIANO, A. M. LOURENÇO, F. R. Design of experiments (DoE) applied to pharmaceutical and analytical quality by design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, São Paulo, 2018.

[12] JAIN, S. Quality by design (QbD): a comprehensive understanding of implementation and challenges in pharmaceuticals development. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. V. 6, pp. 29-35, 2014.

[13] JACKSON, P., BORMAN, P., CAMPA, C., CHATFIELD, M., GODFREY, M., HAMILTON, P., HOYER, W., NORELLI, F., ORR, R., SCHOFIELD, T. Using the analytical target profile to drive the analytical method lifecycle. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 4, pp.2577-2585, 2019.

[14] RAMAN, N. V. V. S. S., MALLU, U. R., BAPATU, H. R. Analytical quality by design approach to test method development and validation in drug substance manufacturing. **Journal of chemistry**, v. 2015, 2015.

[15] TOME, T., ŽIGART, N., ČASAR, Z., OBREZA, A. Development and optimization of liquid chromatography analytical methods by using AQbD principles: Overview and recent advances. **Organic Process Research & Development**, v. 23, n. 9, pp.1784-1802, 2019.

[16] SHIVHARE, M., MCCREATH, G. Practical considerations for DoE implementation in quality by design. **BioProcess Int**, v. 8, n. 6, pp.22-30, 2010.

[17] PERES, D. D. A., ARIEDE, M. B., CANDIDO, T. M., DE ALMEIDA, T. S., LOURENCO, F. R., CONSIGLIERI, V. O., KANEKO, T. M., VELASCO, M. V. R., BABY, A.R. Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens**. Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 2, pp.246-256, 2017.
[18] ISLAM, M. N., PRAMANIK, A. Comparison of design of experiments via traditional and Taguchi method. **Journal of Advanced Manufacturing Systems**, v. 15, n. 03, pp.151-160, 2016.
[19] POLITIS, N. S., COLOMBO, P., COLOMBO, G., REKKAS, M. D. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 6, pp: 889-901, 2017.
[20] ATIL, H., UNVER, Y. A different approach of experimental design: Taguchi method. **Pakistan journal of biological sciences**, v. 3, n. 9, pp: 1538-40, 2000.
[21] KARNA, S. K, SAHAI, R. An overview on Taguchi method. **International journal of engineering and mathematical sciences**, v. 1, n 1, pp: 1-7, 2012.
[22] VANAJA, K., SHOBHA RANI, R. H. Design of experiments: concept and applications of Plackett Burman design. **Clinical research and regulatory affairs**, v. 24, n.1, pp: 1-23, 2007.
[23] BEZERRA, M. A., SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L.S., ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, pp.965-977, 2008.
[24] BHUTANI, H., KURMI, M., SINGH, S., BEG, S., SINGH, B. Quality by design (QbD) in analytical sciences: an overview. **Quality Assurance**, v. 3, pp.39-45, 2004.
[25] SANGSHETTI, J.N., DESHPANDE, M., ZAHEER, Z., SHINDE, D.B., AROTE, R. Quality by design approach: Regulatory need. **Arabian Journal of Chemistry**,v. 10, pp.S3412-S3425, 2017.
[26] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Impurities: Guideline for Residual Solvents (Maintenance)**, 2002.
[27] USP. The United States Pharmacopeia, 43, **United States Pharmacopeial Convention Inc. Rockville**, 2022.
[28] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Impurities: Guideline for residual solvents. ICH harmonised tripartite guideline**, 1997.
[29] URAKAMI, K., HIGASHI, A., UMEMOTO, K., GODO, M. Matrix media selection for the determination of residual solvents in pharmaceuticals by static *headspace* gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. *1057*, n. 1-2, pp.203-210, 2004.
[30] PANDEY, S., PANDEY, P., KUMAR, R., SINGH, N. P. Residual solvent determination by head space gas chromatography with flame ionization detector in omeprazole API. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 47, pp.379-384, 2011.
[31] HOLM, T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1-2, pp.221-227, 1999.
[32] BAI, L., CARLTON Jr, D. D., SCHUG, K. A. Complex mixture quantification without calibration using gas chromatography and a comprehensive carbon reactor in conjunction with flame ionization detection. **Journal of separation science**, v. 41, n. 21, pp.4031-4037, 2018.
[33] BEACH, C. A., KRUMM, C., SPANJERS, C. S., MADUSKAR, S., Jones, A. J. Dauenhauer, P. J. Quantitative carbon detector for enhanced detection of molecules in foods, pharmaceuticals, cosmetics, flavors, and fuels. **Analyst**, v. 141, n. 5, pp.1627-1632, 2016.

[34] MALAKAR, J., NAYAK, A.K., GOSWAMI, S. Use of response surface methodology in the formulation and optimization of bisoprolol fumarate matrix tablets for sustained drug release. **International Scholarly Research Notices**, 2012.
[35] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Bisoprolol hemifumarate. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisoprolol> Acesso em: 23 de jan de 2023.
[36] BAKHEIT A. H., Ali R., ALSHAHRANI, A.D., EL-AZAB, A.S. Bisoprolol: A comprehensive profile. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2021;46:51-89. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.006. Epub 2020 Sep 8. PMID: 33461700.
[37] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Methanol. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/887> Acesso em: 23 de jan de 2023.
[38] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Acetone. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/180> Acesso em: 23 de jan de 2023.
[39] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Methylene Chloride. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6344> Acesso em: 23 de jan de 2023.
[40] National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Chloroform. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6212> Acesso em: 23 de jan de 2023.
[41] RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 27, pp.771-780, 2004.
[42] 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.
[43] United States Pharmacopeia. – USP 43 <1467> **Residual solvents, Verification of compendial procedures and validation of alternatives procedures.**
[44] HATAMBEYGI, N., ABEDI, G., TALEBI, M., 2011. Method development and validation for optimized separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n. 35, pp.5995-6003, 2011.
[45] AGILENT. **Amostrador *Headspace* Agilent 8697 Operação**. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/operation-*headspace*-sampler-8697-g4511-99004-pt-agilent.pdf> Acesso em: 06 de nov de 2022.
[46] KLICK, S., SKÖLD, A. Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 2, pp.401-409, 2004.
[47] CAMARASU, C.C. Residual solvents determination in drug products by static *headspace*-gas chromatography. **Chromatographia**, v. 56, pp. S137-S143, 2002.
[48] CHENG, C., LIU, S., MUELLER, B. J., YAN, Z. A generic static *headspace* gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance. **Journal of Chromatography A**, n. 1217, v. 41, pp.6413-6421, 2010.
[49] SACCHI, L. P. **Desenvolvimento de Método Indicativo de Estabilidade para Associação dos Fármacos Losartana Potássica e Besilato de Anlodipino Empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Conceitos de Analytical Quality By Design**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2018.
[50] CHAVES, J. A. P. **Aplicação do Princípio De Quality By Design no Processo de Desenvolvimento Analítico de Métodos Indicativos de Estabilidade.** Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em

Tecnologias Industriais Farmacêuticas). Instituto de Tecnologia em Fármacos. Farmanguinhos, Rio de Janeiro. 2017.
[51] OLIVEIRA, L. G. **Qualidade por Design Analítico (AQbD) Aplicado ao Desenvolvimento de Métodos por Cromatografia Gasosa na Matéria-Prima de Cloridrato de Duloxetina**. Dissertação (Mestrado em Química). Centro de Engenharias e Ciências Exatas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo. 2021.
[52] KRABER, Shari. R-Squared Mysteries Solved. **Stat-Ease**, 2021. Disponível em: <https://www.statease.com/blog/r-squared-mysteries-solved/>. Acesso em: 22 de jan. de 2023.
[53] Análise de regressão múltipla: Use o R-quadrado ajustado e o R-quadrado predito para incluir o número correto de variáveis**. Minitab**, 2019 Disponível em: <https://blog.minitab.com/pt/analise-de-regressao-multipla-use-o-r-quadrado-ajustado-e-o-r-quadrado-predito-para-incluir-o-numero-correto-de-variaveis> Acesso em: 22 de jan de 2023.

Apêndice

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	33482,0	4185,3	24,57	0,012
Linear	8	33482,0	4185,3	24,57	0,012
Temperatura Incubacao	1	200,1	200,1	1,17	0,358
Tempo Incubacao	1	0,1	0,1	0,00	0,984
Velocidade Agitacao Vial	1	0,1	0,1	0,00	0,984
Fluxo Preenchimento	1	14,1	14,1	0,08	0,792
Pressao Preenchimento	1	32970,1	32970,1	193,59	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	6,7	6,7	0,04	0,855
Temperatura Coluna	1	290,1	290,1	1,70	0,283
Vazao do Gás	1	0,8	0,8	0,00	0,951
Erro	3	510,9	170,3		
Total	11	33992,9			

Figura 1 - Resultado ANOVA para R1

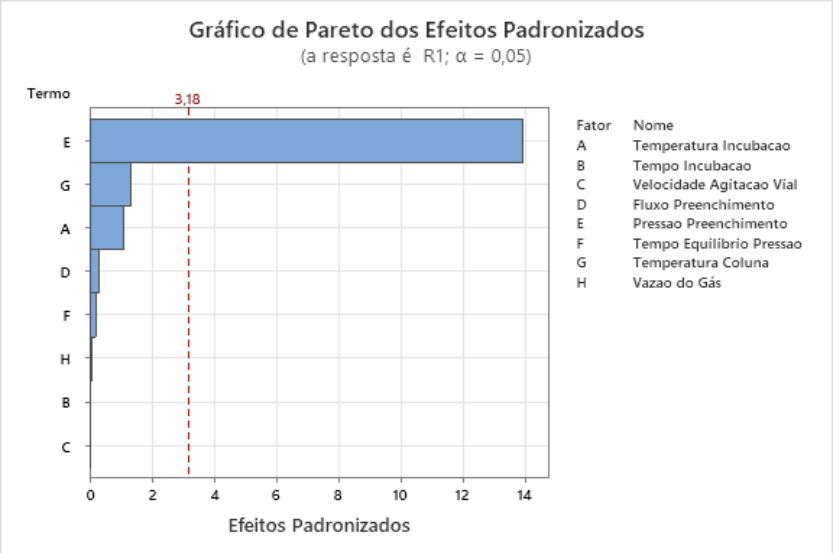


Figura 2 – Gráfico de Pareto para R1

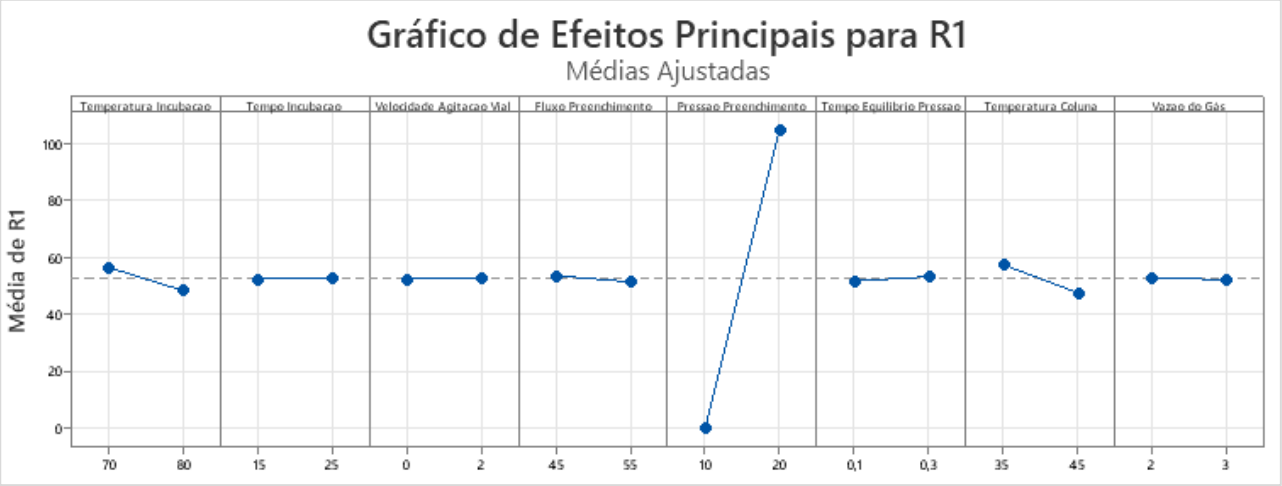


Figura 3 - Gráfico de Efeitos Principais para R1

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	37256,0	4657,0	24,94	0,012
Linear	8	37256,0	4657,0	24,94	0,012
Temperatura Incubacao	1	352,1	352,1	1,89	0,263
Tempo Incubacao	1	18,8	18,8	0,10	0,772
Velocidade Agitacao Vial	1	18,8	18,8	0,10	0,772
Fluxo Preenchimento	1	90,7	90,7	0,49	0,536
Pressao Preenchimento	1	36630,8	36630,8	196,15	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	102,1	102,1	0,55	0,513
Temperatura Coluna	1	18,7	18,7	0,10	0,772
Vazao do Gás	1	24,1	24,1	0,13	0,743
Erro	3	560,2	186,7		
Total	11	37816,3			

Figura 4 - Resultado ANOVA para R2

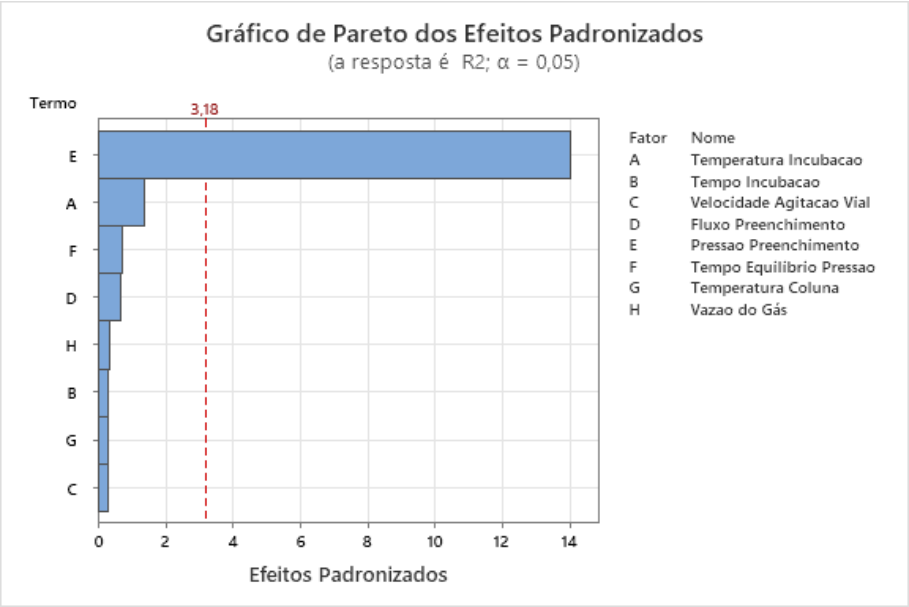


Figura 5 - Gráfico de Pareto para R2

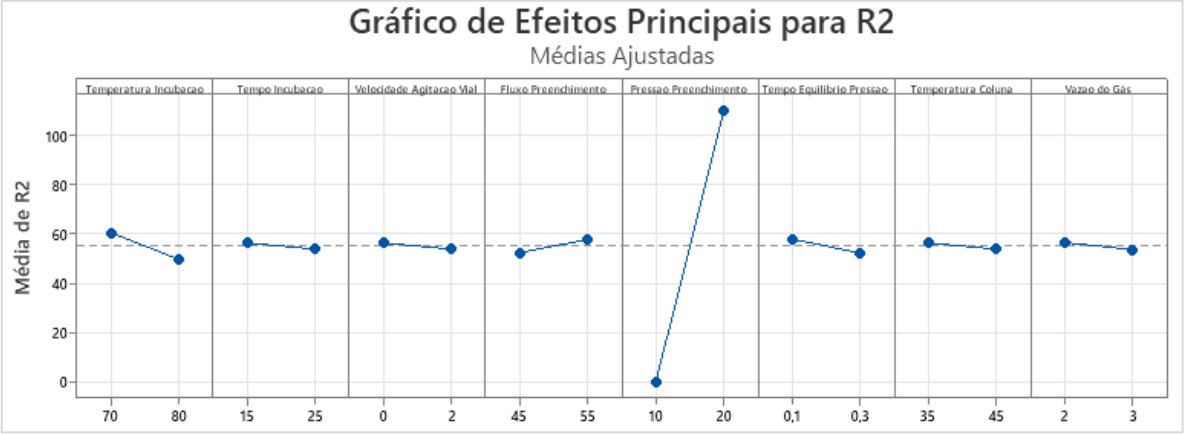


Figura 6 - Gráfico de Efeitos Principais para R2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	42118,7	5264,8	29,13	0,009
Linear	8	42118,7	5264,8	29,13	0,009
Temperatura Incubacao	1	200,1	200,1	1,11	0,370
Tempo Incubacao	1	2,1	2,1	0,01	0,921
Velocidade Agitacao Vial	1	14,1	14,1	0,08	0,798
Fluxo Preenchimento	1	30,1	30,1	0,17	0,711
Pressao Preenchimento	1	41654,1	41654,1	230,45	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	114,1	114,1	0,63	0,485
Temperatura Coluna	1	24,1	24,1	0,13	0,739
Vazao do Gás	1	80,1	80,1	0,44	0,553
Erro	3	542,2	180,7		
Total	11	42660,9			

Figura 7- Resultado ANOVA pra R3

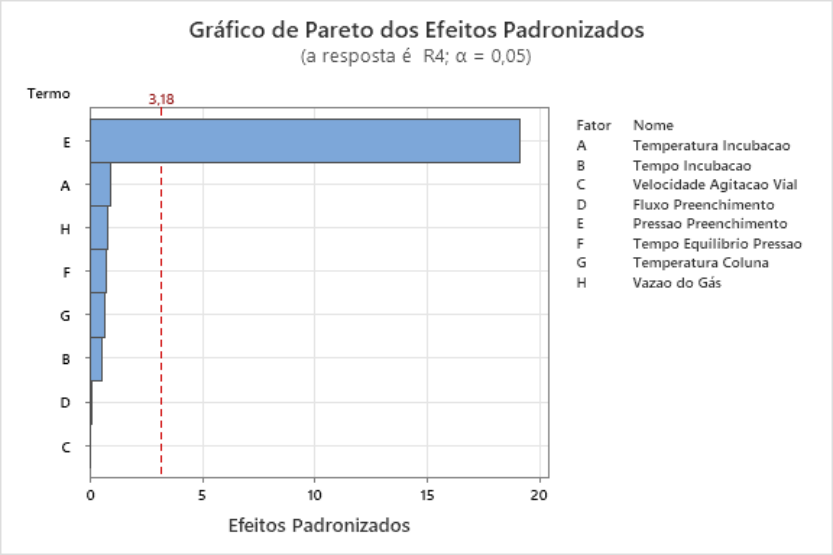


Figura 8 - Gráfico de Pareto para R3

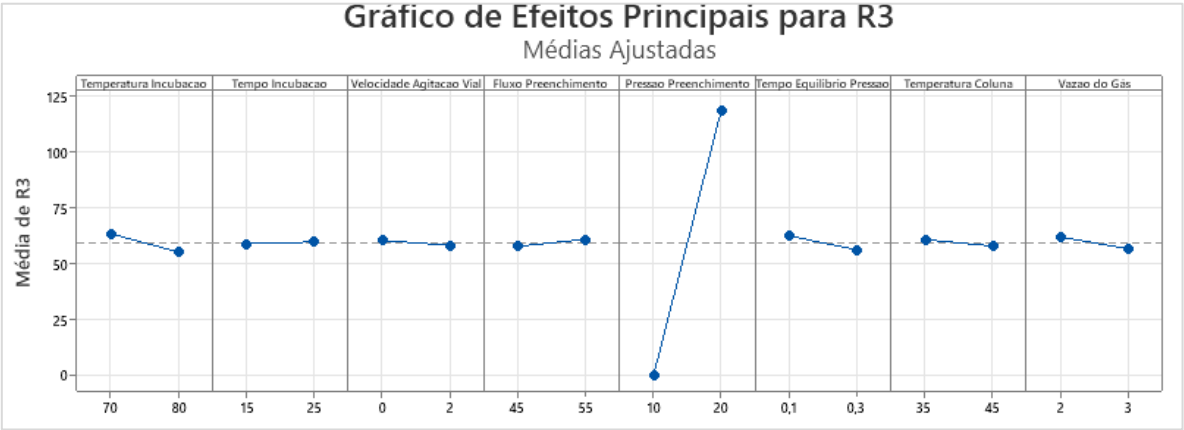


Figura 9 - Gráfico de Efeitos Principais para R3

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	42573,3	5321,7	46,23	0,005
Linear	8	42573,3	5321,7	46,23	0,005
Temperatura Incubacao	1	96,3	96,3	0,84	0,428
Tempo Incubacao	1	33,3	33,3	0,29	0,628
Velocidade Agitacao Vial	1	0,3	0,3	0,00	0,960
Fluxo Preenchimento	1	1,3	1,3	0,01	0,921
Pressao Preenchimento	1	42245,3	42245,3	367,00	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	65,3	65,3	0,57	0,506
Temperatura Coluna	1	56,3	56,3	0,49	0,535
Vazao do Gás	1	75,0	75,0	0,65	0,479
Erro	3	345,3	115,1		
Total	11	42918,7			

Figura 10 - Resultado ANOVA para R4

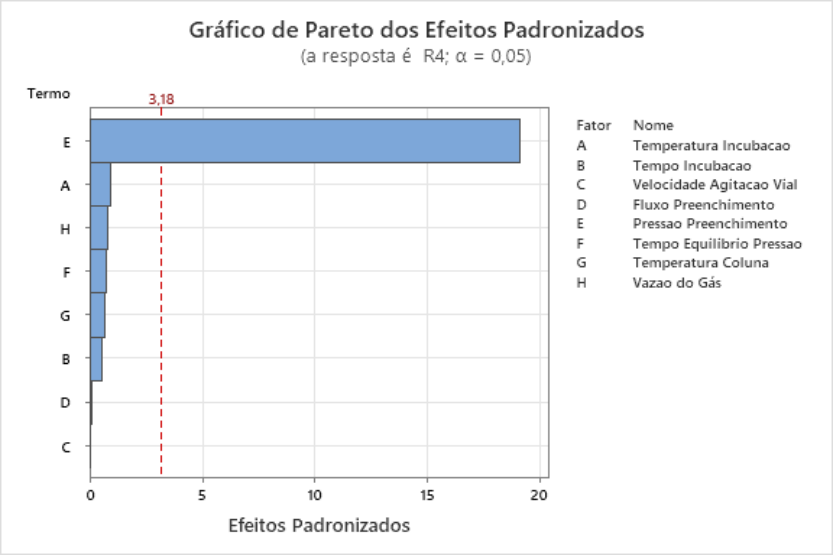


Figura 11 – Gráfico de Pareto para R4

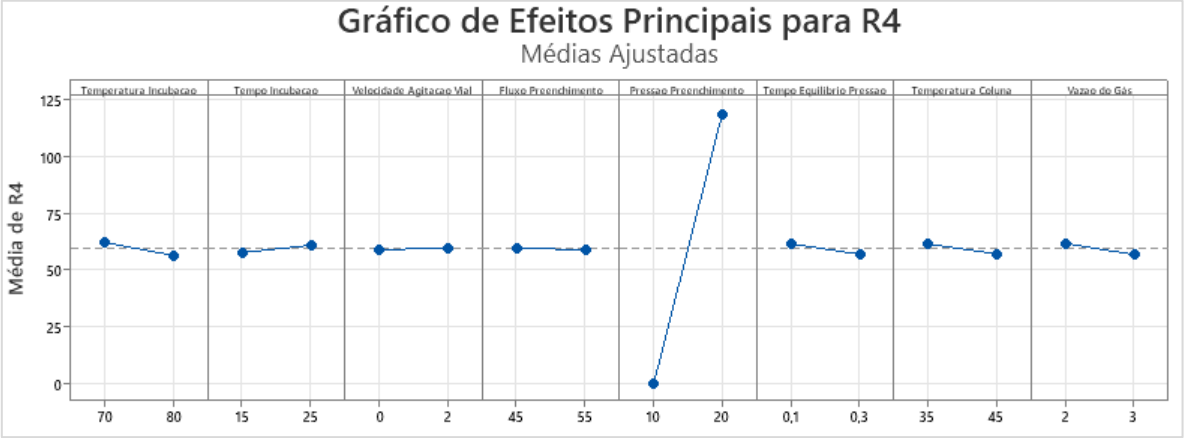


Figura 12 - Gráfico de Efeitos Principais para R4

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	24472,3	3059,0	63,58	0,003
Linear	8	24472,3	3059,0	63,58	0,003
Temperatura Incubacao	1	0,3	0,3	0,01	0,939
Tempo Incubacao	1	8,3	8,3	0,17	0,705
Velocidade Agitacao Vial	1	5,3	5,3	0,11	0,761
Fluxo Preenchimento	1	176,3	176,3	3,67	0,151
Pressao Preenchimento	1	23941,3	23941,3	497,63	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	208,3	208,3	4,33	0,129
Temperatura Coluna	1	120,3	120,3	2,50	0,212
Vazao do Gás	1	12,0	12,0	0,25	0,652
Erro	3	144,3	48,1		
Total	11	24616,7			

Figura 13 - Resultado ANOVA para R5

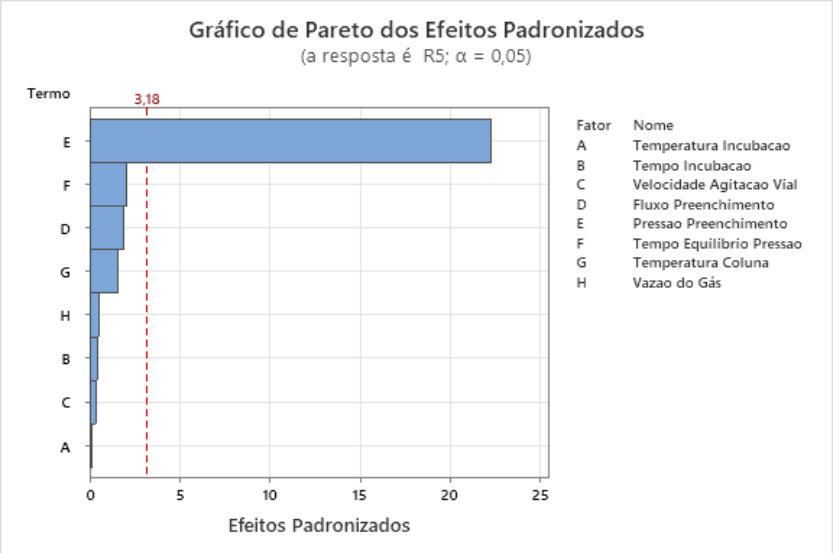


Figura 14 - Gráfico de Pareto para R5

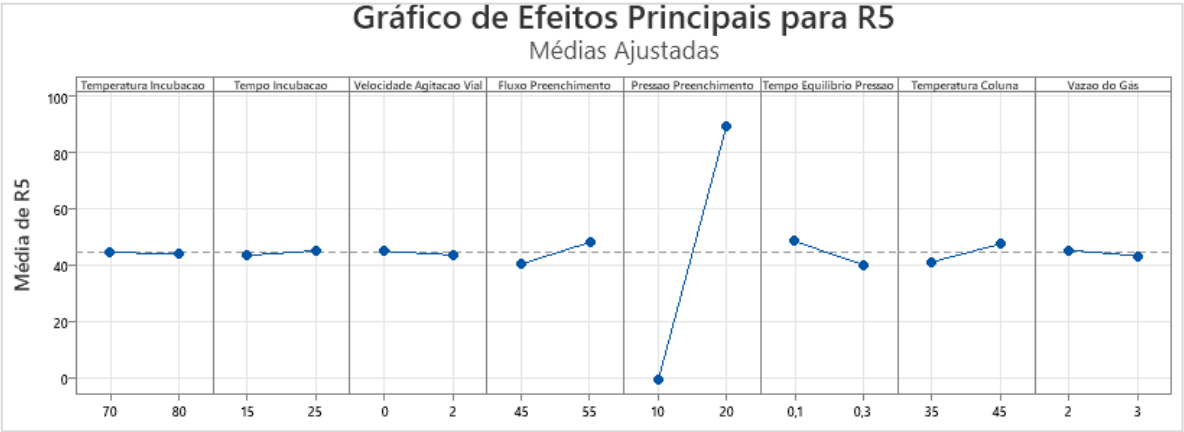


Figura 15 - Gráfico de Efeitos Principais pata R5

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	31814,0	3976,8	478,81	0,000
Linear	8	31814,0	3976,8	478,81	0,000
Temperatura Incubacao	1	4,1	4,1	0,49	0,534
Tempo Incubacao	1	2,1	2,1	0,25	0,651
Velocidade Agitacao Vial	1	10,1	10,1	1,21	0,351
Fluxo Preenchimento	1	24,1	24,1	2,90	0,187
Pressao Preenchimento	1	31724,1	31724,1	3819,62	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	18,8	18,8	2,26	0,230
Temperatura Coluna	1	24,1	24,1	2,90	0,187
Vazao do Gás	1	6,7	6,7	0,81	0,434
Erro	3	24,9	8,3		
Total	11	31838,9			

Figura 16 - Resultado ANOVA para R6

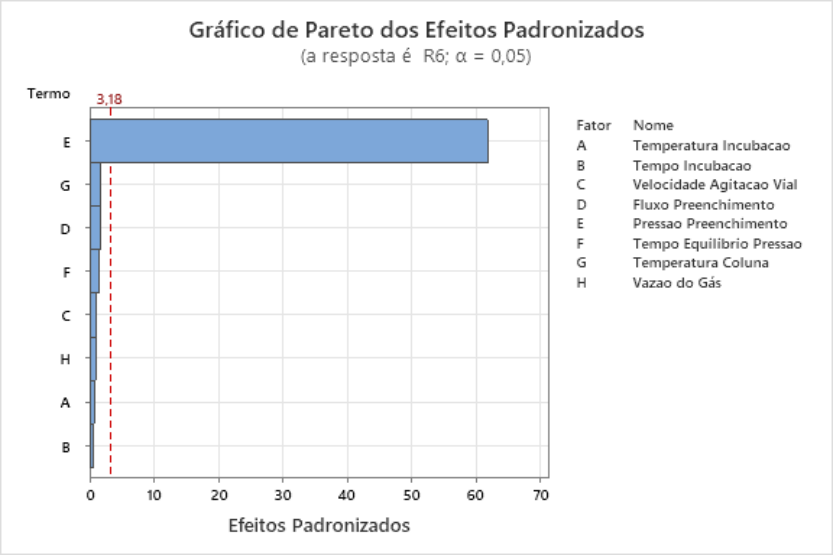


Figura 17 – Gráfico de Pareto para R6

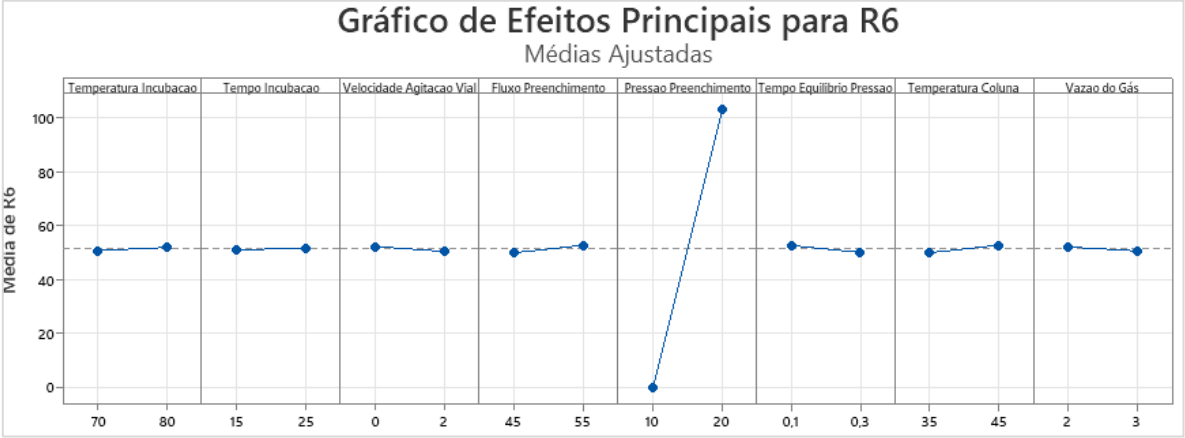


Figura 18 - Gráfico de Efeitos Principais para R6

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	26070,7	3258,8	79,48	0,002
Linear	8	26070,7	3258,8	79,48	0,002
Temperatura Incubacao	1	12,0	12,0	0,29	0,626
Tempo Incubacao	1	5,3	5,3	0,13	0,742
Velocidade Agitacao Vial	1	5,3	5,3	0,13	0,742
Fluxo Preenchimento	1	176,3	176,3	4,30	0,130
Pressao Preenchimento	1	25576,3	25576,3	623,81	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	208,3	208,3	5,08	0,110
Temperatura Coluna	1	75,0	75,0	1,83	0,269
Vazao do Gás	1	12,0	12,0	0,29	0,626
Erro	3	123,0	41,0		
Total	11	26193,7			

Figura 19 - Resultado ANOVA para R7

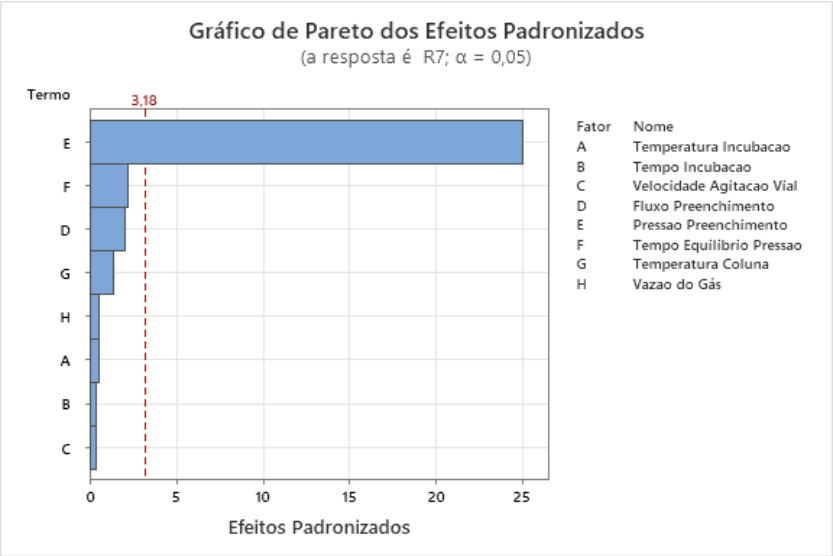


Figura 20 – Gráfico de Pareto para R7

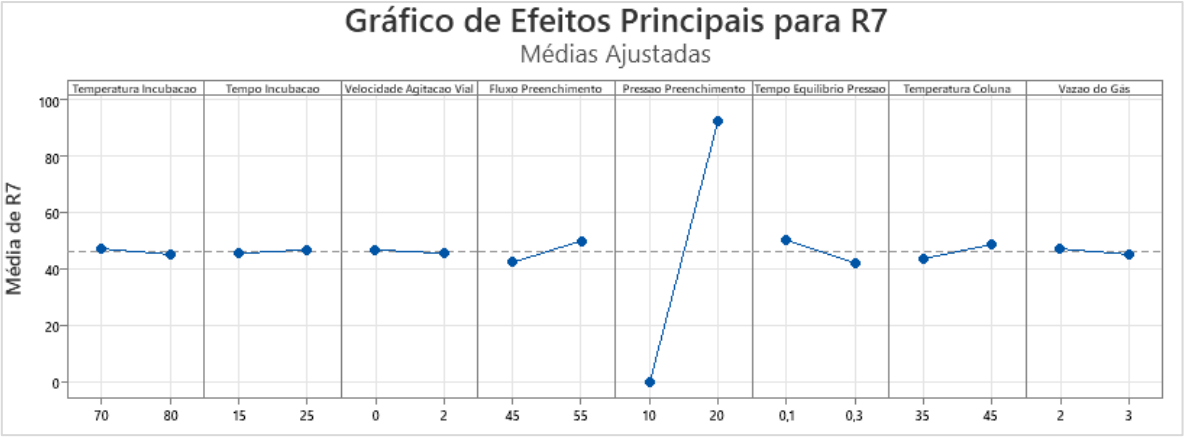


Figura 21 - Gráfico de Efeitos Principais para R7

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	29264,7	3658,1	240,75	0,000
Linear	8	29264,7	3658,1	240,75	0,000
Temperatura Incubacao	1	4,1	4,1	0,27	0,640
Tempo Incubacao	1	6,7	6,7	0,44	0,553
Velocidade Agitacao Vial	1	4,1	4,1	0,27	0,640
Fluxo Preenchimento	1	36,7	36,7	2,42	0,218
Pressao Preenchimento	1	29106,8	29106,8	1915,62	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	52,1	52,1	3,43	0,161
Temperatura Coluna	1	44,1	44,1	2,90	0,187
Vazao do Gás	1	10,1	10,1	0,66	0,475
Erro	3	45,6	15,2		
Total	11	29310,3			

Figura 22 - Resultado ANOVA para R8

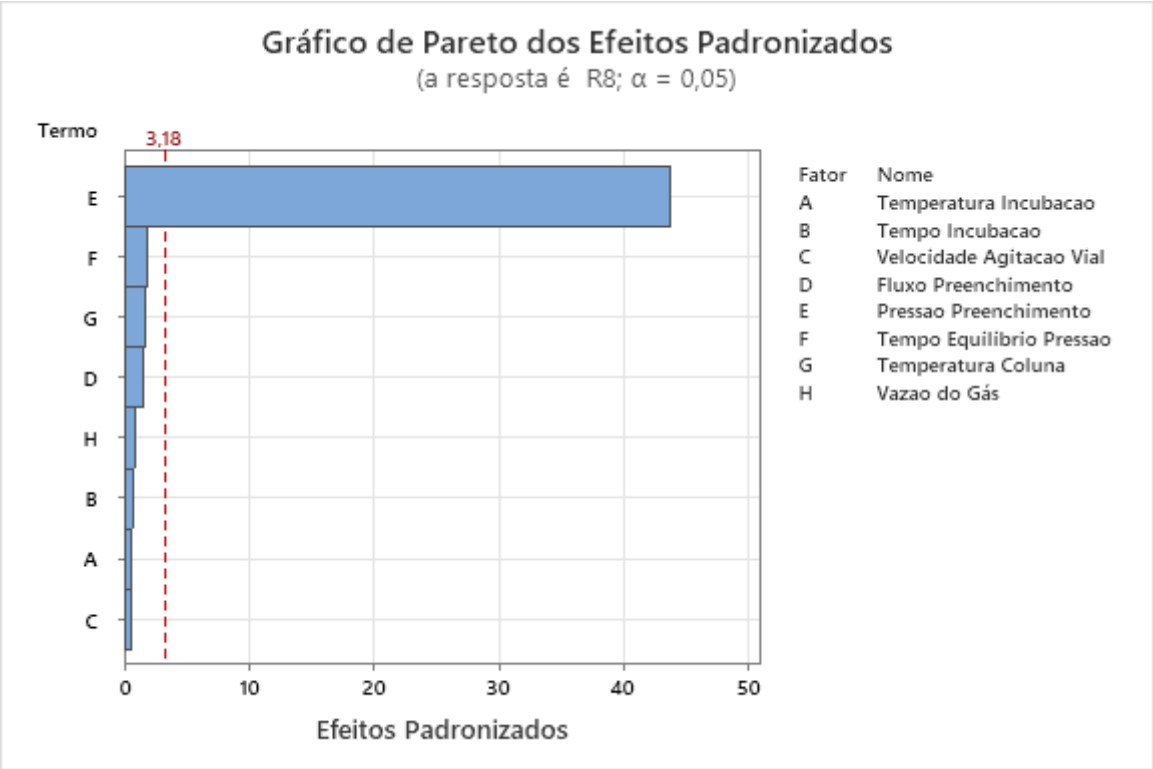


Figura 23 – Gráfico de Pareto para R8

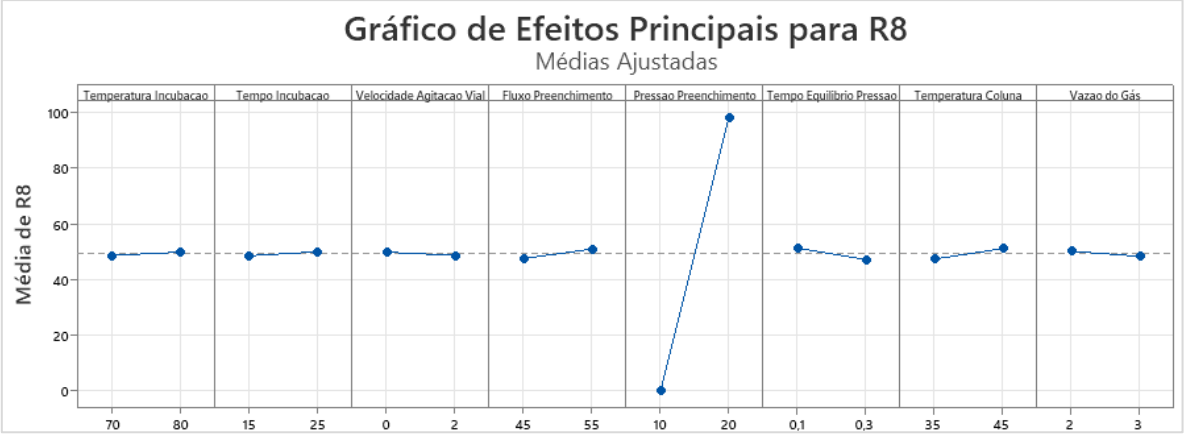


Figura 24 - Gráfico de Efeitos Principais para R8

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	33370,3	4171,3	93,16	0,002
Linear	8	33370,3	4171,3	93,16	0,002
Temperatura Incubacao	1	27,0	27,0	0,60	0,494
Tempo Incubacao	1	1,3	1,3	0,03	0,874
Velocidade Agitacao Vial	1	5,3	5,3	0,12	0,753
Fluxo Preenchimento	1	0,0	0,0	0,00	1,000
Pressao Preenchimento	1	33285,3	33285,3	743,34	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	0,3	0,3	0,01	0,937
Temperatura Coluna	1	48,0	48,0	1,07	0,377
Vazao do Gás	1	3,0	3,0	0,07	0,813
Erro	3	134,3	44,8		
Total	11	33504,7			

Figura 25 - Resultado ANOVA para R9

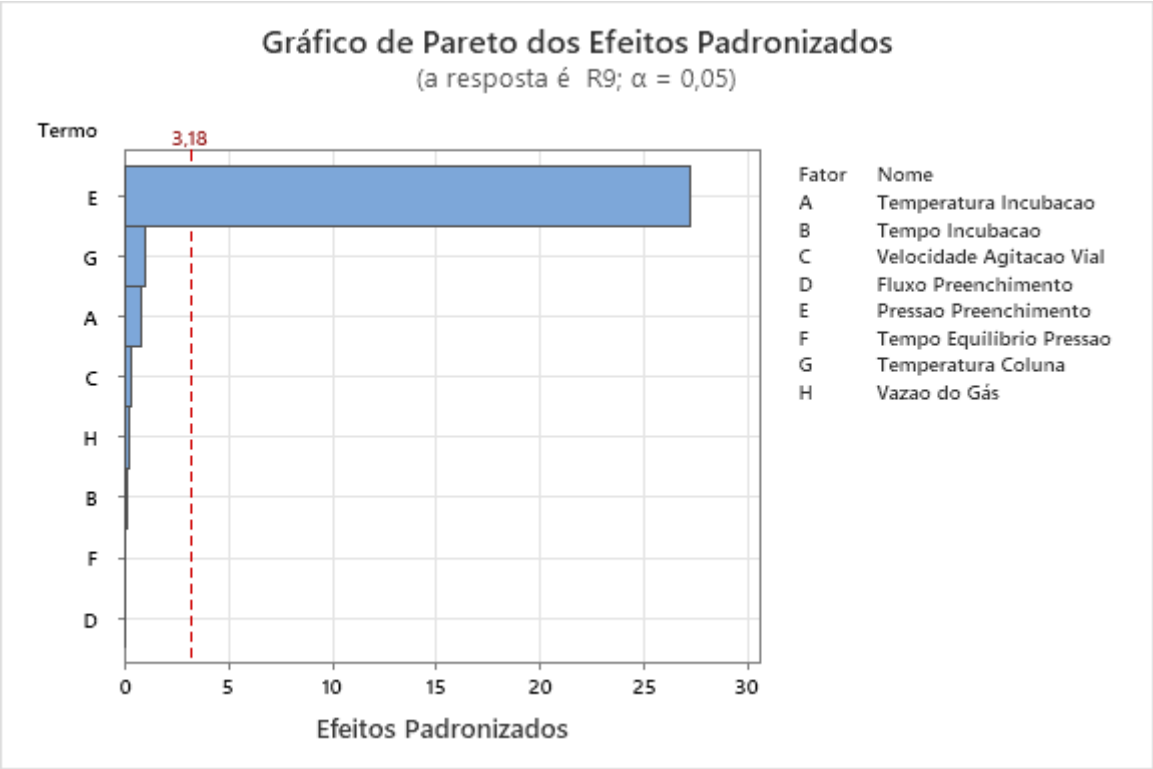


Figura 26 – Gráfico de Pareto para R9

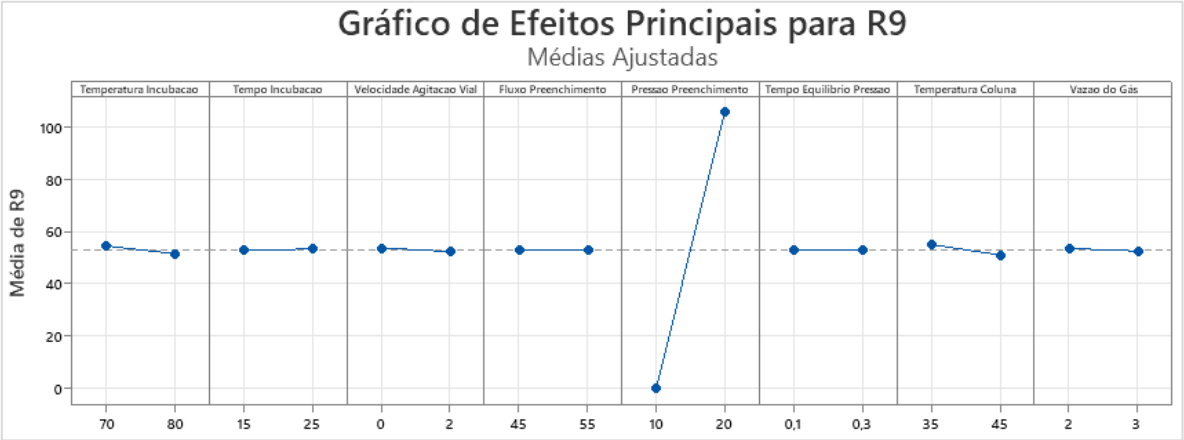


Figura 27 - Gráfico de Efeitos Principais para R9

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	38590,3	4823,8	24,43	0,012
Linear	8	38590,3	4823,8	24,43	0,012
Temperatura Incubacao	1	192,0	192,0	0,97	0,397
Tempo Incubacao	1	0,3	0,3	0,00	0,970
Velocidade Agitacao Vial	1	8,3	8,3	0,04	0,850
Fluxo Preenchimento	1	0,0	0,0	0,00	1,000
Pressao Preenchimento	1	38081,3	38081,3	192,87	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	8,3	8,3	0,04	0,850
Temperatura Coluna	1	300,0	300,0	1,52	0,305
Vazao do Gás	1	0,0	0,0	0,00	1,000
Erro	3	592,3	197,4		
Total	11	39182,7			

Figura 28 - Resultado ANOVA para R10

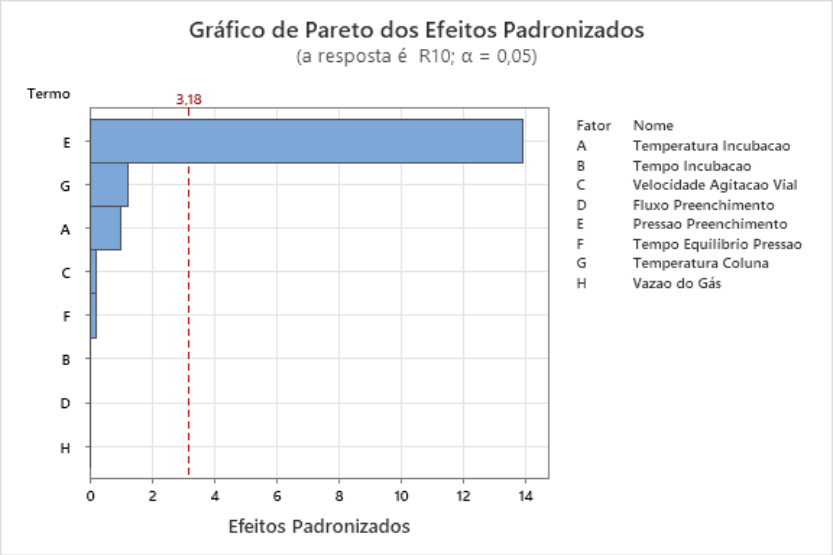


Figura 29 – Gráfico de Pareto pra R10

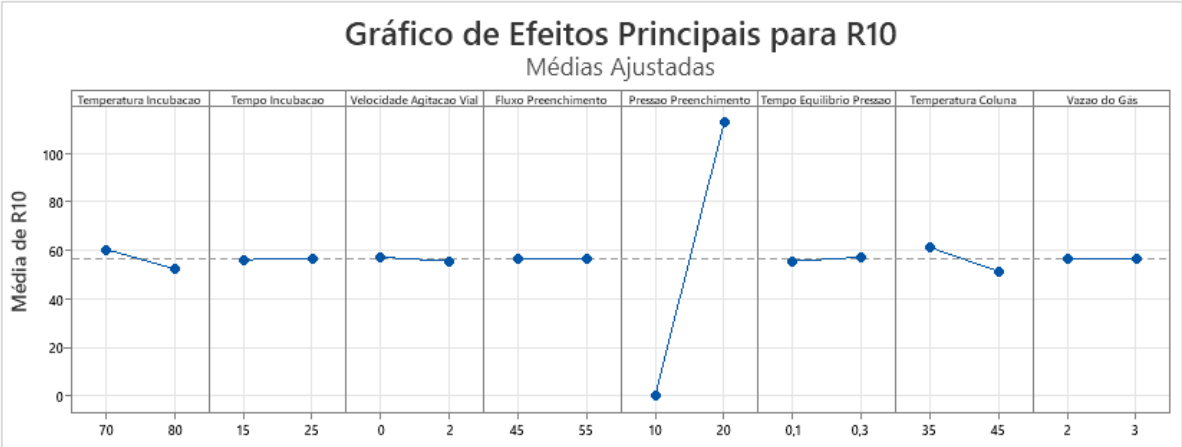


Figura 30 - Gráfico de Efeitos Principais para R10

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	35981,3	4497,7	78,75	0,002
Linear	8	35981,3	4497,7	78,75	0,002
Temperatura Incubacao	1	56,3	56,3	0,99	0,394
Tempo Incubacao	1	1,3	1,3	0,02	0,888
Velocidade Agitacao Vial	1	5,3	5,3	0,09	0,780
Fluxo Preenchimento	1	8,3	8,3	0,15	0,728
Pressao Preenchimento	1	35861,3	35861,3	627,92	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	5,3	5,3	0,09	0,780
Temperatura Coluna	1	40,3	40,3	0,71	0,462
Vazao do Gás	1	3,0	3,0	0,05	0,833
Erro	3	171,3	57,1		
Total	11	36152,7			

Figura 31 - Resultado ANOVA para R11

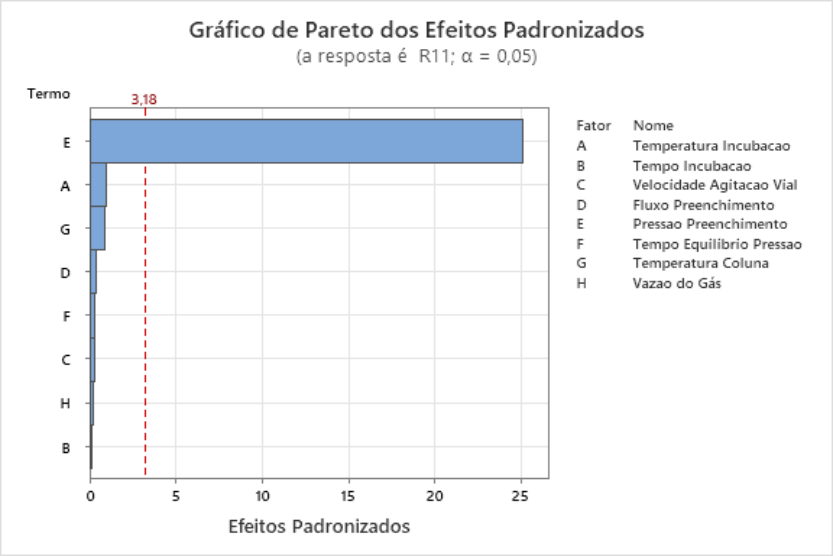


Figura 32 – Gráfico de Pareto para R11

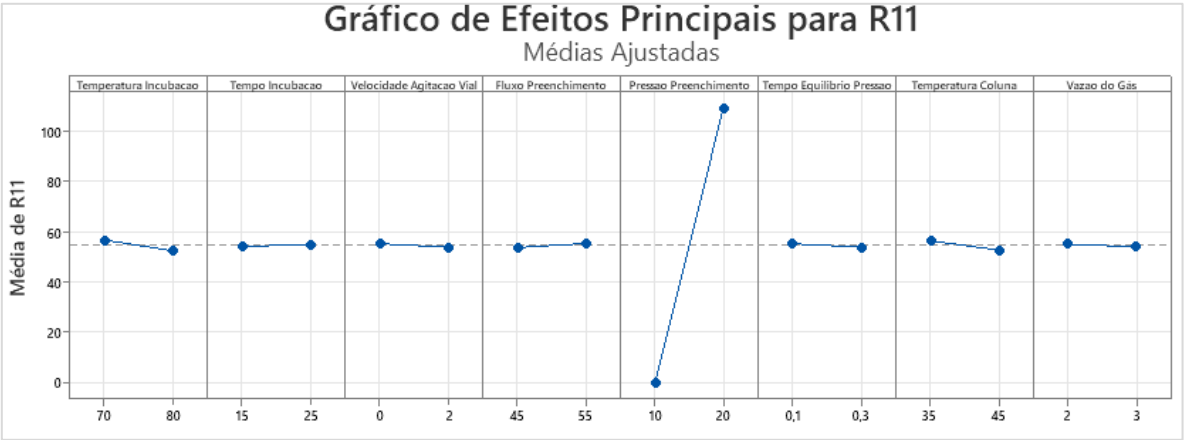


Figura 33 - Gráfico de Efeitos Principais para R11

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	34488,7	4311,1	43,36	0,005
Linear	8	34488,7	4311,1	43,36	0,005
Temperatura Incubacao	1	102,1	102,1	1,03	0,386
Tempo Incubacao	1	2,1	2,1	0,02	0,894
Velocidade Agitacao Vial	1	10,1	10,1	0,10	0,771
Fluxo Preenchimento	1	0,7	0,7	0,01	0,936
Pressao Preenchimento	1	34240,1	34240,1	344,41	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	6,8	6,8	0,07	0,811
Temperatura Coluna	1	126,7	126,7	1,27	0,341
Vazao do Gás	1	0,1	0,1	0,00	0,979
Erro	3	298,2	99,4		
Total	11	34786,9			

Figura 34 - Resultado ANOVA para R12

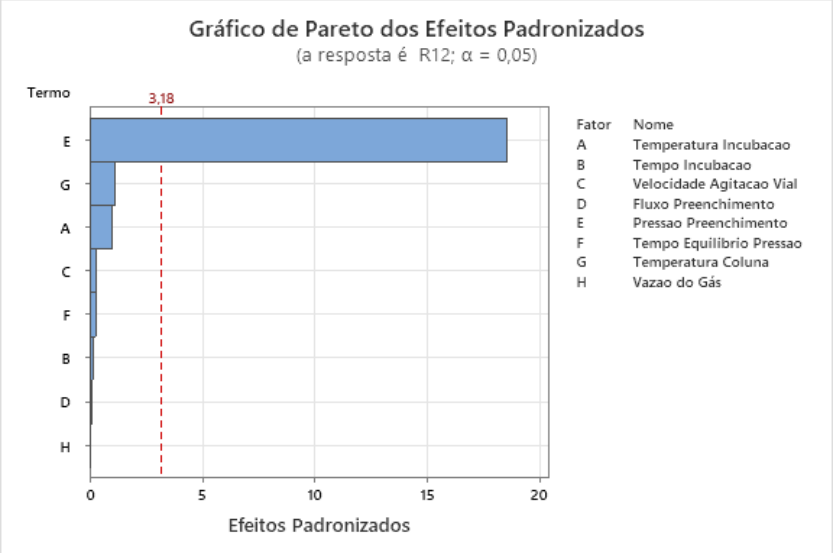


Figura 35 – Gráfico de Pareto para R12

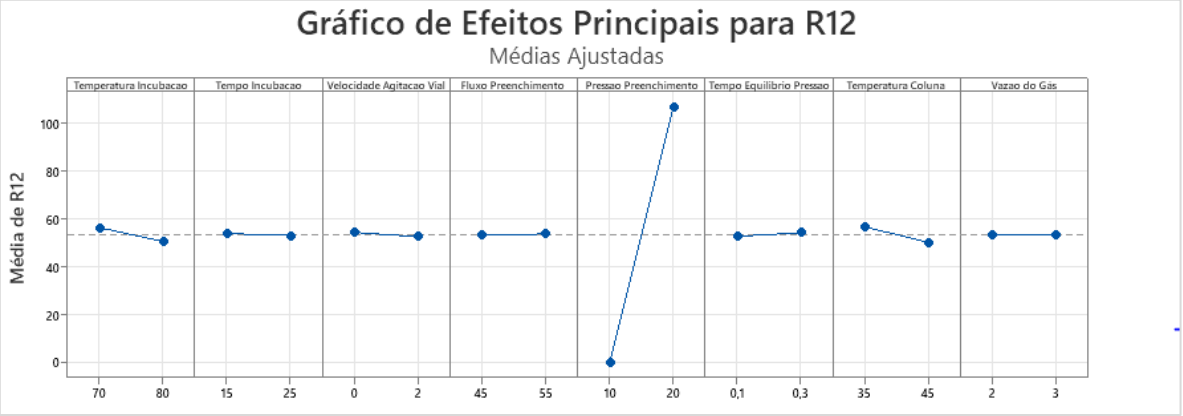


Figura 36 - Gráfico de Efeitos Principais para R12

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	529839	66230	7,20	0,066
Linear	8	529839	66230	7,20	0,066
Temperatura Incubacao	1	15194	15194	1,65	0,289
Tempo Incubacao	1	234	234	0,03	0,883
Velocidade Agitacao Vial	1	469	469	0,05	0,836
Fluxo Preenchimento	1	1220	1220	0,13	0,740
Pressao Preenchimento	1	465314	465314	50,62	0,006
Tempo Equilibrio Pressao	1	2214	2214	0,24	0,657
Temperatura Coluna	1	34454	34454	3,75	0,148
Vazao do Gás	1	10740	10740	1,17	0,359
Erro	3	27580	9193		
Total	11	557419			

Figura 37 - Resultado ANOVA para R13

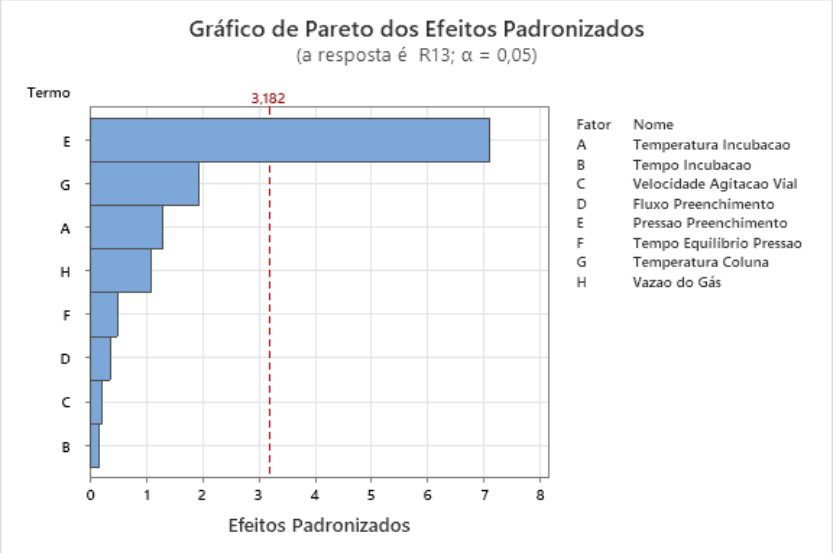


Figura 38 - Gráfico de Pareto para R13

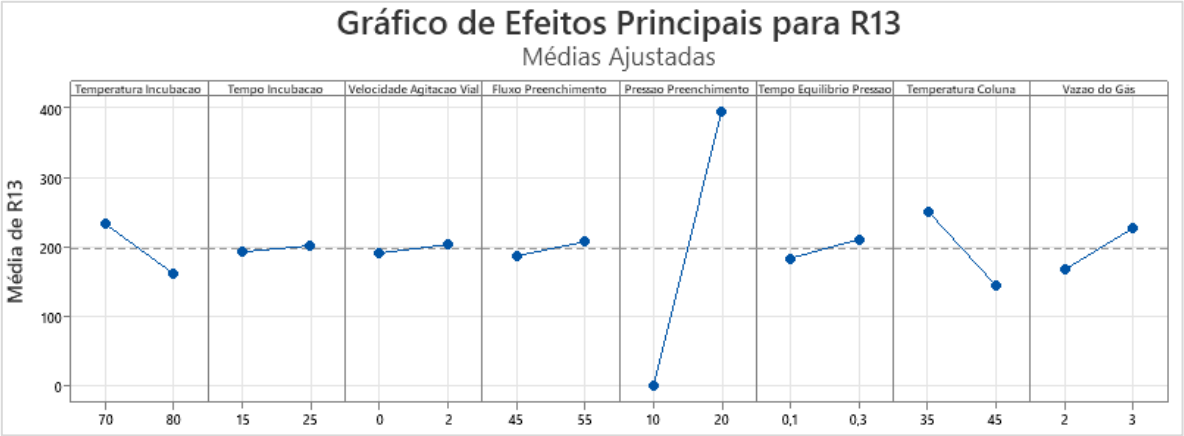


Figura 39 - Gráfico de Efeitos Principais para R13

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	3994,67	499,33	4,48	0,122
Linear	8	3994,67	499,33	4,48	0,122
Temperatura Incubacao	1	184,08	184,08	1,65	0,289
Tempo Incubacao	1	30,08	30,08	0,27	0,639
Velocidade Agitacao Vial	1	30,08	30,08	0,27	0,639
Fluxo Preenchimento	1	14,08	14,08	0,13	0,746
Pressao Preenchimento	1	3502,08	3502,08	31,43	0,011
Tempo Equilibrio Pressao	1	24,08	24,08	0,22	0,674
Temperatura Coluna	1	200,08	200,08	1,80	0,273
Vazao do Gás	1	10,08	10,08	0,09	0,783
Erro	3	334,25	111,42		
Total	11	4328,92			

Figura 40 - Resultado ANOVA para R14

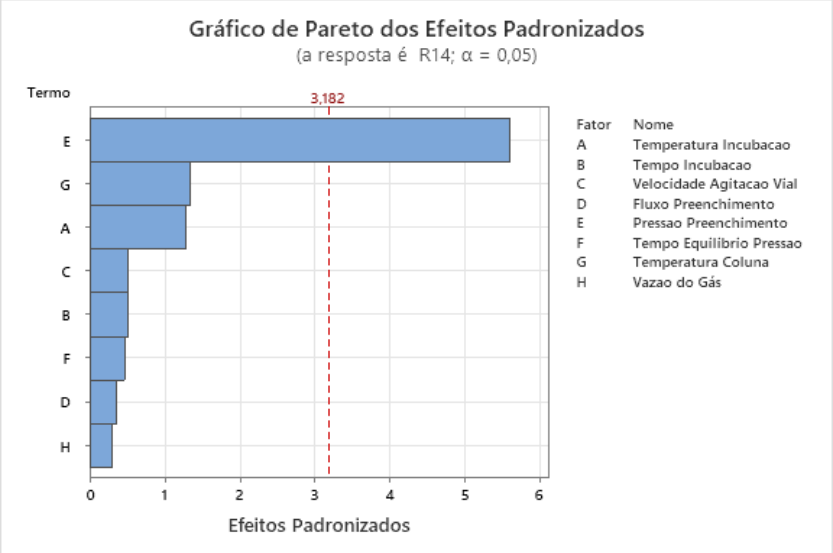


Figura 41 – Gráfico de Pareto para R14

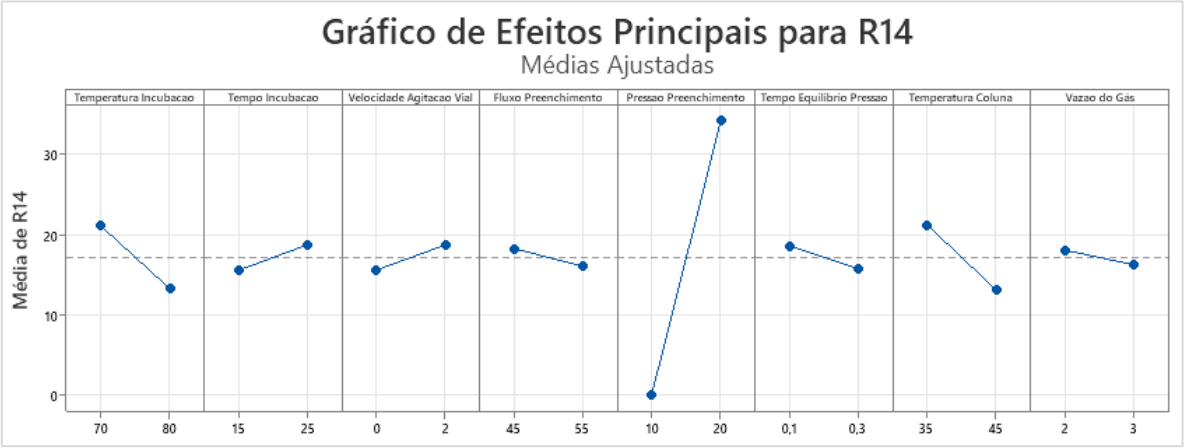


Figura 42 - Gráfico de Efeitos Principais para R14

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	6699,67	837,46	1,52	0,400
Linear	8	6699,67	837,46	1,52	0,400
Temperatura Incubacao	1	408,33	408,33	0,74	0,453
Tempo Incubacao	1	133,33	133,33	0,24	0,657
Velocidade Agitacao Vial	1	12,00	12,00	0,02	0,892
Fluxo Preenchimento	1	133,33	133,33	0,24	0,657
Pressao Preenchimento	1	5125,33	5125,33	9,28	0,056
Tempo Equilibrio Pressao	1	56,33	56,33	0,10	0,770
Temperatura Coluna	1	588,00	588,00	1,06	0,378
Vazao do Gás	1	243,00	243,00	0,44	0,555
Erro	3	1657,00	552,33		
Total	11	8356,67			

Figura 43 - Resultado ANOVA para R15

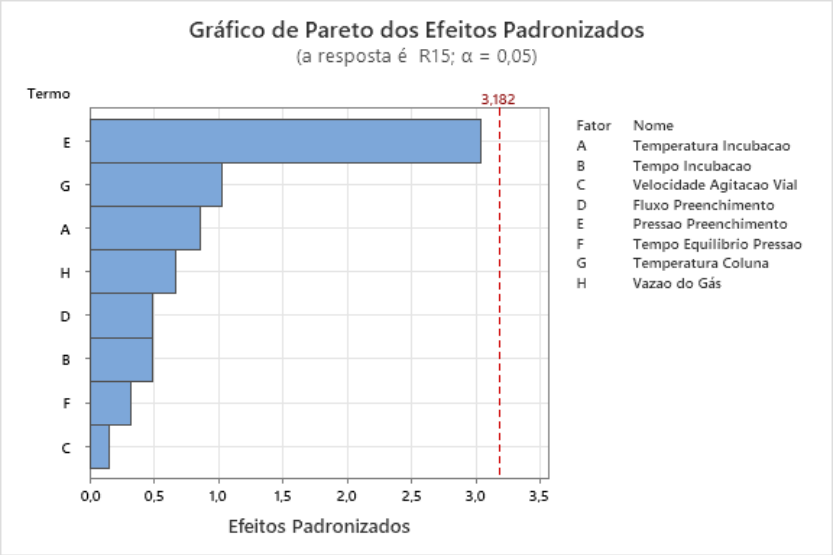


Figura 44 – Gráfico de Pareto para R15

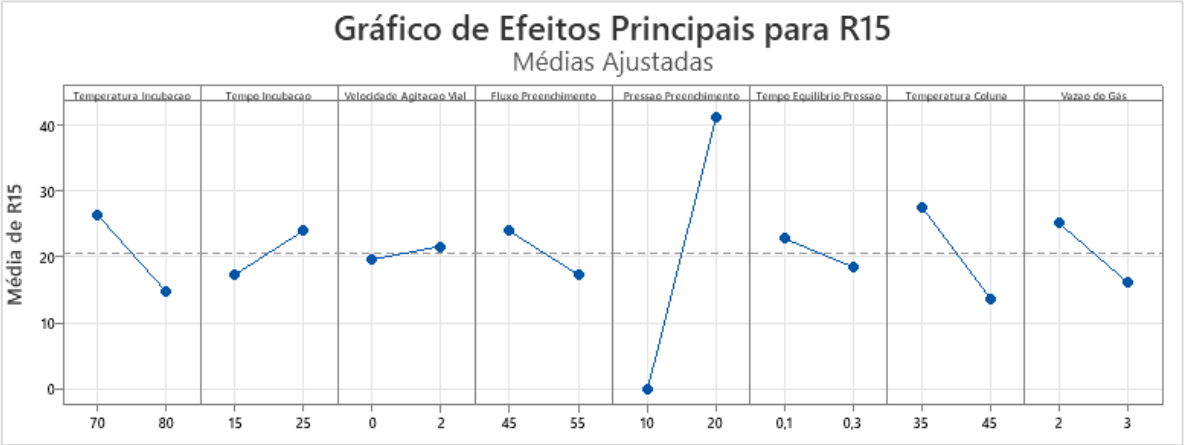


Figura 45 - Gráfico de Efeitos Principais para R15

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	277,333	34,667	4,82	0,112
Linear	8	277,333	34,667	4,82	0,112
Temperatura Incubacao	1	6,750	6,750	0,94	0,404
Tempo Incubacao	1	10,083	10,083	1,40	0,322
Velocidade Agitacao Vial	1	18,750	18,750	2,61	0,205
Fluxo Preenchimento	1	6,750	6,750	0,94	0,404
Pressao Preenchimento	1	200,083	200,083	27,81	0,013
Tempo Equilibrio Pressao	1	24,083	24,083	3,35	0,165
Temperatura Coluna	1	0,750	0,750	0,10	0,768
Vazao do Gás	1	10,083	10,083	1,40	0,322
Erro	3	21,583	7,194		
Total	11	298,917			

Figura 46 - Resultado ANOVA para R16

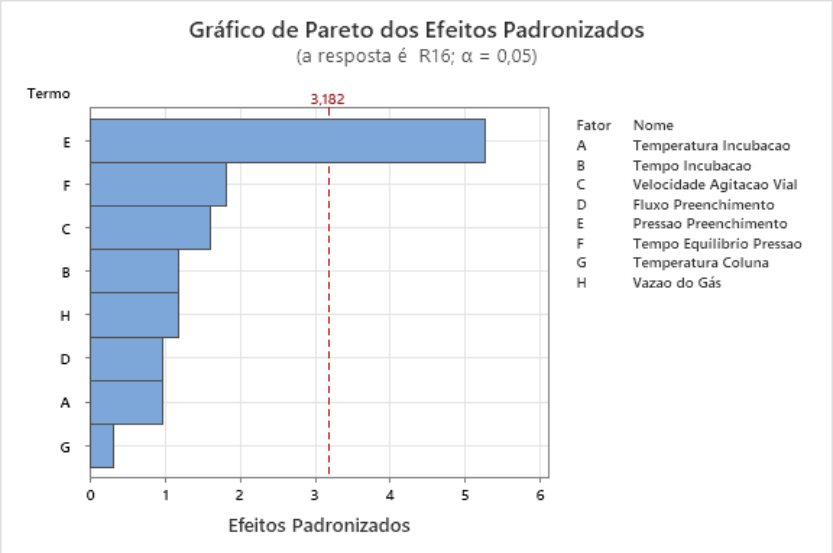


Figura 47 – Gráfico de Pareto para R16

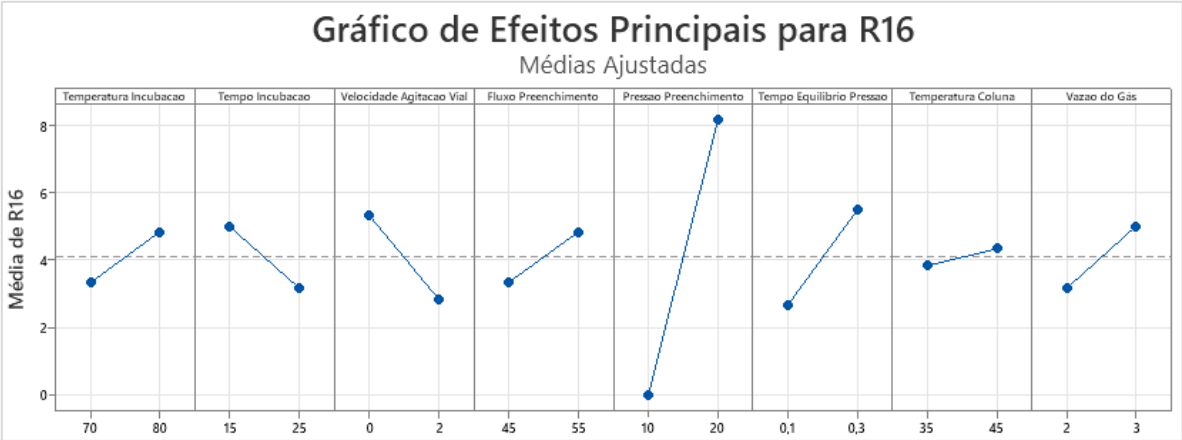


Figura 48 - Gráfico de Efeitos Principais para R16

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	581,820	72,728	35,52	0,007
Linear	8	581,820	72,728	35,52	0,007
Temperatura Incubacao	1	1,401	1,401	0,68	0,469
Tempo Incubacao	1	3,521	3,521	1,72	0,281
Velocidade Agitacao Vial	1	1,688	1,688	0,82	0,431
Fluxo Preenchimento	1	2,901	2,901	1,42	0,320
Pressao Preenchimento	1	558,967	558,967	273,00	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	0,301	0,301	0,15	0,727
Temperatura Coluna	1	13,021	13,021	6,36	0,086
Vazao do Gás	1	0,021	0,021	0,01	0,926
Erro	3	6,143	2,048		
Total	11	587,963			

Figura 49 - Resultado ANOVA para R17

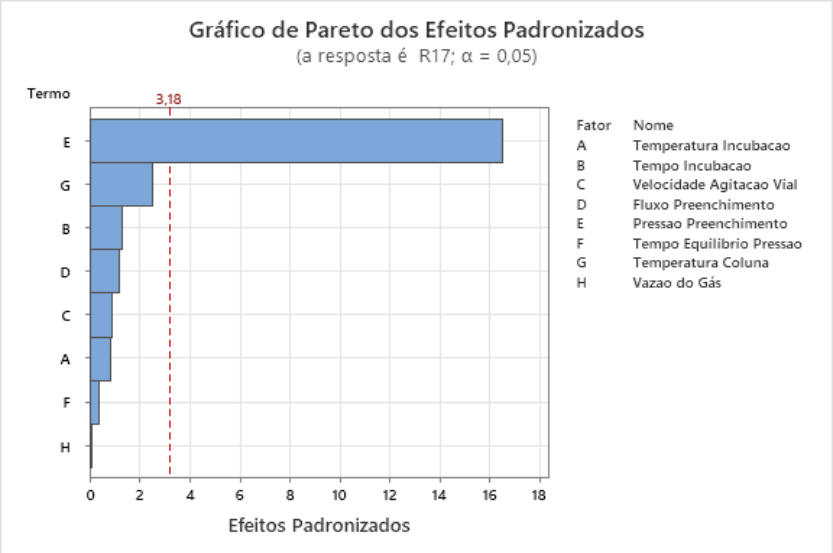


Figura 50 – Gráfico de Pareto para R17

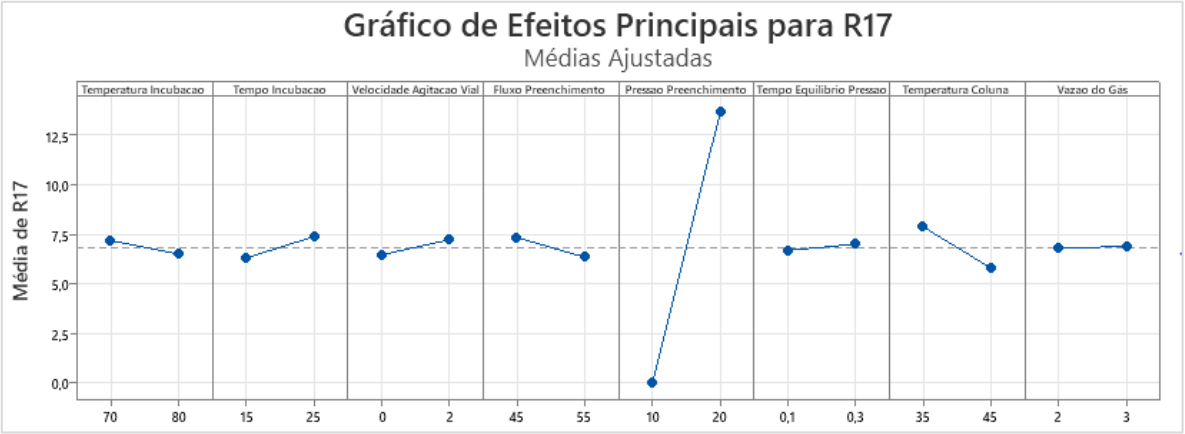


Figura 51 - Gráfico de Efeitos Principais para R17

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	127,747	15,968	26,04	0,011
Linear	8	127,747	15,968	26,04	0,011
Temperatura Incubacao	1	0,333	0,333	0,54	0,514
Tempo Incubacao	1	0,120	0,120	0,20	0,688
Velocidade Agitacao Vial	1	0,120	0,120	0,20	0,688
Fluxo Preenchimento	1	0,333	0,333	0,54	0,514
Pressao Preenchimento	1	120,333	120,333	196,20	0,001
Tempo Equilibrio Pressao	1	1,333	1,333	2,17	0,237
Temperatura Coluna	1	4,320	4,320	7,04	0,077
Vazao do Gás	1	0,853	0,853	1,39	0,323
Erro	3	1,840	0,613		
Total	11	129,587			

Figura 52 - Resultado ANOVA para R18

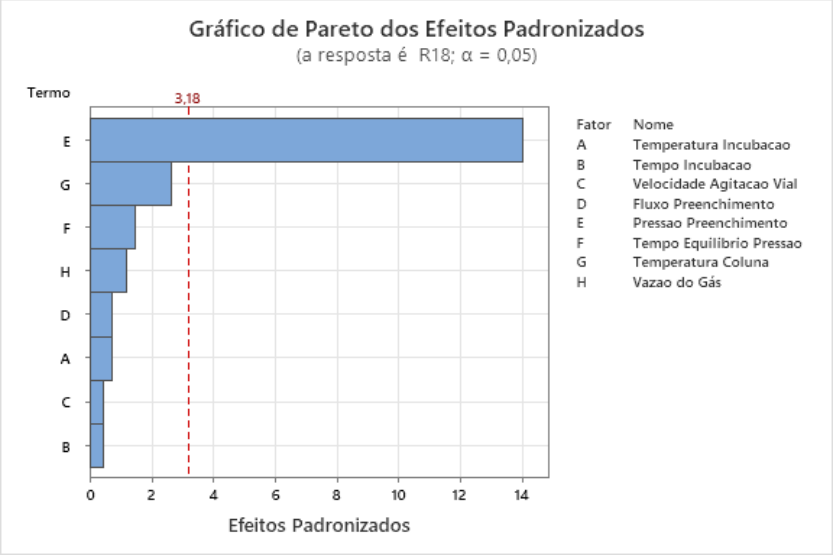


Figura 53 – Gráfico de Pareto para R18

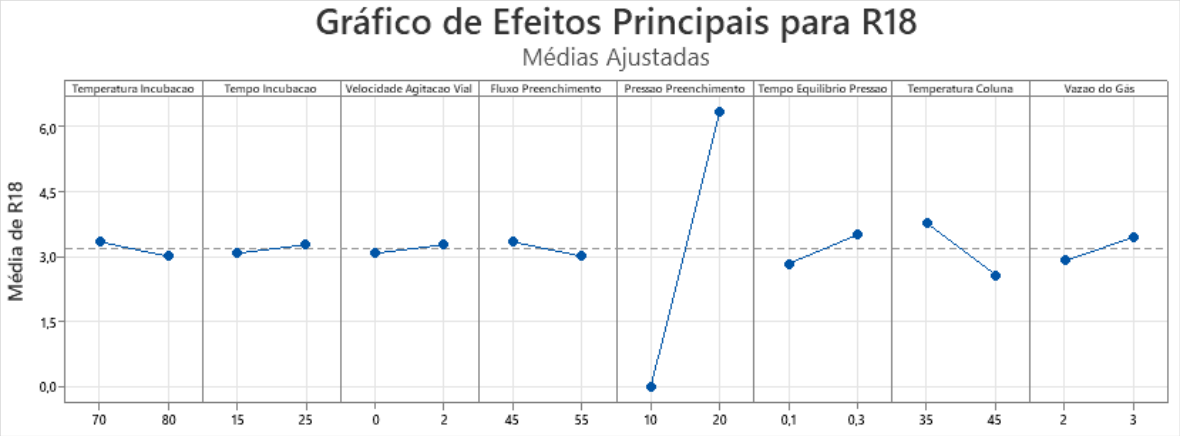


Figura 54 - Gráfico de Efeitos Principais para R18

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	1112,29	139,04	73,75	0,002
Linear	8	1112,29	139,04	73,75	0,002
Temperatura Incubacao	1	4,44	4,44	2,36	0,222
Tempo Incubacao	1	0,91	0,91	0,48	0,538
Velocidade Agitacao Vial	1	3,74	3,74	1,98	0,254
Fluxo Preenchimento	1	0,91	0,91	0,48	0,538
Pressao Preenchimento	1	1096,34	1096,34	581,53	0,000
Tempo Equilibrio Pressao	1	4,44	4,44	2,36	0,222
Temperatura Coluna	1	0,91	0,91	0,48	0,538
Vazao do Gás	1	0,61	0,61	0,32	0,610
Erro	3	5,66	1,89		
Total	11	1117,95			

Figura 55 - Resultado ANOVA para R19

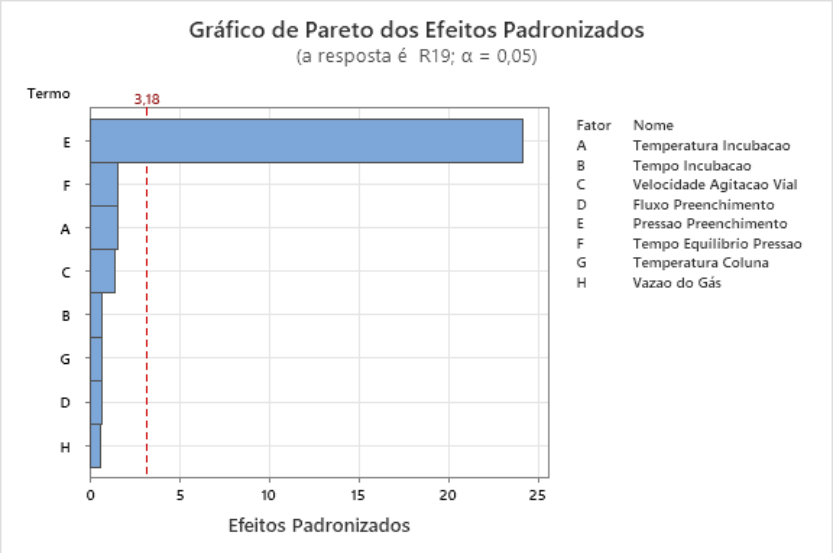


Figura 56 – Gráfico de Pareto para R19

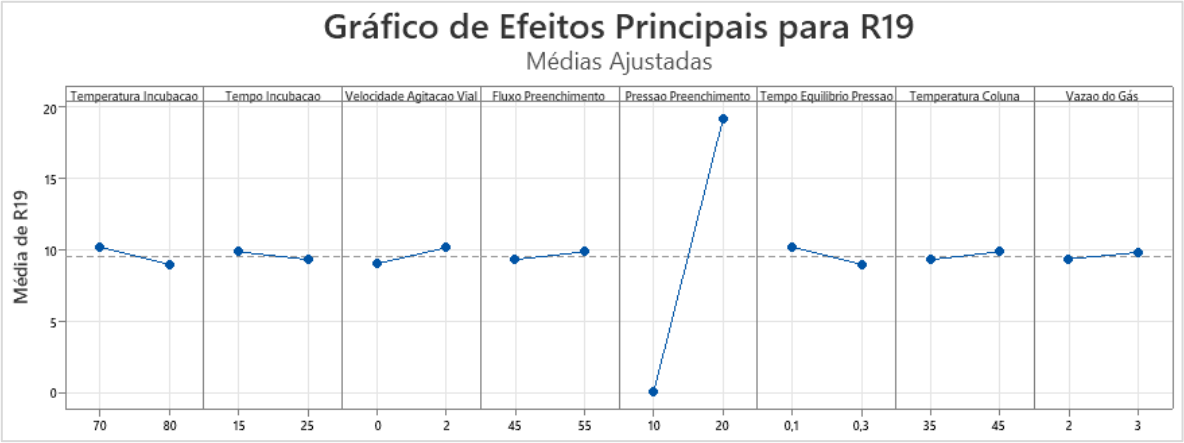


Figura 57 - Gráfico de Efeitos Principais para R19