UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado no
desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos**

Camila dos Santos Moreira

MESTRADO

Orientador: Prof. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo – 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado no
desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos**

Camila dos Santos Moreira

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço

São Paulo – 2019

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M827q Moreira, Camila dos Santos
Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos / Camila dos Santos Moreira. - São Paulo, 2019.
144 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Lourenço, Felipe Rebello

1. Qualidade por Design Analítico. 2. Desenvolvimento Analítico. 3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. I. T. II. Lourenço, Felipe Rebello, orientador.

Camila dos Santos Moreira

**Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado no
desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos**

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre**

**Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
orientador/presidente**

1o. examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas, instituições, organizações e universidades que investem tempo e recursos transformando vidas como a minha através da educação.

A vocês, todo o meu respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, ao meu orientador Professor Doutor Felipe Rebello Lourenço, pelo incentivo, disponibilidade e apoio. Muito obrigada por compartilhar o conhecimento de forma tão generosa.

À Paola, pela confiança, estímulo e apoio técnico, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos de vida e profissão Ângela, Bonella e Nathália pelos momentos de aconselhamento.

À minha família, Laice e Diego, por estarem nos bastidores dessa caminhada, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

RESUMO

MOREIRA, C.S. **Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos**. 2019. 144p. Dissertação para obtenção do Título de Mestre – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O guia Q8(R2) do guia ICH descreve Qualidade por Design (QbD) como “uma abordagem sistemática para desenvolvimento farmacêutico que começa com objetivos predefinidos e enfatiza produto, entendimento e controle dos processos, baseado em dados científicos sólidos e gestão do risco da qualidade”. Os métodos analíticos são considerados parte integrante do desenvolvimento farmacêutico. Assim, a Qualidade por Design Analítico (AQbD) é justificável e recomendada para obter flexibilidade regulatória, reduzir os resultados fora de especificação, obter um alto grau de robustez e um método analítico econômico. O Planejamento de Experimentos (DoE) é um conjunto de ferramentas estatísticas que inclui delineamentos de triagem e otimização, no qual os fatores são sistematicamente variados para determinar seus efeitos nas respostas, o que permite a determinação de quais fatores são os mais significantes, a identificação de qual configuração de fatores resulta em respostas otimizadas e a identificação de interações entre os fatores. As abordagens QbD e AQbD permitem a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto farmacêutico e do método analítico, inclusive para reduzir a variabilidade do produto, melhorar o desempenho do processo, reduzir resultados fora da especificação, melhorar o desempenho analítico, entre outros. O Cloridrato de Verapamil foi escolhido como molécula teste para desenvolvimento do projeto. Na primeira etapa do estudo foi realizado uma triagem com 13 fatores e 20 experimentos, utilizando o delineamento Plackett-Burman, seguiu-se para a próxima etapa com 7 fatores e 16 experimentos através do delineamento fatorial fracionado (Res.: IV). A etapa de otimização foi realizada com 3 fatores e 20 experimentos utilizando o delineamento central composto. Após todas as etapas do estudo, as seguintes condições foram consideradas ideais: Fase móvel A – Tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0, Fase móvel B – Amoníaco 2,0% em acetonitrila, eluição do tipo gradiente, coluna cromatográfica XSelect CSH C18 (100mm x 4,6mm x 3,5 µm), fluxo de 0,7 mL/min, volume de injeção de 2 µL para teor e 10 µL para produtos de degradação. Os métodos desenvolvidos são robustos, validados e indicativos de estabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Qualidade por *Design* Analítico (AQbD), Desenvolvimento Analítico, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

ABSTRACT

MOREIRA, C.S. **Analytical Quality by Design (AQbD) applied in the development and optimization of chromatographic methods.** 2019. 144p. Dissertation for Master degree – Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

The ICH guide Q8 (R2) describes Quality by Design as "a systematic approach to pharmaceutical development that begins with predefined goals and emphasizes product, understanding and control of processes, based on solid scientific data and Quality Risk Management ". Analytical methods are considered an integral part of pharmaceutical development. Thus, the application of QbD approach to analytical method development is justifiable and a recommended strategy to attain regulatory flexibility, to reduce out-of-specification results, to achieve a high degree of robustness and a cost-effective analytical method. DoE is a set of statistical tools which include screening designs and optimization designs. In DoE approach, the controlled input factors are systematically varied to determine their effects on the output responses, which allows the determination of the most important input factors, the identification of input factors setting leading to optimized output responses, and the identification of interactions between input factors. The QbD and AQbD approach allows the continuous improvement throughout the lifecycle of pharmaceutical product and analytical method, including to reduce product variability, to improve process performance, to reduce out-of-specification results, to improve analytical performance, among others. Verapamil Hydrochloride was chosen as a test molecule for the development of the project. In the first phase of the study, a 13-factor and 20-experiment screening was performed using the Plackett-Burman design, followed by the 7-factor and 16-experiment next stage through fractional factorial design (Res. : IV). The optimization step was performed with 3 factors and 20 experiments using the composite central design. After performing all the study steps, the following conditions were considered ideal: Mobile Phase A - 10 mM ammonium formate buffer pH 3.0, Mobile Phase B - 2.0% ammonia in acetonitrile, gradient elution, column chromatographic XSelect CSH C18 (100mm x 4.6mm x 3.5 μ m), flow rate of 0.7ml / min, injection volume of 2 μ L for assay and 10 μ L for degradation products. The methods developed are robust, validated and stability indicating.

KEYWORDS: Analytical Quality by Design (AQbD); Analytical development; High Performance Liquid Chromatography.

SUMÁRIO

PARTE 1: Planejamento de Experimentos (DoE) aplicados à Qualidade por <i>Design</i> (QbD) e Qualidade por <i>Design</i> Analítico (AQbD).....	3
1. Introdução.....	3
2. Etapas do Qualidade por <i>Design</i> (QbD) e Qualidade por <i>Design</i> Analítico (AQbD)	5
2.1. Estabelecimento do Perfil de Qualidade Alvo do Produto (QTPP) / Perfil Analítico Alvo (ATP).....	5
2.2. Identificação de Atributos Críticos de Qualidade (CQA) / Características do Desempenho do Método Analítico (AMPC)	5
2.3. Planejamento de Experimentos (DoE)	6
2.3.1. Seleção do delineamento experimental	6
2.4. Definição da Região Operacional (DS) / Região de Operação do Método (MODR) .	14
2.5. Implementando estratégias para controle e melhoria contínua	15
2.5.1. Robustez e <i>System Suitability</i>	15
OBJETIVOS	19
PARTE 2: Desenvolvimento, Otimização e Validação de Método Cromatográfico para análise de Cloridrato de Verapamil em Comprimidos Revestidos.....	23
3. Introdução.....	23
4. Propriedades físico-químicas.....	24
5. Literatura disponível.....	26
6. Condições iniciais.....	28
7. Delineamentos Experimentais	31
7.1. Delineamento para Triagem – Parte I.....	31
7.1.1. Criação dos experimentos	32
7.1.2. Resultados e Discussão	34
7.1.3. Considerações Finais.....	54
7.2. Delineamento para Triagem – Parte II	56
7.2.1. Criação dos experimentos	57
7.2.2. Resultados e Discussão	58
7.2.3. Considerações Finais.....	82
7.3. Delineamento para Otimização	84
7.3.1. Respostas avaliadas	84
7.3.2. Criação dos experimentos	85
7.3.3. Resultados e Discussão	86
7.3.4. Definição do Método Analítico.....	97
8. Robustez e Definição de <i>System Suitability</i> por Quality by <i>Design</i>	107

8.1. Criação dos experimentos	108
8.2. Resultados e Discussão	109
8.2.1. Avaliação da Robustez	109
8.2.2. Definição do <i>System Suitability</i>	111
8.3. Conclusão.....	127
9. Validação Analítica	128
9.1. Procedimento.....	128
9.2. Resultados	129
9.2.1. Teor de Cloridrato de Verapamil.....	129
9.2.2. Produtos de Degradação.....	130
9.3. Conclusão.....	130
10. Degradação Forçada.....	131
CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de Pareto representando os efeitos principais (X1, X2 e X3) dos fatores (a) e efeitos principais (X1) e (X2) e efeitos de interação (X1*X2) dos fatores (b). Nesse caso, o efeito principal de X3 (a) é confundido com a interação X1 X2 (b).....	8
Figura 2. Gráfico fatorial de efeitos principais (a) e interações (b) dos fatores X1 e X2.....	9
Figura 3. Superfície de Resposta e Gráfico de Contorno para (a) linear, linear + interação (b), linear + termos quadráticos (c), e modelo completo (d).....	12
Figura 4. Regiões operacionais (branco) obtidas através de gráfico de contorno de resposta Y1 (a), gráfico de contorno de resposta Y2 (b), e do gráfico de contorno sobreposto das respostas Y1 e Y2 (c) como função dos fatores X1 e X2	14
Figura 5. Solubilidade do Cloridrato de Verapamil (mg/mL) em função do pH (18).....	26
Figura 6. Espectro de absorção UV do Verapamil.....	29
Figura 7. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R1.....	35
Figura 8. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R2.....	36
Figura 9. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R3.....	36
Figura 10. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R4.....	37
Figura 11. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R5.....	37
Figura 12. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R6.....	38
Figura 13. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R7.....	38
Figura 14. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R8.....	39
Figura 15. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R9.....	39
Figura 16. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R10.....	40
Figura 17. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R11.....	40
Figura 18. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R12.....	41
Figura 19. Gráficos: Normal e de Pareto para R1	42
Figura 20. Gráfico Fatorial para R1	42
Figura 21. Gráficos: Normal e de Pareto para R2	43
Figura 22. Gráfico Fatorial para R2	43
Figura 23. Gráficos: Normal e de Pareto para R3	44
Figura 24. Gráfico Fatorial para R3	44
Figura 25. Gráficos: Normal e de Pareto para R4	45
Figura 26. Gráfico Fatorial para R4	45
Figura 27. Gráficos: Normal e de Pareto para R5	46
Figura 28. Gráfico Fatorial para R5	46
Figura 29. Gráficos: Normal e de Pareto para R6	47
Figura 30. Gráfico Fatorial para R6	47

Figura 31. Gráficos: Normal e de Pareto para R7	48
Figura 32. Gráfico Fatorial para R7	48
Figura 33. Gráficos: Normal e de Pareto para R8	49
Figura 34. Gráfico Fatorial para R8	49
Figura 35. Gráficos: Normal e de Pareto para R9	50
Figura 36. Gráfico Fatorial para R9	50
Figura 37. Gráficos: Normal e de Pareto para R10	51
Figura 38. Gráfico Fatorial para R10	51
Figura 39. Gráficos: Normal e de Pareto para R11	52
Figura 40. Gráfico Fatorial para R11	52
Figura 41. Gráficos: Normal e de Pareto para R12	53
Figura 42. Gráfico Fatorial para R12	53
Figura 43. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R1.....	59
Figura 44. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R2.....	59
Figura 45. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R3.....	60
Figura 46. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R4.....	60
Figura 47. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R5.....	61
Figura 48. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R6.....	61
Figura 49. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R7.....	62
Figura 50. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R8.....	62
Figura 51. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R9.....	63
Figura 52. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R10.....	63
Figura 53. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R11.....	64
Figura 54. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R12.....	64
Figura 55. Gráficos: Normal e de Pareto para R1	65
Figura 56. Gráfico Fatorial para R1	65
Figura 57. Gráfico de Interações para R1.....	66
Figura 58. Gráficos: Normal e de Pareto para R2	67
Figura 59. Gráfico Fatorial para R2	67
Figura 60. Gráfico de Interações para R2.....	67
Figura 61. Gráficos: Normal e de Pareto para R3	68
Figura 62. Gráfico Fatorial para R3	68
Figura 63. Gráfico de Interações para R3.....	69
Figura 64. Gráficos: Normal e de Pareto para R4	69
Figura 65. Gráfico Fatorial para R4	70
Figura 66. Gráfico de Interações para R4.....	70
Figura 67. Gráficos: Normal e de Pareto para R5	71

Figura 68. Gráfico Fatorial para R5	71
Figura 69. Gráfico de Interações para R5.....	71
Figura 70. Gráficos: Normal e de Pareto para R6	72
Figura 71. Gráfico Fatorial para R6	72
Figura 72. Gráfico de Interações para R6.....	73
Figura 73. Gráficos: Normal e de Pareto para R7	74
Figura 74. Gráfico Fatorial para R7	74
Figura 75. Gráfico de Interações para R7.....	74
Figura 76. Gráficos: Normal e de Pareto para R8	75
Figura 77. Gráfico Fatorial para R8	75
Figura 78. Gráfico de Interações para R8.....	76
Figura 79. Gráficos: Normal e de Pareto para R9	77
Figura 80. Gráfico Fatorial para R9	77
Figura 81. Gráfico de Interações para R9.....	77
Figura 82. Gráficos: Normal e de Pareto para R10	78
Figura 83. Gráfico Fatorial para R10	78
Figura 84. Gráfico de Interações para R10.....	79
Figura 85. Gráficos: Normal e de Pareto para R11	79
Figura 86. Gráfico Fatorial para R11	80
Figura 87. Gráfico de Interações para R11.....	80
Figura 88. Gráficos: Normal e de Pareto para R12	81
Figura 89. Gráfico Fatorial para R12	81
Figura 90. Gráfico de Interações para R12.....	81
Figura 91. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R1	89
Figura 92. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R2.....	89
Figura 93. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R3.....	90
Figura 94. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R4.....	90
Figura 95. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R5.....	91
Figura 96. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R1	92
Figura 97. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R2	93
Figura 98. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R3	94
Figura 99. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R4	95
Figura 100. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R5	96
Figura 101. Gráfico de contorno para R1.....	97
Figura 102. Gráfico de superfície para R1	97
Figura 103. Gráfico de contorno para R2.....	98
Figura 104. Gráfico de superfície para R2	98

Figura 105. Gráfico de contorno para R3.....	99
Figura 106. Gráfico de superfície para R3	99
Figura 107. Gráfico de contorno para R4.....	100
Figura 108. Gráfico de superfície para R4	100
Figura 109. Gráfico de contorno para R5.....	101
Figura 110. Gráfico de superfície para R5	101
Figura 111. Gráfico de contorno sobreposto (pH x Concentração de amoníaco)	102
Figura 112. Cromatograma do método de teor otimizado – Padrão.....	104
Figura 113. Cromatograma do método otimizado – Mistura de padrões	105
Figura 114. Resultados do método otimizado – Mistura de padrões	106
Figura 115. Cromatograma do método otimizado – Mistura de padrões 0,1%	106
Figura 116. Resultados do método otimizado – Mistura de padrões 0,1%	106
Figura 117. Gráfico de contorno sobreposto (delimitação de área de trabalho).....	107
Figura 118. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para recuperação de teor..	110
Figura 119. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para recuperação de produtos de degradação.....	110
Figura 120. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para pratos teóricos.....	112
Figura 121. Gráfico fatorial de efeitos principais para pratos teóricos	113
Figura 122. Resultado da predição para pratos teóricos.....	113
Figura 123. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para assimetria.....	114
Figura 124. Gráfico fatorial de efeitos principais para assimetria.....	115
Figura 125. Resultado da predição para assimetria.....	115
Figura 126. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para tempo de retenção....	116
Figura 127. Gráfico fatorial de efeitos principais para tempo de retenção.....	117
Figura 128. Resultado da predição para tempo de retenção (inferior e superior)	117
Figura 129. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para pratos teóricos.....	120
Figura 130. Gráfico fatorial de efeitos principais para pratos teóricos	121
Figura 131. Resultado da predição para pratos teóricos.....	121
Figura 132. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para assimetria.....	122
Figura 133. Gráfico fatorial de efeitos principais para assimetria.....	123
Figura 134. Resultado da predição para assimetria.....	123
Figura 135. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para tempo de retenção...	124
Figura 136. Gráfico fatorial de efeitos principais para tempo de retenção.....	125
Figura 137. Resultado da predição para tempo de retenção (inferior e superior)	125
Figura 138. Cromatograma da amostra de degradação oxidativa	133
Figura 139. Cromatograma da amostra de degradação ácida.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamentos empregados na etapa de triagem.....	7
Tabela 2. Delineamentos empregados na etapa de otimização	10
Tabela 3. Características do ativo e das principais impurezas (17) (Continua)	24
Tabela 4. Métodos para Verapamil em comprimidos encontrados em monografias oficiais.....	27
Tabela 5. Métodos para Verapamil em comprimidos encontrados em literatura	27
Tabela 6. Respostas avaliadas no delineamento experimental	31
Tabela 7. Variáveis avaliadas no delineamento experimental.....	32
Tabela 8. Experimentos	33
Tabela 9. Resultados	34
Tabela 10. Respostas avaliadas no delineamento experimental.....	56
Tabela 11. Variáveis avaliadas no delineamento experimental.....	57
Tabela 12. Experimentos	58
Tabela 13. Resultados	58
Tabela 14. Respostas avaliadas no delineamento experimental	84
Tabela 15. Variáveis avaliadas no delineamento experimental.....	85
Tabela 16. Experimentos	85
Tabela 17. Resultados	86
Tabela 18. Resumo dos resultados de regressão	88
Tabela 19. Parâmetros avaliados	108
Tabela 20. Delineamento experimental.....	108
Tabela 21. Resultados de recuperação	109
Tabela 22. Resultados - teor	111
Tabela 23. Porcentagem de influência sobre a resposta pratos teóricos.....	112
Tabela 24. Experimento para predição para pratos teóricos.....	113
Tabela 25 . Porcentagem de influência sobre a resposta assimetria.....	114
Tabela 26. Experimento para predição para assimetria.....	115
Tabela 27. Porcentagem de influência sobre a resposta tempo de retenção.....	116
Tabela 28. Experimento para predição para tempo de retenção.....	117
Tabela 29. Definição de system suitability para o método de Teor	118
Tabela 30. Controle e Melhoria para o método de Teor	118
Tabela 31. Resultados – produtos de degradação.....	119
Tabela 32. Porcentagem de influência sobre a resposta pratos teóricos.....	120
Tabela 33. Experimento para predição para pratos teóricos.....	121
Tabela 34. Porcentagem de influência sobre a resposta assimetria.....	122
Tabela 35. Experimento para predição para assimetria.....	123

Tabela 36. Porcentagem de influência sobre a resposta tempo de retenção.....	124
Tabela 37. Experimento para predição para tempo de retenção.....	125
Tabela 38. Definição de system suitability para o método de produtos de degradação	126
Tabela 39. Controle e Melhoria para o método de Produtos de Degradação	126
Tabela 40. Resultados validação - Teor	129
Tabela 41. Resultados validação – Produtos de Degradação	130
Tabela 42. Condições de Degradação	131
Tabela 43. Perfil de degradação potencial.....	132
Tabela 44. Tabela dos resultados de Balanço de Massa.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC: Características do Desempenho do Método Analítico
ANOVA: Análise de Variância
AQbD: Qualidade por Design Analítico
ATP: Perfil Analítico Alvo
CCD: Delineamento Central Composto
CMA: Atributos Críticos de Material
CPP: Parâmetros Críticos de Processo
CQA: Atributos Críticos de Qualidade
DoE: Planejamento de Experimentos
DPR: Desvio Padrão Relativo
DS: Definição da Região Operacional
ICH: The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for
Pharmaceuticals for Human Use
MODR: Região de Operação do Método
OFAT: One Factor At Time
PAT: Tecnologia de Processo Analítico
QbD: Qualidade por Design
QM: Quadrados Médios
QTPP: Quality Target Product Profile
UV: Ultravioleta

PARTE 1: Planejamento de Experimentos (DoE) aplicados à Qualidade por *Design* (QbD) e Qualidade por *Design* Analítico (AQbD)

PARTE 1: Planejamento de Experimentos (DoE) aplicados à Qualidade por *Design* (QbD) e Qualidade por *Design* Analítico (AQbD)

1. Introdução

O guia Q8(R2) do guia ICH descreve o QbD como “uma abordagem sistemática para desenvolvimento farmacêutico que começa com objetivos predefinidos e enfatiza produto, entendimento e controle dos processos, baseado em dados científicos sólidos e gestão do risco da qualidade” (1).

O conceito de QbD na indústria farmacêutica foi introduzido para melhorar a robustez do processo de fabricação, a fim de garantir a qualidade do produto e a fabricação de produtos em termos da abordagem “seis-sigma”, termo designado para nomear um sistema de práticas desenvolvido para melhoria sistemática do processo, que reduz significativamente a chance de produtos fora de especificação (2).

Entretanto, a dificuldade em alcançar o desempenho “seis-sigma” pode estar, muitas vezes, relacionada à má qualidade e robustez dos métodos analíticos. Muitos pesquisadores relataram que assim como é feito para processos de fabricação, também existem oportunidades similares para aplicação do QbD para métodos analíticos (2), (3).

A Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) auxilia no desenvolvimento de métodos analíticos robustos e de baixo custo, que são aplicáveis durante todo ciclo de vida do produto. Além disso, fornece uma solução melhor para resultados fora de especificação e reduz a chance de falha do método (4), (5), (6).

A aplicação do conceito AQbD é justificável, devido às muitas variáveis que afetam significativamente os resultados do método, sendo a técnica cromatográfica a ferramenta analítica mais comum em controle de qualidade farmacêutico, o número de variáveis envolvidas na fase de desenvolvimento do método analítico é quase equivalente ao número de variáveis envolvidas na formulação, sendo elas: configurações do instrumento, características da amostra, parâmetros do método e modelos de calibração (7).

O desenvolvimento e a otimização de métodos analíticos têm sido realizados, tradicionalmente, analisando uma variável por vez (abordagem OFAT – *One Factor At Time*), o que gera um alto número de experimentos e não permite que seja avaliada a

existência de interação entre os fatores, que pode levar a uma condução equivocada do desenvolvimento e otimização (4), (5), (6).

O DoE é um conjunto de ferramentas estatísticas que inclui planejamentos de triagem e otimização, que pode fornecer melhores resultados com número reduzido de experimentos (4), (5), (6).

A base de qualquer método analítico desenvolvido através dos princípios do AQbD é o Analytical Target Profile (ATP), que é semelhante à Quality Target Product Profile (QTPP), como define o guia ICH Q8 (R2). O conselho de especialistas da USP (United States Pharmacopeia) define ATP em seus artigos como “os requisitos para o “produto” do procedimento em teste, que nesse caso é o resultado reportado” ou “o objetivo do teste e os requisitos da qualidade, incluindo o nível de confiança esperado para o resultado reportado que permite a conclusão correta para ser desenhada em relação aos atributos do material que está sendo medido” (8).

O ATP não é limitado somente ao desenvolvimento de método, mas deve ser utilizado também durante a transferência de métodos e durante todo o ciclo de vida do produto. Dentro do ATP, as características de performance do método são usualmente os parâmetros de validação como seletividade, precisão, exatidão, linearidade, dentre outros. Estes parâmetros são a medida da capacidade do método produzir resultados que são adequados ao fim a que se destina (9).

O QbD compreende todos os elementos do desenvolvimento farmacêutico, o que permite o entendimento completo do produto e do seu processo de fabricação, garantindo assim a sua segurança e eficácia (10), (11), (12). Os métodos analíticos são considerados parte integrante do desenvolvimento farmacêutico (7). Desta forma, justifica-se a aplicação da abordagem QbD e DoE no desenvolvimento de tais procedimentos. Além disso, essa é uma estratégia recomendada para obter flexibilidade regulatória, reduzir os resultados fora de especificação, obter um alto grau de robustez e um método analítico econômico (2), (7).

2. Etapas do Qualidade por *Design* (QbD) e Qualidade por *Design* Analítico (AQbD)

2.1. Estabelecimento do Perfil de Qualidade Alvo do Produto (QTPP) / Perfil Analítico Alvo (ATP)

O QTPP é um resumo das características de qualidade do produto farmacêutico que deve ser alcançado para garantir segurança e eficácia, ou seja, consiste na definição de expectativas para o produto farmacêutico final (10), (12).

A abordagem AQbD começa com a definição do ATP, o qual define o objetivo do método analítico, que conduzirá as atividades de seleção, delineamento e desenvolvimento do método (2), (3).

Os principais objetivos de um novo produto ou método devem ser definidos antes de seu desenvolvimento. Entretanto, ao longo dos anos, essa abordagem dificilmente foi adotada. Um QTPP ou ATP bem definido evita desperdício de tempo e recursos (12).

2.2. Identificação de Atributos Críticos de Qualidade (CQA) / Características do Desempenho do Método Analítico (AMPC)

A identificação dos CQA é o próximo passo no QbD farmacêutico. Os CQA são propriedades químicas, físicas, biológicas ou microbiológicas, ou características do produto farmacêutico que devem estar dentro das especificações apropriadas para garantir sua qualidade. Os CQA podem incluir identificação, teor, uniformidade, produtos de degradação, solventes residuais, dissolução do fármaco, limites microbianos e propriedades físicas como cor, forma, tamanho e friabilidade (10), (11).

Os Atributos Críticos de Material (CMA) consistem em propriedades físicas, químicas, biológicas ou microbiológicas que o material de entrada deve cumprir para garantir os CQA desejados. Por outro lado, os Parâmetros Críticos de Processo (CPP) são parâmetros do processo, tais como velocidade e tempo de agitação, temperatura de secagem, dentre outros parâmetros que podem afetar os CQA desejados.

As AMPC são definidas para atender às necessidades do ATP e podem ser classificadas em duas categorias, de acordo com a fonte de erro: a) variabilidade sistemática (viés), que inclui exatidão, seletividade e linearidade; e b) variabilidade aleatória (aleatória), que inclui precisão, limite de detecção e limite de quantificação (2), (7).

2.3. Planejamento de Experimentos (DoE)

O DoE é um método estruturado e organizado para determinar as relações entre fatores (x_i - variáveis independentes) que afetam uma ou mais respostas (y - variáveis dependentes), através do estabelecimento de modelos matemáticos ($y = f(x_i)$). No DoE, os fatores são sistematicamente variados para determinar seus efeitos nas respostas, o que permite a determinação de quais fatores são os mais significantes, a identificação de qual configuração de fatores resulta em respostas otimizadas e a elucidação de interações entre os fatores (4), (6).

2.3.1. Seleção do delineamento experimental

Para selecionar o melhor delineamento experimental devem ser considerados vários aspectos como os objetivos definidos, o número de fatores e suas possíveis interações, a validade estatística e eficácia de cada delineamento. Os delineamentos experimentais podem ser divididos em dois tipos: a) Delineamentos de triagem e b) Delineamentos de otimização (4), (6).

2.3.1.1. Delineamentos de Triagem

As principais ferramentas de triagem são: Delineamento Fatorial Fracionado, Delineamento Fatorial Completo (2 níveis) e Plackett-Burman, que podem ser selecionadas levando em consideração o número de variáveis envolvidas para investigação, conforme os critérios da Tabela 1. A vantagem desse tipo de delineamento

é que ele permite estudar um grande número de fatores com um número reduzido de experimentos. Entretanto, eles também têm limitações que devem ser consideradas para melhor entendimento dos efeitos dos fatores nas respostas (4), (5), (6).

Tabela 1. Delineamentos empregados na etapa de triagem

Delineamento	Fatores		Res	Números de experimentos
	Tipo	Número		
Fatorial completo (2 níveis)	Numérico Texto	$2 \leq k \leq 5$	-	2^k
Fatorial fracionado (2 níveis)	Numérico Texto	> 4	III ou $>$	2^{k-p}
Plackett-Burman	Numérico Texto	N-1	III	N (múltiplo de 4)

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

Os delineamentos fatoriais completos de dois níveis são as ferramentas de triagem mais poderosas, pois permitem estimar os efeitos principais dos fatores e a interação destes sobre as respostas. A principal desvantagem é a necessidade de um grande número de experimentos, quando comparados com delineamentos fatoriais fracionados ou Plackett-Burman (4), (5), (6).

Os delineamentos fatoriais fracionados são os mais amplamente utilizados para triagem, pois permitem a avaliação de um grande número de fatores com um número reduzido de experimentos (4), (5), (6).

Esse é o delineamento ideal quando o número de fatores é maior que 4, porém deve ser dada atenção à estimativa dos efeitos principais dos fatores e efeitos da interação entre os fatores, pois alguns deles podem ser confundidos. Os delineamentos fatoriais fracionados com resolução V podem apresentar os efeitos principais confundidos com interações de 4ª ordem e interações de 2ª ordem com interações de 3ª ordem. Em delineamentos fatoriais fracionados com resolução IV, os efeitos principais podem ser confundidos com interações de 3ª ordem e interações de 2ª ordem podem ser confundidas com interações de 3ª ordem. Já em delineamentos fatoriais fracionados com resolução III,

os efeitos principais podem ser confundidos com interações de 2ª ordem, como pode ser exemplificado na Figura 1, em que X3 é confundido com a interação entre X1 e X2.

Figura 1. Gráfico de Pareto representando os efeitos principais (X1, X2 e X3) dos fatores (a) e efeitos principais (X1) e (X2) e efeitos de interação (X1*X2) dos fatores (b). Nesse caso, o efeito principal de X3 (a) é confundido com a interação X1 X2 (b)

Os delineamentos de Plackett-Burman são tipos especiais de delineamentos fatoriais fracionados de 2 níveis e resolução III, que permitem estudar até N-1 fatores com N experimentos, sendo que N deve ser múltiplo de 4. A principal vantagem desse tipo de delineamento é a possibilidade de avaliar um grande número de fatores com um número muito reduzido de experimentos (4), (5), (6).

Os delineamentos de triagem são muito usados na primeira etapa do DoE para selecionar quais os fatores mais relevantes e descartar os insignificantes. Para esse objetivo, os gráficos de Pareto são ferramentas úteis que permitem colocar os fatores e suas interações em ordem de importância. Entretanto, quando um delineamento fatorial

fracionado for utilizado deve-se analisar o gráfico com atenção. No exemplo da Figura 1a conclui-se que o fator X1 é o mais importante, seguido por X3 e X2, mas na realidade o efeito principal do fator X3 foi confundido com a interação entre os fatores X1 e X2 (Figura 1b) (13).

No entanto, informações sobre como as respostas são afetadas pela variação do nível do fator não são fornecidas pelos gráficos de Pareto. Os gráficos fatoriais de efeitos principais e interação podem ser usados para essa finalidade, como pode ser visto na Figura 2. Nesse exemplo, a resposta aumenta variando o fator X1 de baixo (-1) para alto (+1) (Figura 2a). Além disso, a resposta aumenta significativamente variando o fator X1 de baixo (-1) para alto (+1) com o fator X2 fixo no nível baixo (-1) (linha preta), enquanto a resposta permanece quase constante variando o fator X1 de baixo (-1) para alto (+1) com o fator X2 fixo no nível alto (+1) (linha cinza) (Figura 2b). Desse modo, os gráficos fatoriais de efeitos de interação também são úteis para identificar sinergismo ou antagonismo entre fatores e respostas (13).

Figura 2. Gráfico fatorial de efeitos principais (a) e interações (b) dos fatores X1 e X2

2.3.1.2. 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 respostas complexas. Uma das limitações mais importantes dos delineamentos de triagem é que eles permitem somente modelar a superfície resposta linear (1ª ordem), pois consideram apenas dois níveis para cada fator. Já os delineamentos de otimização usam de 3 a 5 níveis para cada fator, o que possibilita a modelagem da superfície resposta de 2ª ordem (quadrática) (4), (5), (6).

No entanto, devido ao aumento do número de experimentos necessários, eles geralmente são usados para estudar um número reduzido de fatores, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Delineamentos empregados na etapa de otimização

Delineamento	Fatores		Números de experimentos
	Tipo	Níveis	
Central composto (CCD)	Numérico	5	$2^k + 2k + C_p$
	Texto		
Box-Behnken (BBD)	Numérico	3	$2k(k-1) + C_p$
	Texto		
Fatorial completo (3 níveis)	Numérico	3	3^k
	Texto		

k = número de fatores C_p : 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 (4), (5), (6), (13).

O Delineamento Central Composto (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 (4), (5), (6), (13).

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 (4), (5), (6), (13).

O modelo mais simples que pode ser ajustado é baseado em uma função linear, ou seja, a resposta deve ter uma superfície resposta linear, como pode ser visto na Figura 3a, esse delineamento pode ser ajustado com base em resultados obtidos por, pelo menos, um delineamento fatorial fracionado com resolução IV ou superior (13).

Para avaliar as interações entre os fatores é necessário pelo menos um delineamento fatorial completo de 2 níveis. Esse modelo pode ser ajustado baseado em uma função linear + interações. A superfície resposta obtida com esse tipo de modelo pode ser na Figura 3b (13).

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, como é apresentado na Figura 3c (13).

Para melhor ajuste do delineamento, pode ser necessário adotar um modelo completo, com termos lineares + interações + termos quadráticos. A superfície resposta obtida nesse caso pode ser vista na Figura 3d (13).

Figura 3. Superfície de Resposta e Gráfico de Contorno para (a) linear, linear + interação (b), linear + termos quadráticos (c), e modelo completo (d)

O modelo matemático deve ser selecionado com base na análise de variância (ANOVA). A ANOVA compara a variabilidade devido ao tratamento (variando o nível dos fatores) com a variabilidade devido ao erro residual. Partindo desta comparação, é possível avaliar qual a significância do modelo de regressão. A análise de regressão somente é válida se os resíduos, obtidos pela diferença entre a resposta prevista pelo modelo matemático e a resposta experimental, apresentam distribuição normal e homocedasticidade. Se for necessário, pode-se usar uma transformação do tipo Box-Cox das respostas para melhorar a normalidade e homocedasticidade dos resíduos (4), (5), (6), (13).

Baseado na ANOVA, pode-se decidir incluir ou excluir os coeficientes de termos lineares, termos de interação e termos quadráticos. O que determina se um coeficiente

será incluído ou excluído no modelo de regressão é o seu p-valor. Se o p-valor for menor do que 0,05, o coeficiente deve ser incluído no modelo. Isso significa que esse coeficiente é significativamente diferente de 0, ou seja, a resposta será afetada pela variação dos níveis desse fator. Por outro lado, se o p-valor for maior que 0,05, significa que a resposta não é afetada pela variação dos níveis do fator e este termo da regressão pode ser excluído do modelo de regressão (13).

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, ou seja, quanto da resposta (Y) é explicada pelos fatores (Xs). Entretanto, o aumento de termos do modelo de regressão sempre aumentará o R^2 . Sendo assim, esta não é uma boa maneira de comparar modelos de regressão com diferentes números de termos. O $R^2_{ajustado}$ é uma versão modificada do R^2 , que é ajustada para o número de termos no modelo de regressão. O $R^2_{ajustado}$ aumentará apenas se o novo termo melhorar o modelo de regressão e diminuirá se o novo termo não melhorar o modelo de regressão. Dessa forma, o $R^2_{ajustado}$ permite comparar modelos de regressão que contêm diferentes números de termos. 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. O R^2 é sempre maior do que o $R^2_{ajustado}$ e $R^2_{predição}$ (13).

Além disso, deve-se comparar a variabilidade devido à falta de ajuste do modelo de regressão com a variabilidade devido ao erro puro aleatório, com a finalidade de avaliar o ajuste do modelo de regressão. O modelo de regressão está mal ajustado quando o erro fornecido pela falta de ajuste do modelo de regressão é significativamente maior do que o erro puro aleatório (p-valor menor que 0,05). O modelo de regressão está bem ajustado quando o erro devido à falta de ajuste do modelo de regressão é significativamente menor que o erro puro aleatório (p-valor maior que 0,05). Só é possível estimar o erro devido à falta de ajuste do modelo quando o delineamento experimental inclui réplicas, comumente obtidas para o ponto central (13).

2.4. Definição da Região Operacional (DS) / Região de Operação do Método (MODR)

DS é uma combinação multidimensional e interação de fatores (geralmente CMA e CPP) que comprovadamente fornecem garantia de qualidade e consequentemente, segurança e eficácia. A mudança dos fatores nas regiões do DS não é considerada uma modificação sujeita a notificação, o que garante flexibilidade regulatória (12).

No AQbD, MODR é a combinação multidimensional e a interação de condições analíticas que demonstraram fornecer garantia do desempenho do método analítico para as respostas avaliadas, por exemplo a resolução entre dois picos (7).

A região operacional pode ser obtida através de gráficos de contorno sobrepostos de respostas (Ys) como funções de fatores (Xs), como é visto na Figura 4. Alternativamente, a otimização de múltiplas respostas pode ser estimada por técnicas numéricas de funções de desejabilidade. As funções de desejabilidade geralmente são usadas para atingir diferentes critérios, por exemplo, para maximizar, minimizar ou otimizar as respostas de saída frente a um alvo (5).

Figura 4. Regiões operacionais (branco) obtidas através de gráfico de contorno de resposta Y_1 (a), gráfico de contorno de resposta Y_2 (b), e do gráfico de contorno sobreposto das respostas Y_1 e Y_2 (c) como função dos fatores X_1 e X_2

2.5. Implementando estratégias para controle e melhoria contínua

É necessária uma estratégia para controle para garantir que os CMA e os CPP estejam dentro dos limites esperados. Obviamente, o espaço de controle deve estar dentro da região de operação (10). A Tecnologia de Processo Analítico (PAT) é uma ferramenta importante na implementação de estratégias para controle, uma vez que permite testes de liberação em tempo real e fornece um alto nível de garantia de qualidade em comparação com testes convencionais no produto final. Os modelos preditivos também podem ser usados como uma alternativa ao teste de liberação convencional (12), (11).

No AQbD, a estratégia de controle é derivada dos dados coletados durante o desenvolvimento e validação do método, o que permite prever a capacidade do método para atender o ATP (2). O monitoramento contínuo do desempenho do método permite detectar, identificar e direcionar o desempenho fora da tendência do método analítico (2).

As abordagens QbD e AQbD permitem a melhoria contínua ao longo do ciclo de vida do produto farmacêutico e do método analítico, inclusive para reduzir a variabilidade do produto, melhorar o desempenho do processo, reduzir resultados fora da especificação, melhorar o desempenho analítico, entre outros.

2.5.1. Robustez e *System Suitability*

A robustez de um procedimento analítico pode ser definida como a medida da capacidade deste de não ser afetado por pequenas e deliberadas variações nos seus parâmetros, fornecendo uma indicação de sua confiabilidade durante o uso em condições normais (14).

As diretrizes do ICH recomendam que os parâmetros de *system suitability* sejam estabelecidos através dos resultados da robustez para garantir que o procedimento analítico esteja adequado sempre que for utilizado (14).

O teste de robustez foi considerado por muito tempo como integrante da validação do método, porém essa abordagem envolve o risco de se descobrir tardiamente que o método não é robusto e todos os testes feitos até então serem perdidos, já que o método precisará ser desenvolvido novamente (15).

O teste de robustez realizado utilizando o DoE examina e identifica as possíveis fontes de variabilidade em uma ou várias respostas do método, sendo parte do desenvolvimento do procedimento analítico. A amplitude da variação dos parâmetros do método deve ser definida de acordo a MODR, pois a região de teste de robustez deve estar contida na MODR (15).

Para esse tipo de avaliação o ideal é a utilização de um delineamento de triagem de 2 níveis, que permite avaliar um grande número de fatores com um número relativamente pequeno de experimentos. Sendo o delineamento de Plackett-Burman o mais indicado, já que na robustez o interesse está apenas na avaliação dos efeitos principais dos fatores (15).

Primeiramente, deve-se avaliar a recuperação do ativo. Para o método ser considerado robusto nenhum parâmetro analítico avaliado pode ser considerado relevante para essa resposta. Além disso, as outras respostas avaliadas são os parâmetros de *system suitability* propostos para o método. Essa abordagem permite que os fatores que podem prejudicar o desempenho do procedimento sejam mapeados e controlados. Além disso, determinar os limites de *system suitability* a partir de dados experimentais e não arbitrariamente, possibilita que esses critérios sejam usados para o controle adequado do método (15).

OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é aplicar os conceitos de Qualidade por *Design* Analítico (AQbD) no desenvolvimento, otimização e validação de método indicativo de estabilidade para teor e substâncias relacionadas para o produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos. Dentre os objetivos específicos destacamos:

- a) Identificar quais as condições analíticas relevantes (composição da fase móvel, pH da fase móvel, tipo de coluna cromatográfica, fluxo da fase móvel, dentre outras condições) que afetam as respostas cromatográficas de interesse (tempo de retenção, resolução entre os picos, relação sinal ruído, dentre outras respostas);
- b) Estabelecer modelos matemáticos que estabelecem como as respostas cromatográficas são explicadas pelas condições analíticas relevantes e definir a região de operação do método analítico (MODR – *Method Operable Design Region*) para os métodos de teor e substâncias relacionadas;
- c) Avaliar a robustez dos métodos de teor e substâncias relacionadas do produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos, assim como definir os critérios do *System Suitability*;
- d) Validar os métodos de teor e substâncias relacionadas, avaliando-se os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão;
- e) Realizar estudo de degradação forçada e balanço de massas para o produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos, em condições de estresse térmico (seca e úmida), degradação oxidativa, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, degradação com íons metálicos e fotólise.

**PARTE 2: Desenvolvimento, Otimização e Validação de Método Cromatográfico
para análise de Cloridrato de Verapamil em Comprimidos Revestidos**

PARTE 2: Desenvolvimento, Otimização e Validação de Método Cromatográfico para análise de Cloridrato de Verapamil em Comprimidos Revestidos

3. Introdução

O método analítico desenvolvido por AQbD deve ser capaz de quantificar o ativo e suas impurezas provenientes de degradação. Além disso, deve ser controlável, confiável e robusto.

Para desenvolver o projeto, o Cloridrato de Verapamil foi escolhido como molécula teste. Esse ativo é um bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem, que também tem atividade antiarrítmica. O seu efeito sobre os canais de cálcio do tipo L no coração provoca uma redução na ionotropia e na cronotropia, o que reduz a frequência cardíaca e a pressão sanguínea. Acredita-se que o mecanismo de ação do Cloridrato de Verapamil na cefaleia esteja ligado ao seu efeito bloqueador dos canais de cálcio, mas os subtipos de canais envolvidos não são conhecidos atualmente (16), (17).

Além disso, o ativo é destinado ao tratamento de falta de oxigênio (isquemia) para o músculo do coração: sem angina (dor no peito); com angina após esforço; angina em repouso e hipertensão arterial (pressão alta) leve e moderada (16).

O Cloridrato de Verapamil é quimicamente designado como hydrogen 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl](methyl)amino]-2-(propan-2-yl)pentanenitrile chloride, sua massa molecular é de 491,07g/mol, é solúvel em água e muito solúvel em soluções ácidas, livremente solúvel em clorofórmio, ligeiramente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em éter (17), (18).

Para definir as condições iniciais do método analítico foi realizado um levantamento bibliográfico das propriedades físico-químicas do ativo e de suas impurezas conhecidas e de metodologias analíticas para teor e produtos de degradação em *sites* especializados, compêndios oficiais e literatura científica.

As características físico-químicas das moléculas em estudo também podem ser usadas para definir as condições cromatográficas iniciais. O pKa é utilizado para definir qual o pH indicado para o método, sendo que o ideal é utilizar um valor de pH que seja pelo menos 2 unidades distante do pKa da molécula, ou seja, a molécula deve estar

totalmente na sua forma molecular ou ionizada, dependendo do tipo de coluna cromatográfica que será utilizada (19).

4. Propriedades físico-químicas

Considerando as características físico-químicas do Cloridrato de Verapamil e suas principais impurezas conhecidas, apresentadas na Tabela 3, tem-se que o pH abaixo de 5,0 é ideal, pois em todos os casos as moléculas estão 100% em uma única forma.

Além disso, avaliando o gráfico de solubilidade do ativo (mg/mL) em função do pH, pode-se concluir que o ideal seria utilizar um pH abaixo de 5,0 também para o diluente, pois a solubilização é máxima abaixo desse pH, como pode ser visto na Figura 5.

Tabela 3. Características do ativo e das principais impurezas (18)

Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	Log D x pH	
						pH	logD
Cloridrato de Verapamil	152-11-4		$C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$	491,2598354	9,68	1,7	1,54
						4,6	1,55
						6,5	2,03
						7,4	2,79
						8,0	3,36
<i>Impureza A EP</i> N,N'-bis[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-N,N'-dimethylpropane-1,3-diamine	63434-11-7		$C_{25}H_{38}N_2O_4$	430,2831577	9,61 7,19	1,7	-3,33
						4,6	-2,36
						6,5	-0,06
						7,4	1,27
						8,0	1,99
<i>Impureza B EP</i> 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methylethanamine	3490-06-0		$C_{11}H_{17}NO_2$	195,1259288	10,07	1,7	-1,74
						4,6	-1,73
						6,5	-1,57
						7,4	-1,06
						8,0	-0,54
<i>Impureza C EP</i> 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-N,N-dimethylethanamine	51012-67-0		$C_{12}H_{19}NO_2$	209,1415788	9,17	1,7	-1,61
						4,6	-1,58
						6,5	-0,72
						7,4	0,12
						8,0	0,69

Tabela 3 (Continuação). Características do ativo e das principais impurezas (18)

Tabela 3 (Continuação): Características do ativo e das principais impurezas (16)													
Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	Log D x pH							
						pH	logD						
<i>Impureza D EP</i> 3-chloro-N-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-N-methylpropan-1-amine						1,7	-0,89						
						4,6	-0,80						
						6,5	0,39						
						7,4	1,25						
						8,0	1,79						
						<i>Impureza E EP</i> (3,4-dimethoxyphenyl)methanol							
						1,7	0,89						
						4,6	0,89						
						6,5	0,89						
						7,4	0,89						
						8,0	0,89						
						<i>Impureza G EP</i> 3,4-dimethoxybenzaldehyde						1,7	1,37
4,6	1,37												
6,5	1,37												
7,4	1,37												
						8,0	1,37						
						<i>Impureza H EP</i> (2RS)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl](methylamino)-2-ethylpentanenitrile						1,7	1,25
												4,6	1,27
												6,5	1,75
												7,4	2,50
						8,0	3,08						
						<i>Impureza J EP</i> (2RS)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]amino]-2-(1-methylethyl)pentanenitrile						1,7	1,42
												4,6	1,42
6,5	1,53												
7,4	1,93												
						8,0	2,41						
						<i>Impureza K EP</i> (2RS)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-methylbutanenitrile						1,7	2,63
												4,6	2,63
												6,5	2,63
												7,4	2,63
						8,0	2,63						
						<i>Impureza M EP</i> 5,5'-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]imino]bis[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(1-methylethyl)pentanenitrile]						1,7	4,70
												4,6	4,70
6,5	4,89												
7,4	5,44												
						8,0	5,97						

Tabela 3 (Continuação). Características do ativo e das principais impurezas (18)

Nome	CAS	Fórmula estrutural	Fórmula molecular	Massa exata	pKa	Log D x pH	
						pH	logD
Impureza O EP						1,7	1,70
(2RS)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl](methylamino)-2-propylpentanenitrile	959011-16-6		C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454,2831577	9,68	4,6	1,71
						6,5	2,19
						7,4	2,95
						8,0	3,52
Impureza P EP						1,7	6,35
2,6-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-2,6-bis(1-methylethyl)-heptane-1,7-dinitrile	-		C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₄	478,2831577	N/A	4,6	6,35
						6,5	6,35
						7,4	6,35
						8,0	6,35

N/A: não aplicável, não há átomos ionizáveis.

Figura 5. Solubilidade do Cloridrato de Verapamil (mg/mL) em função do pH (18)

5. Literatura disponível

Através da pesquisa bibliográfica realizada em artigos científicos, *sites* especializados e monografias oficiais do Cloridrato de Verapamil foram encontradas algumas metodologias analíticas, como se vê na Tabela 4 e Tabela 5.

Optou-se por mesclar os métodos encontrados em literatura e fazer algumas alterações adequadas para iniciar o estudo. Os métodos presentes em monografias oficiais

não foram considerados, pois não são compatíveis com a técnica de espectrometria de massas.

Tabela 4. Métodos para Verapamil em comprimidos encontrados em monografias oficiais

Parâmetros	Farmacopeia Britânica (20)	Farmacopeia Americana (21)
Fase Móvel	Fosfato de potássio dibásico 0,04M pH 7,2 (FMA) : acetonitrila (FMB)	Acetonitrila, 2-aminoheptano e tampão acetato de sódio/ácido acético (300:5:700)
Diluyente	FMA : FMB (63 : 37, v/v)	Fase Móvel
Coluna	End-capped polar-embedded octadecylsilyl amorphous organosilica polymer (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)* ¹	L1* ² (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Condição	Gradiente	Isocrática
Fluxo	1,5 mL/min	0,9 mL/min
Tempo	35 minutos	4 vezes o tempo de retenção do Verapamil
Injeção	10 µL	10 µL
Temperatura	25°C	25°C
Deteção	278 nm	278 nm

*¹: XTerra RP18.

*²: L1: coluna de fase reversa C18.

Tabela 5. Métodos para Verapamil em comprimidos encontrados em literatura

Parâmetros	Referência (22)	Referência (23)
Fase Móvel	Mistura de formiato de amônio 10 mM e ácido fosfórico (1000 : 1, v/v) : Mistura de água, acetonitrila e ácido fosfórico (300 : 700 : 1, v/v)	Fosfato de potássio dibásico 0,04M pH 7,2 : Acetonitrila
Diluyente	Água : Acetonitrila (90 : 10, v/v)	Fosfato de potássio dibásico 0,04M pH 7,2
Coluna	Shimpak XR ODS (75 mm x 3,0 mm x 1,7 µm)	Suplex pkb-100 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Condição	Gradiente	Gradiente
Fluxo	0,5 mL/min	1,5 mL/min
Tempo	20 minutos	50 minutos
Injeção	1 µL	10 µL
Temperatura	50°C	25°C
Deteção	278 nm	278 nm

Tabela 5 (Continuação). Métodos para Verapamil em comprimidos encontrados em literatura

Parâmetros	Referência (24)	Referência (25)
Fase Móvel	Acetato de Amônio 10 Mm pH 5,5 e 0,02% de TEA em Acetonitrila	Acetonitrila e tampão trietilamina pH 3,0 (40:60)
Diluyente	Não menciona	Não menciona
Coluna	XBridge C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)	Inertsil ODS-3V (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Condição	Gradiente	Não menciona
Fluxo	1,0 mL/min	1,3 mL/min
Tempo	Não menciona	Não menciona
Injeção	Não menciona	Não menciona
Temperatura	Não menciona	Não menciona
Deteção	230 nm	216 nm

TEA: Trietilamina

6. Condições iniciais

Como foi visto no item 4, o pH da fase móvel deve ser menor que 5,0 para todas as moléculas estarem 100% em uma única forma. Sendo assim, foi utilizado o tampão acetato de amônio 10 mM pH 4,8 para iniciar os estudos (26).

Além disso, optou-se por trocar a trietilamina por solução de amoníaco, visto que os dois reagentes desempenham a mesma função no método analítico (melhorar a simetria do pico), sendo a solução de amoníaco mais adequada à técnica de espectrometria de massas (27), (28). Uma solução 0,05% de amoníaco em acetonitrila foi escolhida como fase móvel B inicial.

Devido à ausência de descrição do gradiente em todos os métodos, optou-se por utilizar um gradiente genérico iniciando com alta porcentagem de solução aquosa e aumento gradual da fase móvel orgânica, com a finalidade de separar todos os picos com adequada seletividade (29).

Um dos métodos encontrados em literatura (24) utilizou a coluna XBridge C18 (150mm x 4,6mm x 5µm), portanto a coluna similar XSelect CSH C18 (100mm x 4,6mm x 3,5µm) foi escolhida para iniciar os estudos. Optou-se por uma coluna menor com o objetivo de otimizar o tempo de corrida, além disso a coluna escolhida possui tamanho de partícula de 3,5 µm, o que aumenta a sua seletividade quando comparada com colunas de partículas maiores (30).

Através de varredura no UV do Verapamil (Figura 6) foi possível observar pico de absorvidade em 280 nm, condizente com o comprimento de onda empregado na maioria dos métodos analíticos encontrados em literatura e monografias (278 nm).

Figura 6. Espectro de absorção UV do Verapamil

Com base na avaliação descrita anteriormente, propôs-se o método descrito a seguir como condição inicial do estudo:

Solução Acetato Amônio 10 mM:

Pesar cerca de 0,77 de acetato de amônio em um béquer de 2 L, adicionar 1 L de água purificada e agitar até dissolver. Homogeneizar e acertar o pH para 4,8 com ácido acético ou amoníaco em solução 25%. Homogeneizar e filtrar através de membrana 0,45 µm.

Amoníaco 0,05% em Acetonitrila:

Em um béquer de 2 L, adicionar 1000 mL de Acetonitrila e 0,5 mL de solução de amoníaco 25%. Homogeneizar e não filtrar

Diluyente:

Tampão acetato de amônio 10 mM pH 4,8 e Metanol (70:30).

Fase Móvel A:

Tampão acetato de amônio 10 mM pH 4,8.

Fase Móvel B:

Amoníaco 0,05% em Acetonitrila.

Solução padrão:

Pesar 10 mg de Cloridrato de Verapamil padrão e transferir para um balão volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL do diluente. Agitar em banho de ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o diluente, homogeneizar e filtrar para vial de HPLC.

Solução amostra – Cloridrato de Verapamil 80 mg

Pesar 140 mg da amostra (equivalente a 40 mg de Cloridrato de Verapamil) para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL do diluente, agitar em banho de ultrassom por 30 minutos e mecanicamente por mais 30 minutos. Completar o volume com o diluente, homogeneizar e filtrar para vial de HPLC.

Condições cromatográficas:

Coluna: XSelect CSH C18 (100 mm x 4,6 mm x 3,5µm)

Detector: UV a 278nm

Temperatura: 25°C

Volume de injeção: 2 µL

Fluxo: 1,0 mL/min

Eluição: Gradiente

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
6	50	50
8	10	90
12	10	90
12,1	90	10
15	90	10

7. Delineamentos Experimentais

7.1. Delineamento para Triagem – Parte I

Durante a primeira etapa de triagem o objetivo foi avaliar a relevância (significância) dos fatores em relação às respostas de interesse (R1 a R12), para prosseguir para a próxima etapa apenas com os fatores significativos para o desenvolvimento do método analítico.

Tabela 6. Respostas avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Resposta	Tipo de Amostra
R1	Assimetria	Padrão de teor
R2	Pratos Teóricos	Padrão de teor
R3	Pureza	Padrão de teor
R4	Fator capacidade	Mistura de padrões de impureza e ativo
R5	Resolução impurezas 2 e 3	Mistura de padrões de impureza e ativo
R6	Resolução impurezas 3 e 4	Mistura de padrões de impureza e ativo
R7	Resolução ativo e impureza anterior a ele	Mistura de padrões de impureza e ativo
R8	Resolução ativo e impureza posterior a ele	Mistura de padrões de impureza e ativo
R9	Resolução impureza O e P	Mistura de padrões de impureza e ativo
R10	Assimetria impureza M	Mistura de padrões de impureza e ativo
R11	Sinal ruído impureza G	Mistura de padrões de impureza 0,1%
R12	Diferença entre o tempo de retenção da impureza oxidativa e impureza conhecida mais próxima	Mistura de padrões de impureza e ativo Amostra de degradação oxidativa

Ref. = Referência

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental por Plackett-Burman com 13 fatores e 2 níveis, no qual foi possível avaliar inúmeras variáveis e determinar suas significâncias em relação as respostas.

7.1.1. Criação dos experimentos

Tabela 7. Variáveis avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Nome	Unidade	Inferior	Superior
A	Tipo do Tampão	-	Acetato	Formiato
B	Concentração do Tampão	mM	1	10
C	pH do Tampão	Numérico	3,8	4,8
D	Tipo de modificador	-	Acetonitrila	Metanol
E	Concentração de amoníaco	%	0,05	0,5
F	Coluna	-	A	B
G	Temperatura da coluna	°C	25	45
H	Fluxo	mL/min	0,7	1,3
J	Volume de injeção	μL	2	7
K	Tempo do gradiente inicial	Minutos	6	10
L	Tempo do segundo gradiente	Minutos	2	6
M	Proporção final de FM B	%	70	90
N	Tempo de isocrático	Minutos	4	8

Ref. = Referência / FM = Fase Móvel / A = XSelect CSH C18 (100 mm x 4,6 mm x 3,5 μm) / B = YMC-Pack ODS-A (100 mm x 4,6 mm x 3 μm)

Tabela 8. Experimentos

Variável	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N
Experi.													
1	Acetato	10	4,8	ACN	0,05	XSelect	25	1,3	2	10	2	90	8
2	Acetato	10	4,8	ACN	0,50	YMC ODS-A	25	0,7	2	6	6	70	8
3	Acetato	10	4,8	MeOH	0,50	XSelect	25	1,3	7	6	6	90	4
4	Acetato	1	3,8	MeOH	0,05	YMC ODS-A	25	1,3	7	10	6	70	4
5	Acetato	1	3,8	ACN	0,05	XSelect	25	0,7	2	6	2	70	4
6	Acetato	1	3,8	ACN	0,50	XSelect	45	0,7	7	10	6	90	4
7	Acetato	1	4,8	ACN	0,50	XSelect	45	1,3	7	10	2	70	8
8	Acetato	1	4,8	MeOH	0,05	YMC ODS-A	45	0,7	2	6	2	90	4
9	Acetato	10	3,8	MeOH	0,05	YMC ODS-A	45	1,3	7	6	2	90	8
10	Acetato	10	3,8	MeOH	0,50	YMC ODS-A	45	0,7	2	10	6	70	8
11	Formiato	10	4,8	MeOH	0,05	XSelect	45	1,3	2	10	6	70	4
12	Formiato	10	4,8	ACN	0,05	YMC ODS-A	45	0,7	7	10	2	70	4
13	Formiato	1	4,8	MeOH	0,05	XSelect	25	0,7	7	6	6	70	8
14	Formiato	1	4,8	ACN	0,50	YMC ODS-A	45	1,3	2	6	6	90	4
15	Formiato	1	4,8	MeOH	0,50	YMC ODS-A	25	0,7	7	10	2	90	8
16	Formiato	10	3,8	MeOH	0,50	XSelect	25	0,7	2	10	2	90	4
17	Formiato	10	3,8	ACN	0,50	YMC ODS-A	25	1,3	7	6	2	70	4
18	Formiato	10	3,8	ACN	0,05	XSelect	45	0,7	7	6	6	90	8
19	Formiato	1	3,8	MeOH	0,50	XSelect	45	1,3	2	6	2	70	8
20	Formiato	1	3,8	ACN	0,05	YMC ODS-A	25	1,3	2	10	6	90	8

7.1.2. Resultados e Discussão

Após a execução dos experimentos delineados na Tabela 8, as respostas obtidas para cada experimento realizado foram plotadas no software Minitab 19 para posterior análise estatística.

Tabela 9. Resultados

Resposta Experim.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	1,87	58064	1,00000	1,91	2,16	2,49	1,30	3,08	6,61	0,69	44,3	0,13
2	1,20	134166	1,00000	2,31	0,10	3,38	5,63	2,81	5,09	0,10	290,3	0,78
3	1,01	252417	0,75493	3,26	9,94	0,93	1,64	0,10	2,08	0,72	68,7	0,09
4	1,56	44158	1,00000	5,03	0,10	0,10	3,96	4,27	0,10	0,10	16,2	0,35
5	2,03	38499	1,00000	2,45	2,34	2,81	0,50	2,28	0,10	0,10	32,6	0,50
6	1,10	359754	0,68904	1,12	2,79	3,53	4,91	2,24	2,68	0,85	74,5	2,48
7	1,11	382920	0,85483	4,85	2,43	1,62	4,55	2,17	2,66	1,15	102,7	1,33
8	1,38	195252	0,86879	2,87	2,01	0,10	0,10	0,10	0,10	0,77	3,3	0,12
9	1,21	139234	0,77980	3,22	1,04	0,10	0,10	1,92	5,55	0,65	80,1	0,14
10	1,04	30705	0,96380	3,22	1,74	0,10	10,23	4,89	3,10	0,10	12,5	0,13
11	1,06	317071	1,00000	2,10	2,66	10,28	0,10	2,89	0,10	0,10	11,0	0,46
12	2,03	19849	1,00000	1,73	1,12	6,27	0,10	0,10	0,10	0,10	355,5	0,10
13	1,12	68950	0,77431	1,31	11,91	1,52	0,10	1,09	1,09	0,10	41,0	0,10
14	1,13	196504	1,00000	4,83	1,84	16,00	4,98	2,21	0,85	0,77	49,6	0,47
15	1,49	328717	0,83922	1,88	16,15	0,10	0,10	0,10	0,10	1,18	77,1	0,09
16	1,16	422867	0,85564	3,12	10,82	3,08	1,80	0,10	0,10	1,31	30,7	0,41
17	1,13	142800	0,73894	2,58	1,28	3,24	4,71	2,40	3,90	0,10	157,1	1,40
18	2,37	20715	0,67937	1,72	2,04	2,41	0,10	2,39	5,41	0,92	341,1	0,27
19	1,07	102810	1,00000	1,02	2,16	5,02	0,10	3,12	3,12	0,10	16,4	0,11
20	1,41	116216	1,00000	1,60	24,05	0,10	7,09	1,91	2,74	0,10	33,6	1,67

Obs: Foi atribuído o valor de 0,10 para coeluição total, ou seja, não é possível distinguir que existem dois picos. Entretanto para a resposta R10 o valor de 0,10 significa que a impureza ficou retida na coluna cromatográfica: não houve eluição do pico.

7.1.2.1. Análise de variância

A ANOVA compara a variabilidade devido ao tratamento (variação do nível dos fatores) com a variabilidade devido ao 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. Quando o p-valor encontrado foi menor do que 0,05 considerou-se que esse coeficiente foi significativamente diferente de 0, conseqüentemente a resposta obtida experimentalmente foi afetada pela variação do nível desse fator. Por outro lado, quando o p-valor foi maior que 0,05 significa que a resposta não foi afetada pela variação do nível desse fator, sendo assim o mesmo não foi relevante para a resposta avaliada.

Nessa primeira etapa não foram avaliados os critérios de aceitação para o modelo matemático, pois ainda poderiam ser incluídos termos de interação e/ou quadráticos durante a etapa de otimização para o ajuste correto do modelo.

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	2,12434	0,16341	1,10	0,481
Linear	13	2,12434	0,16341	1,10	0,481
Tipo Tp	1	0,01058	0,01058	0,07	0,798
Conc. Tp	1	0,02312	0,02312	0,16	0,707
pH Tp	1	0,02312	0,02312	0,16	0,707
Tipo Modificador	1	0,53792	0,53792	3,63	0,106
Conc. Hidróxido	1	1,05800	1,05800	7,13	0,037
Coluna	1	0,00512	0,00512	0,03	0,859
Temperatura	1	0,01152	0,01152	0,08	0,790
Fluxo	1	0,27848	0,27848	1,88	0,220
V. Injeção	1	0,03042	0,03042	0,21	0,667
Tempo Grad. inicial	1	0,00162	0,00162	0,01	0,920
Tempo Grad. 2	1	0,10952	0,10952	0,74	0,423
Grad. 2 %B	1	0,03042	0,03042	0,21	0,667
Tempo Isocrático	1	0,00450	0,00450	0,03	0,867
Erro	6	0,89014	0,14836		
Total	19	3,01448			

Figura 7. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R1

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	2,30288E+11	17714448085	1,06	0,503
Linear	13	2,30288E+11	17714448085	1,06	0,503
Tipo Tp	1	513388445	513388445	0,03	0,867
Conc. Tp	1	4377603783	4377603783	0,26	0,627
pH Tp	1	14372948355	14372948355	0,86	0,390
Tipo Modificador	1	9361204882	9361204882	0,56	0,483
Conc. Hidróxido	1	89198313255	89198313255	5,33	0,060
Coluna	1	22880312458	22880312458	1,37	0,287
Temperatura	1	1247568080	1247568080	0,07	0,794
Fluxo	1	880729920	880729920	0,05	0,826
V. Injeção	1	1085748480	1085748480	0,06	0,807
Tempo Grad. inicial	1	31123998634	31123998634	1,86	0,222
Tempo Grad. 2	1	4215330337	4215330337	0,25	0,634
Grad. 2 %B	1	32628011367	32628011367	1,95	0,212
Tempo Isocrático	1	18402667114	18402667114	1,10	0,335
Erro	6	1,00391E+11	16731753267		
Total	19	3,30678E+11			

Figura 8. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	0,228557	0,017581	2,48	0,136
Linear	13	0,228557	0,017581	2,48	0,136
Tipo Tp	1	0,000028	0,000028	0,00	0,952
Conc. Tp	1	0,003219	0,003219	0,45	0,526
pH Tp	1	0,007431	0,007431	1,05	0,346
Tipo Modificador	1	0,000790	0,000790	0,11	0,750
Conc. Hidróxido	1	0,008237	0,008237	1,16	0,323
Coluna	1	0,016961	0,016961	2,39	0,173
Temperatura	1	0,000812	0,000812	0,11	0,747
Fluxo	1	0,010503	0,010503	1,48	0,269
V. Injeção	1	0,124472	0,124472	17,54	0,006
Tempo Grad. inicial	1	0,018386	0,018386	2,59	0,159
Tempo Grad. 2	1	0,000287	0,000287	0,04	0,847
Grad. 2 %B	1	0,037419	0,037419	5,27	0,061
Tempo Isocrático	1	0,000013	0,000013	0,00	0,967
Erro	6	0,042579	0,007096		
Total	19	0,271136			

Figura 9. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R3

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	12,8898	0,99152	0,40	0,921
Linear	13	12,8898	0,99152	0,40	0,921
Tipo Tp	1	3,4863	3,48625	1,41	0,280
Conc. Tp	1	0,1593	0,15931	0,06	0,808
pH Tp	1	0,1927	0,19266	0,08	0,789
Tipo Modificador	1	0,1813	0,18134	0,07	0,795
Conc. Hidróxido	1	0,9022	0,90216	0,37	0,568
Coluna	1	2,0590	2,05895	0,83	0,396
Temperatura	1	0,0756	0,07564	0,03	0,867
Fluxo	1	3,7709	3,77088	1,53	0,263
V. Injeção	1	0,0800	0,08001	0,03	0,863
Tempo Grad. inicial	1	0,0479	0,04794	0,02	0,894
Tempo Grad. 2	1	0,0396	0,03962	0,02	0,903
Grad. 2 %B	1	0,0562	0,05616	0,02	0,885
Tempo Isocrático	1	1,8388	1,83885	0,74	0,421
Erro	6	14,8148	2,46913		
Total	19	27,7045			

Figura 10. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R4

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	575,366	44,259	1,41	0,353
Linear	13	575,366	44,259	1,41	0,353
Tipo Tp	1	121,919	121,919	3,87	0,097
Conc. Tp	1	54,055	54,055	1,72	0,238
pH Tp	1	0,192	0,192	0,01	0,940
Tipo Modificador	1	16,891	16,891	0,54	0,491
Conc. Hidróxido	1	0,002	0,002	0,00	0,995
Coluna	1	0,002	0,002	0,00	0,995
Temperatura	1	174,168	174,168	5,53	0,057
Fluxo	1	0,564	0,564	0,02	0,898
V. Injeção	1	0,058	0,058	0,00	0,967
Tempo Grad. inicial	1	43,100	43,100	1,37	0,286
Tempo Grad. 2	1	12,262	12,262	0,39	0,556
Grad. 2 %B	1	110,450	110,450	3,51	0,110
Tempo Isocrático	1	41,703	41,703	1,32	0,294
Erro	6	188,876	31,479		
Total	19	764,243			

Figura 11. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R5

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	243,514	18,7318	2,13	0,181
Linear	13	243,514	18,7318	2,13	0,181
Tipo Tp	1	53,989	53,9890	6,14	0,048
Conc. Tp	1	0,095	0,0952	0,01	0,920
pH Tp	1	24,642	24,6420	2,80	0,145
Tipo Modificador	1	21,054	21,0535	2,40	0,173
Conc. Hidróxido	1	5,854	5,8536	0,67	0,446
Coluna	1	0,882	0,8820	0,10	0,762
Temperatura	1	38,309	38,3091	4,36	0,082
Fluxo	1	13,745	13,7448	1,56	0,258
V. Injeção	1	27,707	27,7066	3,15	0,126
Tempo Grad. inicial	1	3,073	3,0733	0,35	0,576
Tempo Grad. 2	1	9,140	9,1395	1,04	0,347
Grad. 2 %B	1	1,512	1,5125	0,17	0,693
Tempo Isocrático	1	43,513	43,5125	4,95	0,068
Erro	6	52,726	8,7876		
Total	19	296,239			

Figura 12. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R6

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	147,058	11,3121	3,52	0,066
Linear	13	147,058	11,3121	3,52	0,066
Tipo Tp	1	9,439	9,4394	2,94	0,137
Conc. Tp	1	0,023	0,0231	0,01	0,935
pH Tp	1	11,101	11,1005	3,46	0,112
Tipo Modificador	1	12,230	12,2305	3,81	0,099
Conc. Hidróxido	1	31,752	31,7520	9,89	0,020
Coluna	1	23,981	23,9805	7,47	0,034
Temperatura	1	0,122	0,1217	0,04	0,852
Fluxo	1	1,230	1,2301	0,38	0,559
V. Injeção	1	6,682	6,6817	2,08	0,199
Tempo Grad. inicial	1	13,090	13,0896	4,08	0,090
Tempo Grad. 2	1	32,207	32,2072	10,03	0,019
Grad. 2 %B	1	3,089	3,0890	0,96	0,365
Tempo Isocrático	1	2,112	2,1125	0,66	0,448
Erro	6	19,266	3,2110		
Total	19	166,324			

Figura 13. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R7

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	29,8285	2,29450	1,98	0,206
Linear	13	29,8285	2,29450	1,98	0,206
Tipo Tp	1	2,8501	2,85013	2,46	0,168
Conc. Tp	1	0,0708	0,07080	0,06	0,813
pH Tp	1	5,9078	5,90784	5,09	0,065
Tipo Modificador	1	0,4530	0,45300	0,39	0,555
Conc. Hidróxido	1	0,0006	0,00061	0,00	0,983
Coluna	1	0,0781	0,07812	0,07	0,804
Temperatura	1	0,7566	0,75661	0,65	0,450
Fluxo	1	3,1760	3,17605	2,74	0,149
V. Injeção	1	2,1846	2,18461	1,88	0,219
Tempo Grad. inicial	1	0,5544	0,55444	0,48	0,515
Tempo Grad. 2	1	4,4462	4,44625	3,83	0,098
Grad. 2 %B	1	7,0448	7,04484	6,08	0,049
Tempo Isocrático	1	2,3052	2,30521	1,99	0,208
Erro	6	6,9578	1,15963		
Total	19	36,7863			

Figura 14. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R8

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	80,8872	6,2221	4,96	0,030
Linear	13	80,8872	6,2221	4,96	0,030
Tipo Tp	1	5,5757	5,5757	4,44	0,080
Conc. Tp	1	17,1125	17,1125	13,63	0,010
pH Tp	1	3,2160	3,2160	2,56	0,161
Tipo Modificador	1	10,8045	10,8045	8,60	0,026
Conc. Hidróxido	1	0,1584	0,1584	0,13	0,735
Coluna	1	0,2691	0,2691	0,21	0,660
Temperatura	1	0,1549	0,1549	0,12	0,737
Fluxo	1	4,8413	4,8413	3,86	0,097
V. Injeção	1	0,1549	0,1549	0,12	0,737
Tempo Grad. inicial	1	4,0500	4,0500	3,23	0,123
Tempo Grad. 2	1	0,0405	0,0405	0,03	0,863
Grad. 2 %B	1	2,3530	2,3530	1,87	0,220
Tempo Isocrático	1	32,1565	32,1565	25,61	0,002
Erro	6	7,5337	1,2556		
Total	19	88,4210			

Figura 15. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R9

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	3,06295	0,23561	2,24	0,164
Linear	13	3,06295	0,23561	2,24	0,164
Tipo Tp	1	0,01013	0,01013	0,10	0,767
Conc. Tp	1	0,00924	0,00924	0,09	0,777
pH Tp	1	0,09113	0,09113	0,87	0,387
Tipo Modificador	1	0,00313	0,00313	0,03	0,869
Conc. Hidróxido	1	0,37812	0,37812	3,60	0,106
Coluna	1	0,21425	0,21425	2,04	0,203
Temperatura	1	0,05101	0,05101	0,49	0,512
Fluxo	1	0,05513	0,05513	0,53	0,496
V. Injeção	1	0,14964	0,14964	1,43	0,278
Tempo Grad. inicial	1	0,09112	0,09112	0,87	0,387
Tempo Grad. 2	1	0,26221	0,26221	2,50	0,165
Grad. 2 %B	1	1,74640	1,74640	16,64	0,007
Tempo Isocrático	1	0,00144	0,00144	0,01	0,910
Erro	6	0,62975	0,10496		
Total	19	3,69270			

Figura 16. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R10

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	191911	14762,4	2,60	0,124
Linear	13	191911	14762,4	2,60	0,124
Tipo Tp	1	7523	7523,3	1,33	0,293
Conc. Tp	1	44585	44585,1	7,86	0,031
pH Tp	1	3093	3092,6	0,55	0,488
Tipo Modificador	1	63203	63202,5	11,14	0,016
Conc. Hidróxido	1	313	312,8	0,06	0,822
Coluna	1	4877	4876,6	0,86	0,390
Temperatura	1	3254	3253,8	0,57	0,478
Fluxo	1	23045	23045,3	4,06	0,090
V. Injeção	1	31181	31181,3	5,50	0,057
Tempo Grad. inicial	1	5187	5187,4	0,91	0,376
Tempo Grad. 2	1	75	74,9	0,01	0,912
Grad. 2 %B	1	2698	2698,2	0,48	0,516
Tempo Isocrático	1	2878	2877,6	0,51	0,503
Erro	6	34040	5673,4		
Total	19	225952			

Figura 17. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R11

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	13	5,62090	0,43238	0,99	0,541
Linear	13	5,62090	0,43238	0,99	0,541
Tipo Tp	1	0,04705	0,04705	0,11	0,754
Conc. Tp	1	0,54781	0,54781	1,25	0,306
pH Tp	1	0,71821	0,71821	1,64	0,247
Tipo Modificador	1	2,54184	2,54184	5,81	0,053
Conc. Hidróxido	1	0,59512	0,59512	1,36	0,288
Coluna	1	0,01985	0,01985	0,05	0,838
Temperatura	1	0,00040	0,00040	0,00	0,977
Fluxo	1	0,06845	0,06845	0,16	0,706
V. Injeção	1	0,12324	0,12324	0,28	0,615
Tempo Grad. inicial	1	0,50245	0,50245	1,15	0,325
Tempo Grad. 2	1	0,30504	0,30504	0,70	0,436
Grad. 2 %B	1	0,01861	0,01861	0,04	0,843
Tempo Isocrático	1	0,13284	0,13284	0,30	0,601
Erro	6	2,62395	0,43733		
Total	19	8,24486			

Figura 18. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R12

7.1.2.2. Parâmetros críticos

Para a resposta R1, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 19) que o parâmetro significativo foi a concentração de amoníaco (E).

O gráfico fatorial (Figura 20) permite avaliar que quanto maior a concentração de amoníaco na Fase Móvel B, menor a assimetria do pico.

Figura 19. Gráficos: Normal e de Pareto para R1

Figura 20. Gráfico Fatorial para R1

Para a resposta R2, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 21) que nenhum dos fatores se mostrou relevante, entretanto a concentração de amoníaco (E) foi o mais importante dentre todos os fatores.

O gráfico fatorial (Figura 22) permite avaliar que aumentando a concentração de amoníaco na Fase Móvel B, aumenta-se também o número de pratos teóricos.

Figura 21. Gráficos: Normal e de Pareto para R2

Figura 22. Gráfico Fatorial para R2

Para a resposta R3, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 23) que o parâmetro significativo foi o volume de injeção (J).

O gráfico fatorial (Figura 24) permite avaliar que quanto menor o volume de injeção, maior a pureza de pico.

Figura 23. Gráficos: Normal e de Pareto para R3

Figura 24. Gráfico Fatorial para R3

Para a resposta R4, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 25) que nenhum dos fatores se mostrou relevante, entretanto o fluxo (H) foi o mais importante dentre todos os fatores.

O gráfico fatorial (Figura 26) permite avaliar que aumentando fluxo, aumenta-se a também o fator capacidade.

Figura 25. Gráficos: Normal e de Pareto para R4

Figura 26. Gráfico Fatorial para R4

Para a resposta R5, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 27) que nenhum dos fatores se mostrou relevante, entretanto a temperatura (G), o tipo do tampão (A) e proporção final de B no gradiente (M) mostraram-se os mais importantes dentre todos os fatores, em ordem decrescente de importância.

O gráfico fatorial (Figura 28) permite avaliar que diminuindo a temperatura, aumentando a proporção final de B no gradiente e utilizando tampão formiato, aumenta-se a resolução entre os picos 2 e 3.

Figura 27. Gráficos: Normal e de Pareto para R5

Figura 28. Gráfico Fatorial para R5

Para a resposta R6, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 29) que o parâmetro relevante foi o tipo de tampão (A).

O gráfico fatorial (Figura 30) permite avaliar que utilizando tampão formiato aumenta-se a resolução entre os picos 3 e 4.

Figura 29. Gráficos: Normal e de Pareto para R6

Figura 30. Gráfico Fatorial para R6

Para a resposta R7, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 31) que os parâmetros significativos foram o tempo do segundo gradiente (L), a concentração de amoníaco (E) e a coluna (F), em ordem decrescente de importância.

O gráfico fatorial (Figura 32) permite avaliar que aumentando o tempo do segundo gradiente e/ou a concentração de amoníaco na Fase Móvel B, aumenta-se a resolução entre ao ativo e a impureza anterior a ele. Além disso, maiores respostas foram obtidas com a coluna YMC ODS-A.

Figura 31. Gráficos: Normal e de Pareto para R7

Figura 32. Gráfico Fatorial para R7

Para a resposta R8, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 33) que o parâmetro significativo foi a proporção final de B no gradiente (M). Além disso, o pH do tampão (C) mostrou uma importância secundária.

O gráfico fatorial (Figura 34) permite avaliar que diminuindo a proporção final de B no gradiente, aumenta-se a resolução entre o ativo e a impureza posterior a ele. Além disso, o pH mais baixo gerou maiores respostas.

Figura 33. Gráficos: Normal e de Pareto para R8

Figura 34. Gráfico Fatorial para R8

Para a resposta R9, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 35) que os parâmetros significativos foram o tempo de isocrático (N), a concentração do tampão (B) e o tipo de modificador (D), em ordem decrescente de importância.

O gráfico fatorial (Figura 36) permite avaliar que aumentando o tempo de isocrático e/ou aumentando a concentração do tampão, aumenta-se a resolução entre a impureza O e a impureza P. Além disso, maiores respostas foram obtidas com o uso do modificador orgânico acetonitrila (ACN).

Figura 35. Gráficos: Normal e de Pareto para R9

Figura 36. Gráfico Fatorial para R9

Para a resposta R10, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 37) que o parâmetro significativo foi a proporção final de B (M).

O gráfico fatorial (Figura 38) permite avaliar que aumentando a proporção final de B, aumenta-se a assimetria da impureza M, que nesse caso está sendo utilizado para monitorar se o pico da impureza está eluindo ou não na corrida cromatográfica.

Figura 37. Gráficos: Normal e de Pareto para R10

Figura 38. Gráfico Fatorial para R10

Para a resposta R11, observou-se através dos gráficos normal de pareto (Figura 39) que os parâmetros significativos foram o tipo do modificador (D) e a concentração do tampão (B), em ordem decrescente de importância.

O gráfico fatorial (Figura 40) permite avaliar que utilizando a acetonitrila como modificador orgânico e/ou aumentando a concentração de tampão, aumenta-se o sinal ruído da impureza G. A impureza G está sendo utilizada para o cálculo do sinal ruído, pois é o pico mais resolvido e fácil de identificar no cromatograma dos padrões injetados na concentração de 0,1% nesse primeiro delineamento.

Figura 39. Gráficos: Normal e de Pareto para R11

Figura 40. Gráfico Fatorial para R11

Para a resposta R12, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 41) que nenhum dos fatores se mostrou relevante, entretanto o tipo de modificador (D) e o pH do Tampão (C) mostraram-se os mais importantes dentre todos os fatores, em ordem decrescente de importância.

O gráfico fatorial (Figura 42) permite avaliar que utilizando a acetonitrila como modificador orgânico e/ou diminuindo o pH da fase móvel, aumenta-se a diferença entre o tempo de retenção da impureza desconhecida na amostra oxidativa e o tempo de retenção mais próximo da impureza na mistura de padrões de impurezas.

Figura 41. Gráficos: Normal e de Pareto para R12

Figura 42. Gráfico Fatorial para R12

7.1.3. Considerações Finais

O parâmetro tipo do tampão (A) mostrou ser relevante apenas para uma das respostas (R6) e teve importância secundária para a resposta R5. Sendo que para as duas respostas os melhores resultados foram obtidos com o tampão formiato, desse modo esse sal foi o escolhido para prosseguir no estudo.

O fator concentração do tampão (B) foi relevante para duas respostas (R9 e R11), sendo que os melhores resultados foram obtidos com a concentração mais alta (10 mM). Sendo assim, fixou-se o valor de 10 mM para prosseguir no estudo.

A variável pH do tampão (C) mostrou importância secundária para duas respostas (R8 e R12), sendo que os melhores resultados foram obtidos com o menor pH. Dessa forma, optou-se por levar para a próxima etapa o pH 3,8 como ponto superior do delineamento fatorial.

O parâmetro tipo de modificador (D) foi relevante para duas respostas (R9 e R11) e teve importância secundária para a resposta R12, sendo que os melhores resultados foram obtidos com acetonitrila. Portanto, esse modificador foi escolhido para prosseguir no estudo.

O fator concentração de amoníaco (E) foi crítico para duas respostas (R1 e R7) e teve importância secundária para R2, sendo que os melhores resultados foram obtidos com a maior concentração de amoníaco (0,5%), sendo assim o valor de 0,5% foi escolhido como ponto inferior do delineamento fatorial.

A variável coluna (F) teve importância secundária apenas para uma das respostas (R7). Sabendo que na próxima etapa serão utilizados valores mais baixos de pH da fase, optou-se pela coluna XSelect CSH C18 (100 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m) por apresentar maior vida útil em baixos valores de pH.

O fator temperatura da coluna (G) não se mostrou relevante para nenhuma resposta, tendo importância secundária para duas respostas, sendo os melhores resultados obtidos com menor temperatura para uma delas e maior para outra, sendo assim optou-se por considerar para a próxima etapa os dois níveis deste fator (25°C e 45°C).

O parâmetro fluxo (H) mostrou importância secundária apenas para a resposta R4, sendo os melhores resultados obtidos com o maior fluxo. Porém optou-se por considerar os dois níveis dessa variável (0,7 mL/min e 1,3 mL/min) para a próxima etapa no intuito de investigar se a interação dela com outros fatores seria importante para as respostas.

O fator volume de injeção (J) foi relevante apenas para uma resposta (R3), sendo que os melhores resultados foram obtidos com o volume de injeção de 2 μ L. Entretanto, com o objetivo de fazer uma única injeção para teor e produtos de degradação e também para evitar problemas posteriores de sinal ruído, os níveis de 2 μ L e 7 μ L foram escolhidos para prosseguir na próxima etapa do estudo.

A variável tempo de gradiente inicial (K) não se mostrou relevante para nenhuma resposta, porém optou-se por levar essa variável para a próxima etapa no intuito de investigar se a interação dela com outros fatores seria relevante. Portanto, os dois pontos (6 minutos e 10 minutos) foram levados para o delineamento fatorial.

O parâmetro tempo do segundo gradiente (L) se mostrou relevante para uma resposta (R7), sendo que o maior tempo gerou melhores resultados, desse modo o tempo de 6 minutos foi escolhido como ponto inferior do delineamento fatorial.

O fator proporção final de B (M) mostrou-se relevante para duas respostas (R8 e R10), sendo que para a resposta R10 esse foi o único fator relevante, gerando resultados satisfatórios apenas nos casos em que a proporção final de B foi maior. Nos casos em que a proporção de B foi menor, o pico de impureza avaliado eluiu apenas na próxima corrida. Sendo assim, optou-se por fixar o valor de 90% como proporção final de B.

A variável tempo de isocrático (N) foi relevante apenas para uma resposta (R9), sendo os melhores resultados obtidos com o tempo de 8 minutos, dessa forma esse valor foi fixado para a próxima etapa do estudo.

Sendo assim, os parâmetros que foram mantidos fixos para a etapa seguinte e seus níveis escolhidos foram:

- Tipo do Tampão – Formiato
- Concentração do Tampão – 10 mM
- Tipo de Modificador – Acetonitrila
- Coluna – XSelect CSH C18 (100 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m)
- Proporção final de B – 90%
- Tempo de isocrático – 8 minutos

Por outro lado, os parâmetros escolhidos para a próxima etapa e seus respectivos níveis superiores e inferiores foram:

- pH do Tampão – 2,8 e 3,8
- Concentração de amoníaco - 0,5% e 2,0%
- Temperatura da coluna – 25°C e 45°C
- Fluxo – 0,7 mL/min e 1,3 mL/min
- Volume de injeção – 2 µL e 7 µL
- Tempo de gradiente inicial – 6 minutos e 10 minutos
- Tempo do segundo gradiente – 6 minutos e 10 minutos

7.2. Delineamento para Triagem – Parte II

Durante a segunda etapa de triagem o objetivo foi avaliar a relevância (significância) dos fatores e também das interações entre os fatores em relação às respostas, para seguir para a etapa de otimização apenas com os fatores e interações que sejam significativos para o desenvolvimento do método analítico.

Tabela 10. Respostas avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Resposta	Tipo de Amostra
R1	Assimetria	Padrão de teor
R2	Pratos Teóricos	Padrão de teor
R3	Pureza	Padrão de teor
R4	Fator capacidade	Mistura de padrões de impureza e ativo
R5	Resolução impurezas 2 e 3	Mistura de padrões de impureza e ativo
R6	Resolução impurezas 3 e 4	Mistura de padrões de impureza e ativo
R7	Resolução impurezas K e H	Mistura de padrões de impureza e ativo
R8	Resolução ativo e impureza anterior a ele	Mistura de padrões de impureza e ativo
R9	Resolução ativo e impureza posterior a ele	Mistura de padrões de impureza e ativo
R10	Resolução impurezas O e P	Mistura de padrões de impureza e ativo
R11	Sinal ruído impureza D	Mistura de padrões de impureza 0,1%
R12	Diferença entre o tempo de retenção da impureza oxidativa e da impureza conhecida mais próxima	Mistura de padrões de impureza e ativo Amostra de degradação oxidativa

Ref. = Referência

Observação: A resposta assimetria da impureza M, utilizada no delineamento da Triagem I para verificar se a impureza eluiu dentro do tempo da corrida não foi monitorada na Triagem II, já que em todos os experimentos deste o pico eluiu satisfatoriamente.

A resposta Resolução das impurezas K e H (R7) foi adicionada na Triagem II, uma vez que as mesmas coeluíram em algumas condições experimentais avaliadas durante a Triagem II.

O sinal ruído passou a ser monitorado na Triagem II através da impureza D, que mostrou ser o mais baixa na mistura de padrões na concentração de 0,1%.

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental Fatorial Fracionado (Res: IV) com 7 fatores e 2 níveis, no qual foi possível avaliar inúmeras variáveis e interações e assim determinar suas significâncias em relação as respostas.

7.2.1. Criação dos experimentos

Tabela 11. Variáveis avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Nome	Unidade	Inferior	Superior
A	pH do Tampão	Numérico	2,8	3,8
B	Concentração de amoníaco	%	0,5	2,0
C	Temperatura da coluna	°C	25	45
D	Fluxo	mL/min	0,7	1,3
E	Volume de injeção	µL	2	7
F	Tempo do gradiente inicial	Minutos	6	10
G	Tempo do segundo gradiente	Minutos	6	10

Ref. = Referência

Tabela 12. Experimentos

Variável Experim.	A	B	C	D	E	F	G
1	2,8	0,5	25	0,7	2	6	6
2	2,8	0,5	45	0,7	7	10	10
3	2,8	0,5	25	1,3	2	10	10
4	2,8	0,5	45	1,3	7	6	6
5	2,8	2,0	25	0,7	7	10	6
6	2,8	2,0	45	0,7	2	6	10
7	2,8	2,0	25	1,3	7	6	10
8	2,8	2,0	45	1,3	2	10	6
9	3,8	0,5	25	0,7	7	6	10
10	3,8	0,5	45	0,7	2	10	6
11	3,8	0,5	25	1,3	7	10	6
12	3,8	0,5	45	1,3	2	6	10
13	3,8	2,0	25	0,7	2	10	10
14	3,8	2,0	45	0,7	7	6	6
15	3,8	2,0	25	1,3	2	6	6
16	3,8	2,0	45	1,3	7	10	10

7.2.2. Resultados e Discussão

Após a execução dos experimentos delineados na Tabela 12, as respostas obtidas para cada experimento realizado foram plotadas no software Minitab 19 para posterior análise estatística.

Tabela 13. Resultados

Resposta Experim.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
1	1,32	106072	0,72869	2,43	2,59	1,57	11,98	0,50	2,29	13,45	2,8	0,100
2	1,83	67023	0,76024	2,26	2,62	14,44	5,94	0,94	2,90	12,53	28,5	0,173
3	1,80	107594	0,80861	2,43	2,40	3,84	5,34	1,43	3,19	13,36	5,4	0,127
4	1,45	54735	0,80529	2,14	0,10	1,30	19,56	0,50	2,42	10,37	18,4	0,113
5	1,08	287920	0,78291	2,71	2,47	2,88	41,95	5,59	2,63	5,77	27,2	2,073
6	1,09	154535	0,93700	1,90	1,98	2,34	30,31	6,02	2,77	4,43	13,0	1,380
7	1,09	112640	0,84668	2,79	2,00	2,15	33,28	5,87	3,06	7,85	15,7	1,333
8	1,06	260633	1,00000	1,95	1,87	2,30	45,64	6,73	3,00	6,35	4,2	1,860
9	1,10	154196	0,62932	1,60	1,15	3,88	2,84	5,02	2,64	5,70	45,8	0,940
10	1,06	344729	0,90012	1,15	2,51	5,37	1,32	4,81	2,19	2,82	6,5	2,420
11	1,10	282268	0,76787	1,75	4,76	0,50	1,78	5,43	2,56	5,83	11,6	2,213
12	1,08	139873	1,00000	1,18	3,45	4,75	1,76	5,74	2,82	4,84	3,3	1,400
13	1,04	253014	0,94188	1,60	0,10	8,31	0,10	5,95	2,72	5,86	3,6	0,373
14	1,09	215217	0,74788	1,12	1,24	8,06	4,80	4,45	2,09	2,19	31,1	0,320
15	1,02	168086	1,00000	1,49	0,10	6,96	1,07	4,89	2,31	4,30	1,5	0,486
16	1,08	237565	0,80183	1,07	1,71	7,56	10,13	6,19	2,98	4,34	4,4	1,161

7.2.2.1. Análise de variância

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	1,02969	0,073549	240,16	0,051
Linear	7	0,69394	0,099135	323,71	0,043
pH Tp	1	0,28891	0,288906	943,37	0,021
Conc. Hidróxido	1	0,29976	0,299756	978,80	0,020
Temp. coluna	1	0,00226	0,002256	7,37	0,225
Fluxo	1	0,00031	0,000306	1,00	0,500
V. Injeção	1	0,00766	0,007656	25,00	0,126
Tempo gradiente inicial	1	0,04101	0,041006	133,90	0,055
Tempo gradiente 2	1	0,05406	0,054056	176,51	0,048
Interações de 2 fatores	7	0,33574	0,047963	156,62	0,061
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	0,24256	0,242556	792,02	0,023
pH Tp*Temp. coluna	1	0,00051	0,000506	1,65	0,421
pH Tp*Fluxo	1	0,00051	0,000506	1,65	0,421
pH Tp*V. Injeção	1	0,00001	0,000006	0,02	0,910
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,04306	0,043056	140,59	0,054
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,04731	0,047306	154,47	0,051
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,00181	0,001806	5,90	0,249
Erro	1	0,00031	0,000306		
Total	15	1,02999			

Figura 43. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R1

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	1,11792E+11	7985144840	24,23	0,158
Linear	7	90584987663	12940712523	39,26	0,122
pH Tp	1	25904580601	25904580601	78,59	0,072
Conc. Hidróxido	1	11724558400	11724558400	35,57	0,106
Temp. coluna	1	396900	396900	0,00	0,978
Fluxo	1	3006109584	3006109584	9,12	0,204
V. Injeção	1	945132049	945132049	2,87	0,340
Tempo gradiente inicial	1	33800087104	33800087104	102,55	0,063
Tempo gradiente 2	1	15204123025	15204123025	46,13	0,093
Interações de 2 fatores	7	21207040091	3029577156	9,19	0,249
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	17390224384	17390224384	52,76	0,087
pH Tp*Temp. coluna	1	1542918400	1542918400	4,68	0,276
pH Tp*Fluxo	1	220641316	220641316	0,67	0,563
pH Tp*V. Injeção	1	506925225	506925225	1,54	0,432
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	1314352516	1314352516	3,99	0,296
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	109809441	109809441	0,33	0,667
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	122168809	122168809	0,37	0,652
Erro	1	329604025	329604025		
Total	15	1,12122E+11			

Figura 44. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R2

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	0,182934	0,013067	12,73	0,217
Linear	7	0,149559	0,021366	20,81	0,167
pH Tp	1	0,000892	0,000892	0,87	0,522
Conc. Hidróxido	1	0,027064	0,027064	26,36	0,122
Temp. coluna	1	0,012456	0,012456	12,13	0,178
Fluxo	1	0,022669	0,022669	22,08	0,133
V. Injeção	1	0,086181	0,086181	83,95	0,069
Tempo gradiente inicial	1	0,000294	0,000294	0,29	0,687
Tempo gradiente 2	1	0,000003	0,000003	0,00	0,964
Interações de 2 fatores	7	0,033375	0,004768	4,64	0,343
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	0,004539	0,004539	4,42	0,283
pH Tp*Temp. coluna	1	0,003160	0,003160	3,08	0,330
pH Tp*Fluxo	1	0,000610	0,000610	0,59	0,582
pH Tp*V. Injeção	1	0,023711	0,023711	23,10	0,131
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,000000	0,000000	0,00	0,998
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,000385	0,000385	0,38	0,650
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,000969	0,000969	0,94	0,509
Erro	1	0,001027	0,001027		
Total	15	0,183960			

Figura 45. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R3

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	4,87702	0,34836	17,16	0,187
Linear	7	4,78200	0,68314	33,66	0,132
pH Tp	1	3,64915	3,64915	179,80	0,047
Conc. Hidróxido	1	0,00565	0,00565	0,28	0,691
Temp. coluna	1	1,01508	1,01508	50,01	0,089
Fluxo	1	0,00000	0,00000	0,00	0,993
V. Injeção	1	0,10767	0,10767	5,30	0,261
Tempo gradiente inicial	1	0,00397	0,00397	0,20	0,735
Tempo gradiente 2	1	0,00048	0,00048	0,02	0,903
Interações de 2 fatores	7	0,09502	0,01357	0,67	0,739
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	0,01490	0,01490	0,73	0,549
pH Tp*Temp. coluna	1	0,00187	0,00187	0,09	0,813
pH Tp*Fluxo	1	0,00001	0,00001	0,00	0,990
pH Tp*V. Injeção	1	0,07372	0,07372	3,63	0,308
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,00056	0,00056	0,03	0,895
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,00336	0,00336	0,17	0,754
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,00060	0,00060	0,03	0,891
Erro	1	0,02030	0,02030		
Total	15	4,89731			

Figura 46. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R4

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	20,8584	1,48989	0,62	0,776
Linear	7	6,5586	0,93694	0,39	0,847
pH Tp	1	0,0638	0,06376	0,03	0,897
Conc. Hidróxido	1	4,1108	4,11076	1,71	0,416
Temp. coluna	1	0,0005	0,00051	0,00	0,991
Fluxo	1	0,1871	0,18706	0,08	0,827
V. Injeção	1	0,0689	0,06891	0,03	0,893
Tempo gradiente inicial	1	2,1243	2,12431	0,88	0,520
Tempo gradiente 2	1	0,0033	0,00331	0,00	0,976
Interações de 2 fatores	7	14,2998	2,04283	0,85	0,687
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	5,4406	5,44056	2,26	0,374
pH Tp*Temp. coluna	1	2,0235	2,02351	0,84	0,528
pH Tp*Fluxo	1	4,3160	4,31601	1,79	0,409
pH Tp*V. Injeção	1	1,1827	1,18266	0,49	0,611
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,0127	0,01266	0,01	0,954
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	1,0868	1,08681	0,45	0,624
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,2377	0,23766	0,10	0,806
Erro	1	2,4103	2,41026		
Total	15	23,2687			

Figura 47. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R5

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	190,467	13,6048	3,44	0,402
Linear	7	85,313	12,1876	3,09	0,413
pH Tp	1	13,268	13,2678	3,36	0,318
Conc. Hidróxido	1	1,507	1,5068	0,38	0,648
Temp. coluna	1	16,060	16,0601	4,07	0,293
Fluxo	1	19,119	19,1188	4,84	0,272
V. Injeção	1	1,776	1,7756	0,45	0,624
Tempo gradiente inicial	1	12,585	12,5848	3,19	0,325
Tempo gradiente 2	1	20,999	20,9993	5,32	0,261
Interações de 2 fatores	7	105,154	15,0221	3,80	0,376
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	48,546	48,5461	12,29	0,177
pH Tp*Temp. coluna	1	0,926	0,9264	0,23	0,713
pH Tp*Fluxo	1	2,095	2,0953	0,53	0,599
pH Tp*V. Injeção	1	16,221	16,2208	4,11	0,292
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	20,273	20,2725	5,13	0,265
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	7,715	7,7145	1,95	0,395
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	9,379	9,3789	2,37	0,366
Erro	1	3,950	3,9502		
Total	15	194,418			

Figura 48. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R6

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	3633,79	259,56	79,23	0,088
Linear	7	2841,02	405,86	123,89	0,069
pH Tp	1	1810,50	1810,50	552,64	0,027
Conc. Hidróxido	1	852,06	852,06	260,08	0,039
Temp. coluna	1	27,88	27,88	8,51	0,210
Fluxo	1	23,33	23,33	7,12	0,228
V. Injeção	1	32,38	32,38	9,88	0,196
Tempo gradiente inicial	1	2,72	2,72	0,83	0,529
Tempo gradiente 2	1	92,16	92,16	28,13	0,119
Interações de 2 fatores	7	792,76	113,25	34,57	0,130
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	624,50	624,50	190,62	0,046
pH Tp*Temp. coluna	1	0,69	0,69	0,21	0,726
pH Tp*Fluxo	1	3,96	3,96	1,21	0,470
pH Tp*V. Injeção	1	3,84	3,84	1,17	0,475
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,05	0,05	0,01	0,923
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	157,00	157,00	47,92	0,091
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	2,72	2,72	0,83	0,529
Erro	1	3,28	3,28		
Total	15	3637,06			

Figura 49. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R7

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	72,0097	5,1435	61,16	0,100
Linear	7	45,5258	6,5037	77,33	0,087
pH Tp	1	13,8756	13,8756	164,99	0,049
Conc. Hidróxido	1	28,4089	28,4089	337,80	0,035
Temp. coluna	1	0,0306	0,0306	0,36	0,654
Fluxo	1	0,7656	0,7656	9,10	0,204
V. Injeção	1	0,2704	0,2704	3,22	0,324
Tempo gradiente inicial	1	1,0404	1,0404	12,37	0,176
Tempo gradiente 2	1	1,1342	1,1342	13,49	0,169
Interações de 2 fatores	7	26,4839	3,7834	44,99	0,114
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	25,9081	25,9081	308,06	0,036
pH Tp*Temp. coluna	1	0,0506	0,0506	0,60	0,580
pH Tp*Fluxo	1	0,0182	0,0182	0,22	0,723
pH Tp*V. Injeção	1	0,1369	0,1369	1,63	0,423
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,0144	0,0144	0,17	0,750
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,3540	0,3540	4,21	0,289
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,0016	0,0016	0,02	0,913
Erro	1	0,0841	0,0841		
Total	15	72,0938			

Figura 50. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R8

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	1,62589	0,116135	19,34	0,177
Linear	7	1,53944	0,219921	36,62	0,127
pH Tp	1	0,23766	0,237656	39,57	0,100
Conc. Hidróxido	1	0,01891	0,018906	3,15	0,327
Temp. coluna	1	0,00331	0,003306	0,55	0,594
Fluxo	1	0,27826	0,278256	46,33	0,093
V. Injeção	1	0,00001	0,000006	0,00	0,979
Tempo gradiente inicial	1	0,19581	0,195806	32,60	0,110
Tempo gradiente 2	1	0,80551	0,805506	134,11	0,055
Interações de 2 fatores	7	0,08644	0,012349	2,06	0,492
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	0,03706	0,037056	6,17	0,244
pH Tp*Temp. coluna	1	0,00031	0,000306	0,05	0,859
pH Tp*Fluxo	1	0,00016	0,000156	0,03	0,898
pH Tp*V. Injeção	1	0,01381	0,013806	2,30	0,371
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,02176	0,021756	3,62	0,308
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,01156	0,011556	1,92	0,398
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,00181	0,001806	0,30	0,681
Erro	1	0,00601	0,006006		
Total	15	1,63189			

Figura 51. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R9

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	193,186	13,7990	3,62	0,393
Linear	7	158,379	22,6256	5,93	0,306
pH Tp	1	91,346	91,3458	23,96	0,128
Conc. Hidróxido	1	48,337	48,3373	12,68	0,174
Temp. coluna	1	12,691	12,6914	3,33	0,319
Fluxo	1	1,260	1,2600	0,33	0,668
V. Injeção	1	0,043	0,0431	0,01	0,933
Tempo gradiente inicial	1	0,870	0,8696	0,23	0,716
Tempo gradiente 2	1	3,832	3,8318	1,01	0,499
Interações de 2 fatores	7	34,807	4,9725	1,30	0,590
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	32,519	32,5185	8,53	0,210
pH Tp*Temp. coluna	1	0,035	0,0352	0,01	0,939
pH Tp*Fluxo	1	0,061	0,0613	0,02	0,920
pH Tp*V. Injeção	1	0,107	0,1073	0,03	0,894
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,001	0,0005	0,00	0,993
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,710	0,7098	0,19	0,741
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	1,375	1,3748	0,36	0,656
Erro	1	3,812	3,8123		
Total	15	196,998			

Figura 52. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R10

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	2511,22	179,37	6,27	0,304
Linear	7	1971,11	281,59	9,84	0,241
pH Tp	1	3,42	3,42	0,12	0,788
Conc. Hidróxido	1	29,16	29,16	1,02	0,497
Temp. coluna	1	1,10	1,10	0,04	0,877
Fluxo	1	552,25	552,25	19,29	0,143
V. Injeção	1	1267,36	1267,36	44,28	0,095
Tempo gradiente inicial	1	101,00	101,00	3,53	0,311
Tempo gradiente 2	1	16,81	16,81	0,59	0,584
Interações de 2 fatores	7	540,11	77,16	2,70	0,438
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	62,41	62,41	2,18	0,379
pH Tp*Temp. coluna	1	57,00	57,00	1,99	0,392
pH Tp*Fluxo	1	92,16	92,16	3,22	0,324
pH Tp*V. Injeção	1	11,56	11,56	0,40	0,640
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	315,06	315,06	11,01	0,186
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,81	0,81	0,03	0,894
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	1,10	1,10	0,04	0,877
Erro	1	28,62	28,62		
Total	15	2539,84			

Figura 53. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R11

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	9,91831	0,70845	13,16	0,213
Linear	7	2,19784	0,31398	5,83	0,309
pH Tp	1	0,28998	0,28998	5,39	0,259
Conc. Hidróxido	1	0,14063	0,14063	2,61	0,353
Temp. coluna	1	0,08732	0,08732	1,62	0,424
Fluxo	1	0,05221	0,05221	0,97	0,505
V. Injeção	1	0,00203	0,00203	0,04	0,878
Tempo gradiente inicial	1	1,17072	1,17072	21,75	0,134
Tempo gradiente 2	1	0,45495	0,45495	8,45	0,211
Interações de 2 fatores	7	7,72047	1,10292	20,49	0,169
pH Tp*Conc. Hidróxido	1	7,24417	7,24417	134,59	0,055
pH Tp*Temp. coluna	1	0,12180	0,12180	2,26	0,373
pH Tp*Fluxo	1	0,14063	0,14063	2,61	0,353
pH Tp*V. Injeção	1	0,00456	0,00456	0,08	0,820
pH Tp*Tempo gradiente inicial	1	0,18361	0,18361	3,41	0,316
pH Tp*Tempo gradiente 2	1	0,01166	0,01166	0,22	0,723
Conc. Hidróxido*Fluxo	1	0,01404	0,01404	0,26	0,699
Erro	1	0,05382	0,05382		
Total	15	9,97214			

Figura 54. Resultado da análise de variância (ANOVA) para R12

7.2.2.2. Parâmetros críticos

Para a resposta R1, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 55) que os parâmetros significativos foram a concentração de amoníaco (B), pH do tampão (A), interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB) e tempo do segundo gradiente (G), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 55) permite avaliar que os fatores A e B tem efeito antagônico com AB e G e efeito sinérgico entre si, assim como AB e G. Já o gráfico fatorial (Figura 56) e o gráfico de interações (Figura 57) demonstram que aumentando o pH (A), aumentando a concentração de amoníaco (B) e/ou diminuindo o tempo do segundo gradiente obtém-se respostas melhores de assimetria. Além disso, em pH baixo foi necessária uma concentração de amoníaco alta para manter a resposta adequada e em pH alto não houve importância da concentração de amoníaco, obtendo-se melhores respostas de assimetria.

Figura 55. Gráficos: Normal e de Pareto para R1

Figura 56. Gráfico Fatorial para R1

Figura 57. Gráfico de Interações para R1

Para a resposta R2, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 58) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram o tempo de gradiente inicial (F), pH do tampão (A) e a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 58) permite avaliar que os fatores F e A tem efeito antagônico com AB e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 59) e o gráfico de interações (Figura 60) demonstram que valores maiores de tempo de gradiente inicial (F) e do pH do tampão (A) geram maiores valores de pratos teóricos. Além disso, em pH baixo foi necessária uma concentração de amoníaco alta para aumentar o número de pratos teóricos e em pH alto não houve importância da concentração de amoníaco, obtendo-se altos valores de pratos teóricos.

Figura 58. Gráficos: Normal e de Pareto para R2

Figura 59. Gráfico Fatorial para R2

Figura 60. Gráfico de Interações para R2

Para a resposta R3, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 61) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram o volume de injeção (E), a concentração de amoníaco (B) e a interação entre o pH do tampão e o volume de injeção (AE), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 61) permite avaliar que os fatores E e AE tem efeito antagônico com B e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 62) e o gráfico de interações (Figura 63) demonstram que valores menores de volume de injeção (E) e maiores de concentração de amoníaco (B) geram maiores valores de pureza de pico. Além disso, em pH baixo não há diferenças de pureza de pico injetando-se volumes altos ou baixos. Por outro lado, em pH alto, quanto menor o volume de injeção maior foi a pureza de pico.

Figura 61. Gráficos: Normal e de Pareto para R3

Figura 62. Gráfico Fatorial para R3

Figura 63. Gráfico de Interações para R3

Para a resposta R4, observou-se através dos gráficos normal e de pareto (Figura 64) que o único parâmetro significativo foi o pH do tampão (A).

O gráfico fatorial (Figura 65) e o gráfico de interações (Figura 66) demonstram que diminuindo-se os valores de pH do tampão obteve-se maiores valores de fator capacidade.

Figura 64. Gráficos: Normal e de Pareto para R4

Figura 65. Gráfico Fatorial para R4

Figura 66. Gráfico de Interações para R4

Para a resposta R5, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 67) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB) e a interação entre o pH do tampão e o fluxo (AD), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 67) permite avaliar que o fator AB tem efeito antagônico com AD. Já o gráfico de interações (Figura 69) demonstra que em pH baixo não há diferenças na resolução entre as impurezas 2 e 3 utilizando concentrações altas ou baixas de amoníaco. Por outro lado, em pH alto, a resolução entre os picos das impurezas 2 e 3 aumentaram em concentração baixa de amoníaco e diminuíram em concentração alta de amoníaco. Além disso, em pH baixo, a resolução entre as impurezas 2 e 3 aumentou com

fluxo baixo. Por outro lado, em pH alto, a resolução entre as impurezas 2 e 3 diminuiu em fluxo baixo.

Figura 67. Gráficos: Normal e de Pareto para R5

Figura 68. Gráfico Fatorial para R5

Figura 69. Gráfico de Interações para R5

Para a resposta R6, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 70) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB) e o tempo do segundo gradiente (G), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 70) permite avaliar que os fatores AB e G tem efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 71) e o gráfico de interações (Figura 72) demonstram que valores maiores de tempo do segundo gradiente (G) geram respostas maiores. Além disso, em pH baixo, os melhores resultados de resolução entre os picos das impurezas 3 e 4 foram obtidos com concentração baixa de amoníaco. O inverso ocorreu em pH alto.

Figura 70. Gráficos: Normal e de Pareto para R6

Figura 71. Gráfico Fatorial para R6

Figura 72. Gráfico de Interações para R6

Para a resposta R7, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 73) que os parâmetros significativos foram o pH do tampão (A), a concentração de amoníaco (B) e a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 73) permite avaliar que os fatores A e AB tem efeito antagônico com B e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 74) e o gráfico de interações (Figura 75) demonstram que valores menores de pH (A) e maiores de concentração de amoníaco (B) geram maiores resoluções entre as impurezas K e H. Além disso, em pH baixo foi necessária uma concentração de amoníaco alta para aumentar a resolução entre as impurezas K e H. Por outro lado, em pH alto não houve importância da concentração de amoníaco, obtendo-se baixas resoluções entre as impurezas K e H.

Figura 73. Gráficos: Normal e de Pareto para R7

Figura 74. Gráfico Fatorial para R7

Figura 75. Gráfico de Interações para R7

Para a resposta R8, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 76) que os parâmetros significativos foram a concentração de amoníaco (B), a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB) e o pH do tampão (A), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 76) permite avaliar que os fatores A e B tem efeito antagônico com AB e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 77) e o gráfico de interações (Figura 78) demonstram que valores maiores de pH (A) e de concentração de amoníaco (B) geram maiores resoluções entre o ativo e a impureza anterior a ele. Além disso, em pH baixo foi necessária uma concentração de amoníaco alta para aumentar resolução entre o ativo e a impureza anterior a ele. Por outro lado, em pH alto, não houve importância da concentração de amoníaco, obtendo-se altas resoluções entre o ativo e a impureza anterior a ele.

Figura 76. Gráficos: Normal e de Pareto para R8

Figura 77. Gráfico Fatorial para R8

Figura 78. Gráfico de Interações para R8

Para a resposta R9, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 79) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram o tempo do segundo gradiente (G), o fluxo (D) e pH do tampão (A), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 79) permite avaliar que os fatores G e D tem efeito antagônico com A, e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 80) e o gráfico de interações (Figura 81) demonstram que aumentando o tempo do segundo gradiente (G) e o fluxo (D), aumenta-se a resolução entre o ativo e a impureza posterior a ele. Adicionalmente, diminuindo-se os valores de pH do tampão aumentou-se a resolução entre o ativo e a impureza posterior a ele.

Figura 79. Gráficos: Normal e de Pareto para R9

Figura 80. Gráfico Fatorial para R9

Figura 81. Gráfico de Interações para R9

Para a resposta R10, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 82) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram o pH do tampão (A), a concentração de amoníaco (B) e a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 82) permite avaliar que os fatores A e B tem efeito antagônico com AB, e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 83) e o gráfico de interações (Figura 84) demonstram que diminuindo o pH (A) e a concentração de amoníaco (B), aumentou-se a resolução entre as impurezas O e P. Além disso, em pH baixo, aumentou-se a resolução entre as impurezas O e P quando diminui-se a concentração de amoníaco. Por outro lado, em pH alto, as resoluções entre as impurezas O e P foram baixas, independente da concentração de amoníaco.

Figura 82. Gráficos: Normal e de Pareto para R10

Figura 83. Gráfico Fatorial para R10

Figura 84. Gráfico de Interações para R10

Para a resposta R11, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 85) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram o volume de injeção (E) e o fluxo (D), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 85) permite avaliar que os fatores D e E tem efeito antagônico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 86) e o gráfico de interações (Figura 87) demonstram que o aumento do volume de injeção (E) e a diminuição do Fluxo (D), conduziram a aumento do sinal ruído da impureza D.

Figura 85. Gráficos: Normal e de Pareto para R11

Figura 86. Gráfico Fatorial para R11

Figura 87. Gráfico de Interações para R11

Para a resposta R12, observou-se através do gráfico de pareto (Figura 88) que nenhum parâmetro foi significativo, porém os mais importantes foram a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB), o tempo de gradiente inicial (F) e o tempo do segundo gradiente (G), em ordem decrescente de importância.

O gráfico normal (Figura 88) permite avaliar que os fatores AB e G tem efeito antagônico com F, e efeito sinérgico entre si. Já o gráfico fatorial (Figura 89) e o gráfico de interações (Figura 90) demonstram que o aumento do tempo do gradiente inicial (F) e a diminuição do tempo do segundo gradiente (G), aumentaram a diferença entre o tempo de retenção da impureza na amostra oxidativa e da impureza conhecida mais próxima na mistura de padrões de impurezas. Além disso, em pH baixo foi necessária uma

7.2.3. Considerações Finais

A variável pH do tampão (A) mostrou relevância para cinco respostas, sendo a mais importante em duas delas. Já o fator concentração de amoníaco (B), além de ser crítico para três respostas, também mostrou ser o mais relevante dentre todos os fatores para duas outras respostas. Além disso, a interação entre o pH do tampão e a concentração de amoníaco (AB) também foi muito relevante para três das respostas. Sendo assim, esses dois parâmetros foram escolhidos para otimização, considerando-se o intervalo de pH entre 2,8 a 4,4, e o intervalo de concentração de amoníaco de 0,5% a 4,5%.

O fator temperatura da coluna (C) não se mostrou relevante para nenhuma resposta, sendo assim optou-se por fixar a temperatura em 25°C para a próxima etapa do estudo.

O parâmetro fluxo (D) não se mostrou relevante para nenhuma resposta, porém mostrou importância secundária apenas para duas respostas. Sendo assim, este fator foi fixado em 0,7 mL/min para a próxima etapa do estudo.

A variável volume de injeção (E) foi relevante para duas respostas, R3 (pureza de pico) e R11 (sinal ruído). Para R3, foram obtidos melhores resultados com menor volume de injeção, enquanto que para R11 foram obtidos melhores resultados com maior volume de injeção. Nesse caso, optou-se por priorizar o sinal ruído do método de produtos de degradação e, posteriormente, diminuir o volume de injeção para a amostra de teor. Sendo assim, esse parâmetro foi escolhido para otimização, sendo o nível baixo o valor de 5µL e o nível alto o valor de 13µL.

O fator tempo de gradiente inicial (F) se mostrou o mais relevante para uma das respostas e teve importância secundária para mais uma, sendo os melhores resultados sempre com o maior tempo de gradiente inicial. Assim, o tempo de 10 minutos foi fixado para a próxima etapa do estudo.

O parâmetro tempo do segundo gradiente (G) se mostrou relevante para uma resposta e teve importância secundária para outras três respostas. Na maioria das respostas, obteve-se melhores resultados com o menor tempo. Desse modo, este fator teve seu nível fixado em 6 minutos para a próxima etapa do estudo.

Sendo assim, os parâmetros que foram mantidos fixos para a etapa de otimização e seus níveis foram:

- Temperatura: 25°C
- Fluxo: 0,7 mL/min
- Tempo do gradiente inicial: 10 minutos
- Tempo do segundo gradiente: 6 minutos

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

- pH do Tampão – 3,6
- Concentração de amoníaco – 2,5%
- Volume de injeção - 9µL

7.3. Delineamento para Otimização

O objetivo do delineamento experimental para otimização foi o desenvolvimento de um método para produtos de degradação de Verapamil, capaz de separar o ativo e suas impurezas com seletividade e no menor tempo de corrida possível.

7.3.1. Respostas avaliadas

Tabela 14. Respostas avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Resposta	Tipo de Amostra	Meta
R1	Fator capacidade	Mistura de padrões de impureza e ativo	≥ 2
R2	Resolução impurezas 3 e 4	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 0,6$
R3	Resolução impurezas K e H	Mistura de padrões de impureza e ativo	$\geq 1,0$
R4	Sinal ruído impureza D	Mistura de padrões de impureza 0,1%	≥ 30
R5	Diferença entre o tempo de retenção da impureza oxidativa e da impureza conhecida mais próxima	Mistura de padrões de impureza e ativo Amostra de degradação oxidativa	$\geq 1,0$

Ref. = Referência

Observação: As respostas relacionadas ao método de teor (assimetria, pratos teóricos e pureza de pico) não foram avaliadas na otimização, pois optou-se por priorizar o método de produtos de degradação e, posteriormente, utilizar o método otimizado diminuindo o volume de injeção para o método de teor.

As respostas denominadas R5, R8, R9 e R10 no delineamento de Triagem II não foram avaliadas na otimização, pois em todos os experimentos desta etapa apresentaram resultado adequado.

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento de compósito central (CCD) com 3 fatores e 5 níveis, que permite modelar superfícies resposta complexas com um número reduzido de experimentos quando comparado ao delineamento fatorial completo de 3 níveis.

7.3.2. Criação dos experimentos

Tabela 15. Variáveis avaliadas no delineamento experimental

Ref.	Nome	Unidade	Inferior	Superior
A	pH do Tampão	Valor numérico	2,8	4,4
B	Concentração de amoníaco	%	0,5	4,5
C	Volume de injeção	μL	5	13

Ref. = Referência

Tabela 16. Experimentos

Variável	A	B	C
Experimento			
1	4,0	1,5	7
2	3,2	3,5	11
3	3,6	0,5	9
4	3,6	2,5	5
5	3,6	2,5	9
6	3,6	2,5	9
7	3,6	2,5	9
8	3,6	2,5	9
9	4,0	3,5	11
10	4,4	2,5	9
11	4,0	3,5	7
12	3,2	1,5	11
13	3,6	4,5	9
14	4,0	1,5	11
15	3,6	2,5	9
16	3,6	2,5	9
17	3,6	2,5	13
18	3,2	3,5	7
19	3,2	1,5	7
20	2,8	2,5	9

7.3.3. Resultados e Discussão

Após a execução dos experimentos delineados na Tabela 16, as respostas obtidas para cada experimento realizado foram plotadas no software Minitab 19 para posterior análise estatística.

Tabela 17. Resultados

Resposta Experimento	R1	R2	R3	R4	R5
1	1,67	4,35	0,30	17,4	1,013
2	1,93	1,43	1,37	40,1	1,214
3	2,44	2,95	16,11	18,7	2,054
4	1,89	0,30	1,88	28,3	1,360
5	1,90	0,01	1,94	33,1	1,380
6	1,89	0,10	1,92	38,8	1,400
7	1,88	0,30	1,94	25,5	1,400
8	1,88	0,10	1,93	34,9	1,407
9	1,70	10,77	0,30	30,3	0,910
10	1,89	1,53	3,54	36,1	1,727
11	1,67	9,70	0,10	33,3	0,945
12	2,39	2,94	10,53	40,6	1,753
13	1,89	5,88	0,60	46,6	0,947
14	1,67	4,73	0,10	42,6	0,974
15	1,89	0,30	1,94	34,4	1,394
16	1,89	0,30	1,89	30,8	1,386
17	1,92	0,01	2,01	39,9	1,387
18	1,92	1,32	1,33	33,6	1,200
19	2,41	3,00	9,40	18,4	1,620
20	2,54	2,92	15,16	23,6	0,960

7.3.3.1. Análise de variância e regressão

Os p-valores determinaram se os coeficientes deveriam ser incluídos ou excluídos do modelo de regressão. Quando o p-valor foi menor do que 0,05 o coeficiente foi incluído no modelo, uma vez que significa que esse coeficiente é significativamente diferente de 0 e, conseqüentemente, a resposta obtida experimentalmente foi afetada pela variação do nível desse fator. Por outro lado, quando o p-valor foi maior que 0,05, significa que a resposta não foi afetada pela variação do nível desse fator e este termo foi

excluído do modelo de regressão. Em alguns casos é necessário manter um termo com p-valor maior do que 0,05 no modelo de regressão, pois existe termo de interação e/ou quadrático que seja relevante. Como o modelo deve ser hierárquico, se o termo A^2 e/ou AB, AC, AD for relevante, é necessário incluir o termo A, mesmo que esse apresente p-valor maior do que 0,05.

O ajuste do modelo de regressão múltipla foi avaliado baseado nos coeficientes de determinação (r^2 ajustado e r^2 predição). O r^2 ajustado é a proporção da variância na resposta que é explicada pelos fatores, ou seja, quanto da resposta é explicada pelos fatores, considerando-se o número de termos do modelo de regressão. O r^2 predição indica o quão bem um modelo de regressão prediz respostas para novas observações e foi 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. Adicionalmente, a razão entre r^2 predição e r^2 ajustado foi calculada de forma a avaliar a capacidade do modelo em prever o comportamento das respostas, a partir da equação da reta.

Além disso, comparou-se 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 foi considerado mal ajustado quando o erro fornecido pela falta de ajuste do modelo de regressão foi significativamente maior do 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).

Nesse caso, os cinco modelos matemáticos apresentam valor de r^2 ajustado maior do que 70% e razão r^2 ajustado/ r^2 predição maior do que 60%. No caso da avaliação da falta de ajuste do modelo, apenas para o modelo de regressão para R4 o p-valor foi acima de 0,05, entretanto todos os outros modelos podem ser considerados bem ajustados, pois apresentam altos coeficientes de determinação. Além disso, a falta de ajuste pode ser considerado o critério menos importante para o ajuste de modelo, pois se os resultados das replicatas do ponto central forem muito semelhantes, dificilmente esse critério será atendido, já que o erro puro aleatório será extremamente baixo.

Tabela 18. Resumo dos resultados de regressão

Resposta	r^2_{ajustado}	$\frac{r^2_{\text{predição}}}{r^2_{\text{ajustado}}} * 100$
R1	90,14%	73,97%
R2	92,77%	70,12%
R3	87,77%	67,22%
R4	72,32%	82,99%
R5	94,18%	89,90%

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

A distribuição normal foi avaliada através do gráfico de probabilidade normal, no qual os resíduos apresentaram-se distribuídos de forma linear (normal) para todos os modelos ajustados. A homocedasticidade ou homogeneidade da variância dos resíduos padronizados foi comprovada para os cinco modelos através do gráfico de dispersão de resíduos, onde 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 do gráfico de resíduos como função da ordem de aquisição, demonstrando que não houve tendência no padrão dos resíduos.

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0828805	92,74%	90,14%	66,68%

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	1,22776	0,245553	35,75	0,000
Linear	2	0,91125	0,455625	66,33	0,000
pH	1	0,65673	0,656729	95,61	0,000
% Hidróxido	1	0,25452	0,254521	37,05	0,000
Quadrado	2	0,19740	0,098701	14,37	0,000
pH*pH	1	0,13830	0,138304	20,13	0,001
% Hidróxido*% Hidróxido	1	0,09297	0,092973	13,53	0,002
Interação com 2 Fatores	1	0,11911	0,119113	17,34	0,001
pH*% Hidróxido	1	0,11911	0,119113	17,34	0,001
Erro	14	0,09617	0,006869		
Falta de ajuste	9	0,09577	0,010641	132,47	0,000
Erro puro	5	0,00040	0,000080	*	*
Total	19	1,32393			

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

FC = 12,98 - 4,529 pH - 1,521 % Hidróxido + 0,453 pH*pH + 0,0594 % Hidróxido*% Hidróxido + 0,3051 pH*% Hidróxido

Figura 91. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R1

Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,864090	94,78%	92,77%	65,06%

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	176,182	35,2363	47,19	0,000
Linear	2	90,825	45,4126	60,82	0,000
pH	1	78,470	78,4701	105,10	0,000
% Hidróxido	1	12,355	12,3552	16,55	0,001
Quadrado	2	101,846	50,9228	68,20	0,000
pH*pH	1	73,391	73,3912	98,29	0,000
% Hidróxido*% Hidróxido	1	34,367	34,3667	46,03	0,000
Interação com 2 Fatores	1	26,572	26,5721	35,59	0,000
pH*% Hidróxido	1	26,572	26,5721	35,59	0,000
Erro	13	9,706	0,7467		
Falta de ajuste	8	9,622	1,2027	70,96	0,000
Erro puro	5	0,085	0,0169	*	*
Total	18	185,888			

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Res 3,4_Mix0,3 = 216,0 - 113,0 pH - 21,25 % Hidróxido + 15,13 pH*pH + 1,146 % Hidróxido*% Hidróxido + 4,556 pH*% Hidróxido

Figura 92. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R2

Método

Transformação de Box-Cox $\lambda = 0,9$

Sumário do Modelo para Resposta Transformada

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
1,29284	90,99%	87,77%	59,00%

Análise de Variância para a Resposta Transformada

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	236,365	47,2731	28,28	0,000
Linear	2	156,508	78,2539	46,82	0,000
pH	1	73,913	73,9130	44,22	0,000
% Hidróxido	1	82,595	82,5947	49,42	0,000
Quadrado	2	58,031	29,0156	17,36	0,000
pH*pH	1	40,830	40,8300	24,43	0,000
% Hidróxido*% Hidróxido	1	27,144	27,1437	16,24	0,001
Interação com 2 Fatores	1	21,826	21,8265	13,06	0,003
pH*% Hidróxido	1	21,826	21,8265	13,06	0,003
Erro	14	23,400	1,6714		
Falta de ajuste	9	23,399	2,5999	9453,47	0,000
Erro puro	5	0,001	0,0003	*	*
Total	19	259,765			

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

Res J-H ou J-G^{0,9} = 170,6 - 71,7 pH - 22,21 % Hidróxido + 7,78 pH*pH
+ 1,015 % Hidróxido*% Hidróxido + 4,13 pH*% Hidróxido

Figura 93. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R3

Método

Transformação de Box-Cox $\lambda = -1$

Sumário do Modelo para Resposta Transformada

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0055069	76,69%	72,32%	60,02%

Análise de Variância para a Resposta Transformada

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	3	0,001597	0,000532	17,55	0,000
Linear	2	0,001162	0,000581	19,16	0,000
% Hidróxido	1	0,000667	0,000667	21,99	0,000
V injeção	1	0,000495	0,000495	16,34	0,001
Interação com 2 Fatores	1	0,000434	0,000434	14,32	0,002
% Hidróxido*V injeção	1	0,000434	0,000434	14,32	0,002
Erro	16	0,000485	0,000030		
Falta de ajuste	11	0,000378	0,000034	1,61	0,313
Erro puro	5	0,000107	0,000021	*	*
Total	19	0,002082			

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

-SN D_Mix 0,1%⁻¹ = -0,1570 + 0,03961 % Hidróxido + 0,01199 V injeção
- 0,003684 % Hidróxido*V injeção

Figura 94. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R4

Método

Transformação de Box-Cox $\lambda = -0,5$

Linhas não usadas 1

Sumário do Modelo para Resposta Transformada

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,0232650	95,94%	94,78%	89,90%

Análise de Variância para a Resposta Transformada

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	4	0,179157	0,044789	82,75	0,000
Linear	2	0,134289	0,067144	124,05	0,000
pH	1	0,070613	0,070613	130,46	0,000
% Hidróxido	1	0,063676	0,063676	117,64	0,000
Quadrado	1	0,091395	0,091395	168,86	0,000
pH*pH	1	0,091395	0,091395	168,86	0,000
Interação com 2 Fatores	1	0,005479	0,005479	10,12	0,007
pH*% Hidróxido	1	0,005479	0,005479	10,12	0,007
Erro	14	0,007578	0,000541		
Falta de ajuste	9	0,007531	0,000837	90,58	0,000
Erro puro	5	0,000046	0,000009	*	*
Total	18	0,186735			

Equação de Regressão em Unidades Não codificadas

$-Tr_{oxid}^{-0,5} = -6,213 + 3,452 \text{ pH} - 0,2986 \% \text{ Hidróxido} - 0,5329 \text{ pH}^2 + 0,0654 \text{ pH}^2 \% \text{ Hidróxido}$

Figura 95. Resultado da análise de variância (ANOVA) e regressão para R5

7.3.3.2. Análise Gráfica

Como pode ser visto na Figura 96, os fatores pH (A) e concentração de amoníaco (B) influenciaram a resposta R1, assim como houve interação entre esses dois fatores. O fator capacidade aumentou com a redução do pH e da concentração de amoníaco.

Além disso, em pH baixo o fator capacidade aumentou com a utilização de baixa concentração de amoníaco. Por outro lado, em pH alto, o fator capacidade foi baixo e apresentou um leve aumento com alta concentração de amoníaco.

Figura 96. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R1

Como pode ser visto na Figura 97, os fatores pH (A) e concentração de amoníaco (B) influenciaram a resposta R2, assim como houve interação entre esses dois fatores. A resolução entre as impurezas 3 e 4 aumentou em baixo pH, diminuiu em pH intermediário e aumentou acentuadamente em pH alto. Comportamento semelhante foi obtido considerando-se a concentração de amoníaco, porém em concentração alta o aumento da resolução entre as impurezas 3 e 4 foi menos acentuado.

Além disso, em pH baixo a resposta aumentou com a utilização de baixa concentração de amoníaco, em pH intermediário a resposta diminui independente da concentração de amoníaco e em pH alto a resposta é maior com a utilização de maior concentração de amoníaco.

Figura 97. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R2

Como pode ser visto na Figura 98, os fatores pH (A) e concentração de amoníaco (B) influenciaram a resposta R3, assim como houve interação entre esses dois fatores. A resolução entre as impurezas K e H aumentou em baixo pH, diminuiu em pH intermediário e aumentou acentuadamente em pH alto. Comportamento semelhante foi observado para a concentração de amoníaco, porém em concentração alta o aumento da resolução entre as impurezas K e H foi menos acentuado.

Além disso, em pH baixo a resposta aumentou com a utilização de baixa concentração de amoníaco, em pH intermediário a resposta diminui independente desse fator e em pH alto a resposta foi maior com a utilização de maior concentração de amoníaco.

Figura 98. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R3

Como pode ser visto na Figura 99, os fatores concentração de amoníaco (B) e volume de injeção (C) influenciaram a resposta R4, assim como houve interação entre esses dois fatores. O sinal ruído da impureza D aumentou com o aumento da concentração de amoníaco e do volume de injeção.

Figura 99. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R4

Como pode ser visto na Figura 100, os fatores pH (A) e concentração de amoníaco (B) influenciaram a resposta R5, assim como houve interação entre esses dois fatores. A diferença entre os tempos de retenção da impureza desconhecida na amostra oxidativa e a impureza mais próxima na mistura de padrões aumentou em pH intermediário e diminuiu acentuadamente em pH alto. A diferença entre os tempos de retenção foi maior em baixa concentração de amoníaco quando comparado às respostas obtidas em alta concentração de amoníaco.

Além disso, em toda faixa de pH a resposta aumentou com a utilização de baixa concentração de amoníaco.

Figura 100. Gráfico fatorial de efeitos principais e interações para R5

7.3.4. Definição do Método Analítico

7.3.4.1. Avaliação dos resultados

Como pode ser visto no gráfico da Figura 101, as regiões de coloração verde com preenchimento liso definem a combinação de fatores (pH e concentração de amoníaco) onde a resposta foi considerada adequada. Conforme a coloração verde vai ficando mais escura o fator capacidade aumenta, ou seja, os melhores resultados foram encontrados na combinação de baixo pH e baixa concentração de amoníaco. Nas regiões de coloração verde com preenchimento quadriculado a resposta foi considerada inadequada. O gráfico da Figura 102 é a mesma representação da Figura 101, porém em escala tridimensional.

Figura 101. Gráfico de contorno para R1

Figura 102. Gráfico de superfície para R1

Como pode ser visto no gráfico da Figura 103, as regiões de coloração verde e azul com preenchimento liso definem a combinação de fatores (pH e concentração de amoníaco) onde a resposta foi considerada adequada. Conforme a coloração vai se tornando verde escura a resolução entre as impurezas 3 e 4 aumenta, ou seja, os melhores resultados foram encontrados na combinação de baixo pH e baixa concentração de amoníaco ou alto pH e alta concentração de amoníaco. Nas regiões de coloração azul escura e com preenchimento quadriculado a resposta foi considerada inadequada. O gráfico da Figura 104 é a mesma representação da Figura 103, porém em escala tridimensional.

Figura 103. Gráfico de contorno para R2

Figura 104. Gráfico de superfície para R2

Como pode ser visto no gráfico da Figura 105, as regiões de coloração verde e azul com preenchimento liso definem a combinação de fatores (pH e concentração de amoníaco) onde a resposta foi considerada adequada. Conforme a coloração vai se tornando verde escura a resolução entre as impurezas K e H aumenta, ou seja, os melhores resultados foram encontrados na combinação de baixo pH e baixa concentração de amoníaco. Nas regiões de coloração azul escura e com preenchimento quadriculado a resposta foi considerada inadequada. O gráfico da Figura 106 é a mesma representação da Figura 105, porém em escala tridimensional.

Figura 105. Gráfico de contorno para R3

Figura 106. Gráfico de superfície para R3

Como pode ser visto no gráfico da Figura 107, as regiões de coloração verde e azul com preenchimento liso definem a combinação de fatores (pH e concentração de amoníaco) onde a resposta foi considerada adequada. Conforme a coloração vai se tornando verde escura o sinal ruído da impureza D aumenta. Nas regiões de coloração azul escura e com preenchimento quadriculado a resposta foi considerada inadequada. O gráfico da Figura 108 é a mesma representação da Figura 107, porém em escala tridimensional.

Como o volume de injeção afetou apenas o sinal ruído da impureza D, optou-se por escolher o volume de injeção de 10 μ L para o método de produtos de degradação.

Figura 107. Gráfico de contorno para R4

Figura 108. Gráfico de superfície para R4

Como pode ser visto no gráfico da Figura 109, as regiões de coloração verde e azul com preenchimento liso definem a combinação de fatores (pH a concentração de amoníaco) onde a resposta foi considerada adequada. Conforme a coloração vai se tornando verde escura a diferença entre os tempos de retenção da impureza oxidativa e da impureza conhecida mais próxima aumenta, ou seja, os melhores resultados foram encontrados na combinação de pH intermediário e baixa concentração de amoníaco. Nas regiões de coloração azul escura e com preenchimento quadriculado a resposta foi considerada inadequada. O gráfico da Figura 110 é a mesma representação da Figura 109, porém em escala tridimensional

Figura 109. Gráfico de contorno para R5

Figura 110. Gráfico de superfície para R5

As figuras mostradas anteriormente (Figura 101 a Figura 110) são os resultados de como os fatores influenciam as respostas individualmente. A definição das condições analíticas ideais foi obtida por meio da sobreposição dos gráficos de contorno, de forma a obter região em que as respostas estiveram dentro da meta definida no item 7.3.1. Na Figura 111, pode-se observar essa região de concepção para operação do método (MODR – *Method Operable Design Region*) (área branca) dentro da qual foi possível atingir os critérios mínimos de fator capacidade, resolução entre as impurezas 3 e 4, resolução entre as impurezas K e H, sinal ruído e diferença entre tempos de retenção da impureza oxidativa e da impureza conhecida mais próxima.

Figura 111. Gráfico de contorno sobreposto (pH x Concentração de amoníaco)

Sendo assim, as condições analíticas ideais otimizadas para o método de produtos de degradação foram:

- Volume de injeção: 10 µL
- pH: 3,0
- Concentração de amoníaco: 2,0%

Para o método de teor optou-se por usar os mesmos parâmetros anteriores, porém diminuindo o volume de injeção para 2 µL para garantir que o pico esteja dentro dos limites de quantificação do detector.

7.3.4.2. Método Analítico Otimizado

7.3.4.2.1. Teor de Verapamil

Tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0:

Pesar 0,63 g de formiato de amônio em um béquer de 2 L, adicionar 1 L de água purificada e agitar até dissolver. Homogeneizar e acertar o pH para 3,0 com ácido fórmico ou amoníaco em solução 25%. Homogeneizar e filtrar através de membrana 0,45 µm.

Amoníaco 2,0% em Acetonitrila:

Em um béquer de 2 L, adicionar 980 mL de Acetonitrila e 20 mL de amoníaco em solução 25%. Homogeneizar e não filtrar.

Diluyente:

Preparar uma mistura de Tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0 e Metanol (70:30). Homogeneizar.

Fase Móvel:

- Fase Móvel A: Tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0
- Fase Móvel B: Amoníaco 2,0% em Acetonitrila

Solução Padrão:

Pesar 10 mg de Cloridrato de Verapamil padrão e transferir para um balão volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL do diluyente. Agitar em banho de ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com o diluyente, homogeneizar e filtrar em filtro de nylon 0,45µm para vial de HPLC. (Concentração teórica: 400 µg/mL de Cloridrato de Verapamil)
(Reservar o padrão para o teste de produtos de degradação)

Solução Amostra – Cloridrato de Verapamil 80 mg

Pesar 140 mg da amostra (equivalente a 40 mg de Cloridrato de Verapamil) para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL do diluyente, agitar em banho de ultrassom por 30 minutos e mecanicamente por mais 30 minutos. Completar o volume com o diluyente, homogeneizar e filtrar em filtro de nylon 0,45µm para vial de HPLC. (Concentração

teórica: 400 µg/mL de Cloridrato de Verapamil) (**Reservar a amostra para o teste de produtos de degradação**)

Condições Cromatográficas:

Coluna: XSelect CSH C18 (100 mm x 4,6 mm x 3,5 µm)

Temperatura da coluna: 25°C

Temperatura amostrador: 10°C

Detector: UV a 278 nm

Fluxo: 0,7 mL/min

Volume de injeção: 2 µL

Tempo de retenção aproximado do Verapamil: 16 minutos

Tempo de corrida: 30 minutos

Tipo de eluição: Gradiente

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,0	90	10
10,0	50	50
16,0	10	90
24,0	10	90
24,1	90	10
30,0	90	10

Figura 112. Cromatograma do método de teor otimizado – Padrão

7.3.4.2.2. Produtos de Degradação

Solução padrão:

Pipetar 1,0 mL da solução padrão descrita no teste de Teor para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em filtro de nylon 0,45µm para vial de HPLC. (Concentração teórica: 4 µg/mL de Cloridrato de Verapamil)

Solução Amostra:

Vide item Teor.

Condições cromatográficas:

Volume de injeção: 10 µL

Outras condições: Vide item Teor

Solução Placebo – Cloridrato de Verapamil 80 mg:

Pesar 100 mg de placebo e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 70 mL de diluente e levar ao banho de ultrassom por 30 minutos. Completar o volume com o diluente, homogeneizar e filtrar em filtro de nylon 0,45µm para vial de HPLC.

Figura 113. Cromatograma do método otimizado – Mistura de padrões

Peak Number	Name	Retention Time	Area	Area Percent	Asymmetry	Theoretical plates (USP)	Resolution (USP)	Capacity factor
1	Imp.	4,060	5014974	0,81	1,17	20085	0,00	2,41
2	Imp. B	4,393	1610884	0,26	1,06	28258	3,04	2,69
3	Imp. C	4,647	1506117	0,24	1,11	31641	2,42	2,90
4	Imp. D	4,953	653262	0,11	1,10	34971	2,91	3,16
5	Imp. E	6,213	2017685	0,33	1,00	54468	11,86	4,22
6	Imp. A	6,627	478050	0,08	1,12	69826	3,91	4,57
7	Imp. G	8,940	9389702	1,51	1,07	75756	19,70	6,51
8	Imp. J	14,120	1780263	0,29	1,00	228327	41,75	10,87
9	Imp. K	14,427	1638876	0,26	0,98	244223	2,61	11,12
10	Imp. H	15,627	856858	0,14	0,93	347717	10,77	12,13
11	Verapamil	16,253	591252397	95,36	1,15	285418	5,50	12,66
12	Imp. O	16,553	1420517	0,23	1,11	368758	2,60	12,91
13	Imp. P	17,133	634609	0,10	0,95	461552	5,53	13,40
14	Imp. P	17,267	924574	0,15	1,43	389108	1,26	13,51
15	Imp. M	19,127	271800	0,04	1,01	831666	19,11	15,07
16	Imp. M	19,240	587835	0,09	1,13	571472	1,22	15,17
Totals			620038403	100,00				

Figura 114. Resultados do método otimizado – Mistura de padrões

Figura 115. Cromatograma do método otimizado – Mistura de padrões 0,1%

DAD: Signal A, 278.0 nm/Bw:4.0 nm Results			
Name	TR	Area	S/N
Imp.	4,060	1306844	225,84
Imp. B	4,400	527667	95,39
Imp. C	4,660	494710	92,52
Imp. D	4,967	198542	37,74
Imp. E	6,213	653868	123,25
Imp. A	6,633	214524	37,66
Imp. G	8,940	3034299	463,29
Imp. J	14,113	564739	96,24
Imp. K	14,440	457529	82,14
Imp. H	15,633	193997	40,99
Verapamil	16,280	398550	44,33
Imp. O	16,560	608971	97,10
Imp. P	17,133	187287	38,81
Imp. P	17,267	311914	55,95
Imp. M	19,240	196636	39,28
Totals		9350077	

Figura 116. Resultados do método otimizado – Mistura de padrões 0,1%

8. Robustez e Definição de System Suitability por Quality by Design

Na avaliação da robustez e definição do *system suitability* foi utilizado o delineamento de Plackett-Burman, pois este permite avaliar um grande número de variáveis com um número reduzido de experimentos.

Determinou-se uma região ao redor do ponto central para os testes, porém ainda dentro da região de operação do método (área branca), como demonstrado na Figura 117. A área determinada pela linha tracejada em vermelho é a região de interesse para a determinação da robustez.

Figura 117. Gráfico de contorno sobreposto (delimitação de área de trabalho)

Além dos fatores testados na etapa de otimização do método analítico foram analisados outros possíveis parâmetros comumente avaliados na robustez analítica e cromatográfica. Os parâmetros avaliados estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19. Parâmetros avaliados

Parâmetro	Inferior	Superior
pH da Fase Móvel	2,9	3,1
Proporção de amoníaco Fase Móvel B	1,5%	2,5%
Temperatura da Coluna	24°C	26°C
Fluxo da Fase Móvel	0,6 mL/min	0,8 mL/min
Coluna	01	02
Equipamento	01	02
Tempo de extração	25 minutos	35 minutos

8.1. Criação dos experimentos

Para esse tipo de avaliação foi proposto o delineamento experimental por Plackett-Burman com 7 fatores e 2 níveis, conforme a Tabela 20.

Tabela 20. Delineamento experimental

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop amon	Temp	Coluna	Equip	T extração
1	2,9	0,6	1,5	24	1	1	25
2	3,1	0,8	1,5	26	1	1	25
3	3,1	0,6	2,5	24	1	1	35
4	2,9	0,8	2,5	24	2	1	25
5	2,9	0,6	2,5	26	2	1	35
6	3,1	0,8	1,5	26	2	1	35
7	2,9	0,8	1,5	24	1	2	35
8	2,9	0,8	2,5	26	1	2	35
9	3,1	0,6	2,5	26	1	2	25
10	2,9	0,6	1,5	26	2	2	25
11	3,1	0,6	1,5	24	2	2	35
12	3,1	0,8	2,5	24	2	2	25

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da fase móvel, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop amon: Proporção de amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Equip: Equipamento, T extração: Tempo de extração (minutos).

8.2. Resultados e Discussão

8.2.1. Avaliação da Robustez

A recuperação da amostra foi avaliada frente a uma amostra controle preparada conforme o método definido no item 7.3.4. A avaliação de que pequenas alterações nos níveis de cada variável testada não é relevante estatisticamente para causar mudanças na recuperação foi realizada pelo software Minitab 19.

Tabela 21. Resultados de recuperação

Experimento	Recuperação	Recuperação
	Teor	Produtos de Degradação
Controle	100,0%	100,0%
1	99,2%	96,3%
2	99,8%	102,8%
3	99,3%	95,4%
4	100,2%	98,5%
5	99,2%	96,5%
6	99,4%	98,9%
7	99,9%	99,5%
8	99,7%	97,7%
9	100,9%	95,9%
10	99,2%	104,9%
11	99,2%	97,3%
12	99,8%	101,1%
Mínimo	99,2%	95,4%
Máximo	100,2%	104,9%

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	1,78655	0,25522	0,88	0,587
Linear	7	1,78655	0,25522	0,88	0,587
pH	1	0,06206	0,06206	0,21	0,667
Fluxo	1	0,24728	0,24728	0,85	0,408
Prop amonia	1	0,45677	0,45677	1,58	0,277
Temp	1	0,03610	0,03610	0,12	0,742
Coluna	1	0,27938	0,27938	0,96	0,382
Equip	1	0,25271	0,25271	0,87	0,403
T extração	1	0,45225	0,45225	1,56	0,280
Erro	4	1,15813	0,28953		
Total	11	2,94469

Figura 118. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para recuperação de teor

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	73,242	10,463	1,15	0,474
Linear	7	73,242	10,463	1,15	0,474
pH	1	2,129	2,129	0,23	0,654
Fluxo	1	19,161	19,161	2,10	0,221
Prop amonia	1	10,825	10,825	1,19	0,337
Temp	1	11,205	11,205	1,23	0,330
Coluna	1	3,458	3,458	0,38	0,571
Equip	1	1,965	1,965	0,22	0,667
T extração	1	24,498	24,498	2,69	0,177
Erro	4	36,477	9,119		
Total	11	109,719

Figura 119. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para recuperação de produtos de degradação

Em todos os experimentos realizados, as recuperações encontradas estiveram dentro do especificado pela tabela da AOAC (31) em relação a amostra controle, sendo de 98 a 102% para o método de Teor e de 95 a 105% para o método de Produtos de Degradação.

As análises estatísticas demonstram que nenhuma das variáveis testadas apresentam efeito sobre o resultado de recuperação do ativo presente na formulação, todas obtendo $p\text{-valor} > 0,05$.

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

8.2.2. Definição do *System Suitability*

8.2.2.1. Teor

A definição do system suitability do método de teor foi realizada através da injeção de uma solução padrão do ativo, sendo avaliadas as respostas: pratos teóricos, tempo de retenção e assimetria do pico.

A relevância de cada variável testada foi avaliada estatisticamente pelo software Minitab 19. Em sequência foi realizada a predição com intervalo de confiança de 95% para cada resposta utilizando a combinação de variáveis nos níveis em que geram resultados mais críticos. Também foram determinados os fatores principais para cada resposta de acordo com a influência dos quadrados médios (QM) da análise de ANOVA, para controle e melhoria do método.

Tabela 22. Resultados - teor

Experimento	Pratos Teóricos	Assimetria	Tempo de Retenção (minutos)
1	262198	1,136	17,080
2	281800	1,109	15,773
3	278630	1,075	17,167
4	299845	1,073	15,867
5	289534	1,072	17,287
6	296685	1,019	15,700
7	253343	1,127	15,587
8	277950	1,104	15,760
9	279193	1,177	17,153
10	273937	1,230	16,940
11	285942	1,192	17,033
12	390345	1,139	15,693

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	10629229295	1518461328	2,51	0,196
Linear	7	10629229295	1518461328	2,51	0,196
pH	1	2022491745	2022491745	3,34	0,142
Fluxo	1	1419927096	1419927096	2,35	0,200
Prop amonia	1	2175997872	2175997872	3,59	0,131
Temp	1	422500801	422500801	0,70	0,451
Coluna	1	3439972856	3439972856	5,68	0,076
Equip	1	225489360	225489360	0,37	0,575
T extração	1	922849563	922849563	1,52	0,285
Erro	4	2422045171	605511293		
Total	11	13051274466

Figura 120. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para pratos teóricos

Tabela 23. Porcentagem de influência sobre a resposta pratos teóricos

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	2022491745	18,00%
Fluxo	1419927096	12,64%
Proporção de amoníaco	2175997872	19,37%
Temperatura	422500801	3,76%
Coluna	3439972856	30,62%
Equipamento	225489360	2,01%
Tempo de extração	922849563	8,21%
Erro	605511293	5,39%
Total	11234740586	100,0%

Figura 121. Gráfico fatorial de efeitos principais para pratos teóricos

A predição para a resposta de pratos teóricos foi realizada com o resultado mais crítico (inferior). Dessa forma, o experimento 07 foi o escolhido para essa avaliação.

Tabela 24. Experimento para predição para pratos teóricos

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
07	2,9	0,8	1,5	24	1	2	35

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,8
Prop amonia	1,5
Temp	24
Coluna	1
Equip	2
T extração	35

Predição

		Limite de Confiança	Limite de Predição
Ajuste	EP do Ajustado	Inferior de 95%	Inferior 95%
258114	20091,6	215282	190390

Figura 122. Resultado da predição para pratos teóricos

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	0,036619	0,005231	12,44	0,014
Linear	7	0,036619	0,005231	12,44	0,014
pH	1	0,000080	0,000080	0,19	0,685
Fluxo	1	0,008060	0,008060	19,17	0,012
Prop amonia	1	0,002494	0,002494	5,93	0,072
Temp	1	0,000080	0,000080	0,19	0,685
Coluna	1	0,000001	0,000001	0,00	0,968
Equip	1	0,019602	0,019602	46,63	0,002
T extração	1	0,006302	0,006302	14,99	0,018
Erro	4	0,001682	0,000420		
Total	11	0,038301

Figura 123. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para assimetria

Tabela 25 . Porcentagem de influência sobre a resposta assimetria

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	0,000080	0,22%
Fluxo	0,008060	21,76%
Proporção amoníaco	0,002494	6,73%
Temperatura	0,000080	0,22%
Coluna	0,000001	0,00%
Equipamento	0,019602	52,92%
Tempo de extração	0,006302	17,01%
Erro	0,000420	1,34%
Total	0,037039	100,0%

Figura 124. Gráfico fatorial de efeitos principais para assimetria

A predição para a resposta de assimetria foi realizada com o resultado mais crítico (superior), dessa forma o experimento 10 foi o escolhido para essa avaliação.

Tabela 26. Experimento para predição para assimetria

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
10	2,9	0,6	1,5	26	2	2	25

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,6
Prop amonia	1,5
Temp	26
Coluna	2
Equip	2
T extração	25

Predição

EP do Ajuste	Limite de Confiança Superior de 95%	Limite de Predição Superior de 95%
1,2245	0,0167415	1,26019
		1,28093

Figura 125. Resultado da predição para assimetria

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	5,81314	0,83045	201,87	0,000
Linear	7	5,81314	0,83045	201,87	0,000
pH	1	0,00000	0,00000	0,00	0,993
Fluxo	1	5,71320	5,71320	1388,81	0,000
Prop amonia	1	0,05522	0,05522	13,42	0,022
Temp	1	0,00288	0,00288	0,70	0,450
Coluna	1	0,00000	0,00000	0,00	1,000
Equip	1	0,04177	0,04177	10,15	0,033
T extração	1	0,00007	0,00007	0,02	0,906
Erro	4	0,01645	0,00411		
Total	11	5,82959

Figura 126. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para tempo de retenção

Tabela 27. Porcentagem de influência sobre a resposta tempo de retenção

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	0,00000	0,00%
Fluxo	5,71320	98,21%
Proporção Amoníaco	0,05522	0,95%
Temperatura	0,00288	0,05%
Coluna	0,00000	0,00%
Equipamento	0,04177	0,72%
Tempo de Extração	0,00007	0,00%
Erro	0,00411	0,07%
Total	5,81725	100,0%

Figura 127. Gráfico fatorial de efeitos principais para tempo de retenção

A predição para a resposta de tempo de retenção foi realizada com o resultado mais crítico (inferior e superior), dessa forma os experimentos 07 e 05 foram os escolhidos para essa avaliação.

Tabela 28. Experimento para predição para tempo de retenção

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
07	2,9	0,6	2,5	26	2	1	35
05	2,9	0,8	1,5	24	1	2	35

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,8
Prop amonia	1,5
Temp	24
Coluna	1
Equip	2
T extração	35

Predição

	Limite de Confiança	Limite de Predição
EP do Ajuste	15,5902	15,4785
EP do Ajustado	0,0523689	15,4136

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,6
Prop amonia	2,5
Temp	26
Coluna	2
Equip	1
T extração	35

Predição

	Limite de Confiança	Limite de Predição
EP do Ajuste	17,2548	17,3665
EP do Ajustado	0,0523689	17,4314

Figura 128. Resultado da predição para tempo de retenção (inferior e superior)

Através das predições propostas foram definidos os critérios de *system suitability* para o método de teor, sendo o descrito na Tabela 29.

Tabela 29. Definição de *system suitability* para o método de Teor

Amostra	Resposta	Intervalo avaliado	Predição	System Final
Solução Padrão	Pratos teóricos	Inferior	190390	≥ 190500
	Assimetria	Superior	1,28	$\leq 1,3$
	Tempo de retenção	Inferior	15,41	$\geq 15,4$
		Superior	17,43	$\leq 17,4$

Com os resultados de cada resposta avaliados estatisticamente foi possível identificar quais os principais fatores que influenciam no *system suitability*. Sendo assim, foram estabelecidas as possíveis causas de não atendimento ao *system suitability* e também possíveis resoluções.

Tabela 30. Controle e Melhoria para o método de Teor

Critério não atendido	Fatores	Possível causa	Resolução
Pratos teóricos	Coluna	Perda de eficiência	Regeneração da coluna ou substituição
	Proporção de amoníaco e/ou pH	Fase móvel com proporção de amoníaco ou pH incorreto	Verificar o pH da fase móvel e/ou refazer a fase móvel B
Assimetria	Equipamento e/ou Fluxo	Problemas com a bomba do equipamento	Avaliação da bomba do equipamento
Tempo de retenção	Fluxo	Problemas com a bomba do equipamento	Avaliação da bomba do equipamento

8.2.2.2. Produtos de Degradação

A definição do *System Suitability* do método de produtos de degradação foi realizada através de injeção de uma solução padrão do ativo, sendo avaliadas as respostas: pratos teóricos, tempo de retenção e assimetria do pico.

A relevância de cada variável testada foi avaliada estatisticamente pelo software Minitab 19. Em sequência foi realizada a predição com intervalo de confiança de 95% para cada resposta utilizando a combinação de variáveis nos níveis em que geram resultados mais críticos. Também foram determinados os fatores principais para cada resposta de acordo com a influência dos quadrados médios (QM) da análise de ANOVA, para controle e melhoria do método.

Tabela 31. Resultados – produtos de degradação

Experimento	Pratos Teóricos	Assimetria	Tempo de Retenção (minutos)
1	290617	1,040	17,133
2	290015	1,090	15,800
3	316066	1,078	17,333
4	312012	1,060	15,900
5	311130	1,087	17,280
6	306271	1,027	15,733
7	279710	1,062	15,540
8	308499	1,101	15,813
9	300538	1,101	17,280
10	281352	1,024	16,960
11	307237	1,018	17,253
12	310597	1,081	15,967

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	1547095935	221013705	4,74	0,076
Linear	7	1547095935	221013705	4,74	0,076
pH	1	187270245	187270245	4,02	0,116
Fluxo	1	2225	2225	0,00	0,995
Prop amonia	1	895098191	895098191	19,20	0,012
Temp	1	28320289	28320289	0,61	0,479
Coluna	1	155202685	155202685	3,33	0,142
Equip	1	121467087	121467087	2,61	0,182
T extração	1	159735212	159735212	3,43	0,138
Erro	4	186465368	46616342		
Total	11	1733561302

Figura 129. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para pratos teóricos

Tabela 32. Porcentagem de influência sobre a resposta pratos teóricos

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	187270245	11,75%
Fluxo	2225	0,00%
Proporção amoníaco	895098191	56,16%
Temperatura	28320289	1,78%
Coluna	155202685	9,74%
Equipamento	121467087	7,62%
Tempo de extração	159735212	10,02%
Erro	46616342	2,93%
Total	1593712276	100,0%

Figura 130. Gráfico fatorial de efeitos principais para pratos teóricos

A predição para a resposta de pratos teóricos foi realizada com o resultado mais crítico (inferior), dessa forma o experimento 07 foi o escolhido para essa avaliação.

Tabela 33. Experimento para predição para pratos teóricos

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
07	2,9	0,8	1,5	24	1	2	35

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,8
Prop amonia	1,5
Temp	24
Coluna	1
Equip	2
T extração	35

Predição

	Limite de	Limite de
	Confiância	Predição
EP do	Inferior	Inferior
Ajuste Ajustado	de 95%	95%
287004	5574,73	275119 268213

Figura 131. Resultado da predição para pratos teóricos

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	0,008853	0,001265	4,03	0,098
Linear	7	0,008853	0,001265	4,03	0,098
pH	1	0,000037	0,000037	0,12	0,749
Fluxo	1	0,000444	0,000444	1,41	0,300
Prop amonia	1	0,005084	0,005084	16,20	0,016
Temp	1	0,000690	0,000690	2,20	0,212
Coluna	1	0,002552	0,002552	8,13	0,046
Equip	1	0,000002	0,000002	0,01	0,939
T extração	1	0,000044	0,000044	0,14	0,727
Erro	4	0,001256	0,000314		
Total	11	0,010109

Figura 132. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para assimetria

Tabela 34. Porcentagem de influência sobre a resposta assimetria

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	0,000037	0,40%
Fluxo	0,000444	4,84%
Proporção amoníaco	0,005084	55,46%
Temperatura	0,000690	7,53%
Coluna	0,002552	27,84%
Equipamento	0,000002	0,02%
Tempo de extração	0,000044	0,48%
Erro	0,000314	3,43%
Total	0,009167	100,0%

Figura 133. Gráfico fatorial de efeitos principais para assimetria

A predição para a resposta de assimetria foi realizada com o resultado mais crítico (superior), dessa forma o experimento 08 foi o escolhido para essa avaliação.

Tabela 35. Experimento para predição para assimetria

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
08	2,9	0,8	2,5	26	1	2	35

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,8
Prop amonia	2,5
Temp	26
Coluna	1
Equip	2
T extração	35

Predição

		Limite de Confiança	Limite de Predição
EP do Ajuste	EP do Ajustado	Superior de 95%	Superior de 95%
1,10967	0,0144664	1,14051	1,15843

Figura 134. Resultado da predição para assimetria

Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	7	6,17820	0,88260	127,34	0,000
Linear	7	6,17820	0,88260	127,34	0,000
pH	1	0,04563	0,04563	6,58	0,062
Fluxo	1	6,00102	6,00102	865,80	0,000
Prop amonia	1	0,11098	0,11098	16,01	0,016
Temp	1	0,00563	0,00563	0,81	0,418
Coluna	1	0,00314	0,00314	0,45	0,538
Equip	1	0,01116	0,01116	1,61	0,273
T extração	1	0,00065	0,00065	0,09	0,775
Erro	4	0,02772	0,00693		
Total	11	6,20593

Figura 135. Resultados da análise de variância e gráfico de pareto para tempo de retenção

Tabela 36. Porcentagem de influência sobre a resposta tempo de retenção

Fator	Quadrados Médios (ANOVA)	Influência
pH	0,04563	0,74%
Fluxo	6,00102	97,02%
Proporção amoníaco	0,11098	1,79%
Temperatura	0,00563	0,09%
Coluna	0,00314	0,05%
Equipamento	0,01116	0,18%
Tempo de extração	0,00065	0,01%
Erro	0,00693	0,11%
Total	6,18514	100,0%

Figura 136. Gráfico fatorial de efeitos principais para tempo de retenção

A predição para a resposta de tempo de retenção foi realizada com o resultado mais crítico (inferior e superior), dessa forma os experimentos 07 e 03 foram os escolhidos para essa avaliação.

Tabela 37. Experimento para predição para tempo de retenção

Exp./Variável	pH	Fluxo	Prop Amoníaco	Temp	Coluna	Equipa	Tem Ex
07	2,9	0,8	1,5	24	1	2	35
03	3,1	0,6	2,5	24	1	1	35

Legenda:

Exp.: Ordem do experimento, pH: pH da Fase Móvel A, Fluxo: Fluxo da fase móvel (mL/min), Prop Amoníaco: Proporção de Amoníaco na fase móvel B (%), Temp: Temperatura da coluna (°C), Coluna: coluna utilizada, Equipa: Equipamento, Tem Ex: Tempo de extração (minutos).

Configurações

Variável	Configuração
pH	2,9
Fluxo	0,8
Prop amonia	1,5
Temp	24
Coluna	1
Equip	2
T extração	35

Configurações

Variável	Configuração
pH	3,1
Fluxo	0,6
Prop amonia	2,5
Temp	24
Coluna	1
Equip	1
T extração	35

Predição

	Limite de	Limite de
	Confiança	Predição
EP do	Inferior	Inferior
Ajustado	de 95%	95%
15,602	0,0679763	15,4571
		15,3729

Predição

	Limite de	Limite de
	Confiança	Predição
EP do	Superior	Superior
Ajustado	de 95%	de 95%
17,393	0,0679763	17,5379
		17,6221

Figura 137. Resultado da predição para tempo de retenção (inferior e superior)

Através das predições propostas foram definidos os critérios de *system suitability* para o método de produtos de degradação, sendo o descrito na Tabela 38.

Tabela 38. Definição de *system suitability* para o método de produtos de degradação

Amostra	Resposta	Intervalo avaliado	Predição	System Final
Solução Padrão	Pratos teóricos	Inferior	268213	≥ 268500
	Assimetria	Superior	1,16	$\leq 1,2$
	Tempo de retenção	Inferior	15,37	$\geq 15,4$
		Superior	17,62	$\leq 17,6$

Com os resultados de cada resposta avaliados estatisticamente foi possível identificar quais os principais fatores que influenciam no *system suitability*. Sendo assim, foram estabelecidas as possíveis causas de não atendimento ao *system suitability* e também possíveis resoluções.

Tabela 39. Controle e Melhoria para o método de Produtos de Degradação

Critério não atendido	Fatores	Possível causa	Resolução
Pratos teóricos	Proporção de amoníaco	Fase móvel com proporção de amoníaco incorreta	Refazer a fase móvel B
	Proporção de amoníaco	Fase móvel com proporção de amoníaco incorreta	Refazer a fase móvel B
Assimetria	Coluna	Perda de eficiência	Regeneração da coluna ou substituição
Tempo de retenção	Fluxo	Problemas com a bomba do equipamento	Avaliação da bomba do equipamento

8.3. Conclusão

Com os resultados obtidos foi possível comprovar a robustez analítica e cromatográfica dos métodos de teor e produtos de degradação. Além disso, os critérios de *system suitability* foram definidos de acordo com os dados obtidos no delineamento experimental proposto, possibilitando assim a implementação da etapa de controle e melhoria do método analítico. Sendo assim, pode-se considerar os métodos analíticos robustos em toda região de trabalho delimitada na Figura 117, controláveis e passíveis de melhoria contínua.

9. Validação Analítica

9.1. Procedimento

Os métodos analíticos de teor e produtos de degradação foram submetidos aos testes de validação analítica para comprovar que os mesmos são adequados ao uso.

Os seguintes requisitos devem ser atendidos para que o método seja considerado validado (1), (32):

- 1) Seletividade: o método deve ser capaz de quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra. Esse parâmetro foi avaliado no item 10 Degradação Forçada.
- 2) Linearidade: o método deve ser capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.
- 3) Precisão: o método deve apresentar desvio padrão relativo em conformidade com o preconizado e os grupos analisados devem ser estatisticamente iguais.
- 4) Exatidão: o método deve apresentar recuperação em conformidade com o preconizado.
- 5) Robustez: o método deve apresentar recuperação em conformidade com o preconizado e atender aos critérios de system suitability. Esse parâmetro foi avaliado no item 8. Robustez e Definição de *System Suitability* por Quality by Design.

9.2. Resultados

9.2.1. Teor de Cloridrato de Verapamil

Tabela 40. Resultados validação - Teor

Teste	CrITÉRIOS de aceitaÇÃO	Resultado
Linearidade	Coefficiente de correlaÇÃO $> 0,990$	0,999
	$F < 0,01$	$< 0,0001$
PrecisÃO – Repetibilidade	$DPR \leq 1,3\%$	0,5%
PrecisÃO – IntermediÁria	$DPR \leq 2\%$	0,4%
	$F < 5,05$	4,52
ExatidÃO	Entre 98% e 102%	Mínimo: 100,2% Máximo: 101,8% Média: 101,0%

Através dos resultados obtidos na validação e apresentados na Tabela 40, pode-se concluir que o método foi linear na faixa de 80 a 120% da concentração nominal (320,0 a 480,0 µg/mL). Além disso, o método analítico foi preciso, apresentando desvio padrão relativo inferior a 1,3% em condições de repetibilidade e inferior a 2,0% em condições de precisão intermediária (31). Na avaliação da precisão intermediária, verificou-se que o valor de F calculado se apresenta inferior ao valor do F crítico unicaudal ($< 5,05$), demonstrando assim que não houve diferença entre os resultados de desvio padrão obtidos nos diferentes dias. Através dos resultados de recuperação obtidos, pode-se avaliar que o método foi exato, apresentando recuperação do ativo dentro da faixa de 98 a 102% (31).

Utilizando os resultados de exatidão e precisão intermediária foi calculada a incerteza do método de teor empregando-se a abordagem *top-down*. O valor de incerteza expandida foi de 1,1%, considerando-se um fator de abrangência $k = 2$ para aproximadamente 95% de confiança. O valor de incerteza expandida foi adequado, uma vez que foi inferior a incerteza alvo de 1,25% (incerteza máxima admissível), considerando a especificação do produto de 90% - 110% do valor rotulado de ativo.

9.2.2. Produtos de Degradação

Tabela 41. Resultados validação – Produtos de Degradação

Teste	Critérios de aceitação	Resultado
LQ	Sinal ruído > 10	Sinal ruído: 697,5
LD	-	0,0012 µg/mL (0,0003%)
Linearidade	Coefficiente de correlação > 0,990	> 0,999
	F < 0,01	< 0,0001
Precisão – Repetibilidade	DPR ≤ 3,7%	1,0%
Precisão – Intermediária	DPR ≤ 6%	0,9%
	F < 5,05	1,59
Exatidão	Entre 95% e 105%	Mínimo: 100,8% Máximo: 104,4% Média: 102,5%

Através dos resultados obtidos na validação e apresentados na Tabela 41 pode-se concluir que o método foi linear na faixa de 0,1% a 1,2% da concentração nominal (0,4 a 4,8 µg/mL). Além disso, o método analítico foi preciso, apresentando desvio padrão relativo inferior a 3,7% em condições de repetibilidade e inferior a 6,0% em condições de precisão intermediária (31). Na avaliação da precisão intermediária, verificou-se que o valor de F calculado se apresenta inferior ao valor do F crítico unicaudal (< 5,05), demonstrando assim que não houve diferença entre os resultados de desvio padrão obtidos nos diferentes dias. Através dos resultados de recuperação obtidos, pode-se avaliar que o método foi exato, apresentando recuperação do ativo dentro da faixa de 95 a 105% (31).

9.3. Conclusão

Os métodos analíticos de teor e produtos de degradação foram submetidos aos testes de validação analítica e os resultados obtidos estiveram de acordo com os critérios estabelecidos. Portanto, os métodos analíticos para teor e produtos de degradação do produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos podem ser considerados validados e adequados ao uso. Além disso, a incerteza alvo para o método de teor foi alcançada com sucesso.

10. Degradação Forçada

Com o objetivo de comprovar que o método desenvolvido é indicativo de estabilidade, foi realizado o estudo de degradação forçada no produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos.

A Tabela 42 resume as condições de degradação nas quais o produto foi submetido (33), (34).

Tabela 42. Condições de Degradação

Tipo de estresse	Agente degradante	Concentração do agente degradante	Tempo de exposição	Condição de temperatura	Uso de co-solvente
Hidrólise ácida	HCl	0,1 N	16 dias	70°C	Diluyente
Hidrólise alcalina	NaOH	0,1 N	16 dias	70°C	Diluyente
Oxidação	H ₂ O ₂	3%	12 horas	70°C	Diluyente
Degradação por íons metálicos	FeSO ₄	0,05 N	1 dia	25°C	Diluyente
Térmica seca	70°C ± 5°C	NA	16 dias	70°C	NA
Térmica úmida	70°C ± 5°C / 90% UR ± 5%	NA	16 dias	70°C	NA
Fotólise	2,4 milhões de lux/hr	NA	10 dias	25°C	NA

NA: Não aplicável

O perfil de degradação potencial foi realizado com base nos resultados obtidos durante o estudo de degradação forçada, conforme demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 43. Perfil de degradação potencial

% de Impurezas	Condições de Estresse							
	Controle	Ácido	Alcalino	Oxidativo	Íons Metálicos	Térmica Seca	Térmica úmida	Fotólise
Impureza A	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza B	0,00%	0,14%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza C	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza D	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza E	0,00%	0,72%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza G	0,00%	4,11%	0,10%	0,10%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza H	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza J	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza K	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza M	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza O	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza P	0,00%	0,56%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Impureza Individual ⁽¹⁾	0,00%	4,12%	0,52%	8,97%	0,10%	0,10%	0,05%	0,00%
Impureza Total	0,00%	10,46%	0,83%	9,50%	0,17%	0,10%	0,05%	0,00%

(1) Maior impureza desconhecida encontrada

O produto acabado apresentou-se bastante estável nas condições de estresse por hidrólise alcalina, íons metálicos, térmica seca, térmica úmida e fotolítica. Apresentou degradação relevante na condição de degradação oxidativa, que gerou majoritariamente a impureza desconhecida de tempo de retenção relativo 0,67 (Figura 138). Na hidrólise ácida, surgiram majoritariamente a Impureza G e a impureza desconhecida de tempo de retenção relativo 0,67 (Figura 139).

Figura 138. Cromatograma da amostra de degradação oxidativa

Figura 139. Cromatograma da amostra de degradação ácida

A apresentação de balanço de massas entre 95 a 105% em relação a amostra controle é importante para comprovar a fidelidade do método analítico de produtos de degradação em obter resultados reais das impurezas geradas ao longo da vida de prateleira do produto e da capacidade do método analítico de teor de comprovar que houve redução da quantidade do ativo no produto.

Tabela 44. Tabela dos resultados de Balanço de Massa

Amostra	% de Teor	% Total de Impurezas	% Balanço de Massas	% Balanço de Massas Normalizado
Controle	95,45	0,00	95,45	100,00
Ácida	87,29	10,46	97,75	102,41
Alcalina	96,97	0,83	97,80	102,46
Oxidativa	82,27	9,50	91,77	96,14
Íons Metálicos	94,32	0,17	94,49	98,99
Térmica	94,30	0,10	94,40	98,90
Térmica úmida	97,78	0,05	97,83	102,49
Fotólise	96,60	0,00	96,60	101,20

Os resultados das amostras degradadas demonstraram balanço de massas satisfatório, sendo assim possível comprovar que os métodos desenvolvidos são indicativos de estabilidade. Além disso, pode-se concluir que os métodos apresentam seletividade adequada, pois são capazes de quantificar os analitos de interesse sem interferência dos outros componentes presentes.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- a) As etapas de triagem empregando o delineamento Plackett-Burman e planejamento fatorial fracionado (resolução IV) permitiram identificar o pH do tampão, a concentração de amoníaco na fase móvel e o volume de injeção como fatores relevantes que afetaram o fator capacidade, a resolução entre as impurezas 3 e 4, a resolução entre as impurezas K e H, o sinal ruído da impureza D e a diferença entre os tempos de retenção da impureza oxidativa e da impureza conhecida mais próxima;
- b) Os modelos matemáticos obtidos na etapa de otimização empregando o delineamento de compósito central (CCD) permitiram definir a região de operação do método analítico (MODR – *Method Operable Design Region*), assim como definir as condições analíticas ideais: pH da fase móvel = 3,0; concentração de amoníaco = 2,0%; e volume de injeção de 2 μ L e 10 μ L para os métodos de teor e substâncias relacionadas, respectivamente;
- c) O estudo de robustez permitiu concluir que os métodos de teor e substâncias relacionadas foram robustos na região de operação definida, assim como permitiu estabelecer os critérios de *System Suitability*, possibilitando assim a implementação da etapa de controle e melhoria do método analítico;
- d) Os métodos de teor e substâncias relacionadas foram considerados validados, atendendo aos critérios estabelecidos para os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão;
- e) Os estudos de degradação forçada permitiram concluir que o produto apresentou degradação relevante em condições de estresse oxidativa (gerando impureza desconhecida) e de hidrólise ácida (gerando impureza G e impureza desconhecida). Além disso, foi apresentado balanço de massas satisfatório, comprovando que os métodos analíticos são indicativos de estabilidade.

Diante do exposto, concluímos que os conceitos e ferramentas de Qualidade por *Design Analítico* (AQbD) permitiram o desenvolvimento e otimização racional de método indicativo de estabilidade para teor e substâncias relacionadas para o produto Cloridrato de Verapamil 80 mg comprimidos revestidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ICH, Pharmaceutical Development Q8(R2), International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland). [Online] 2009. <http://www.ich.org>.
2. *Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics*. Peraman R, Bhadraya K, Reddy YP. 2015, Int. J. Anal. Chem., pp. 1-9.
3. *Quality by design (QbD) in analytical sciences: an overview*. Bhutani H, Kurmi M, Singh S, Beg S, Singh B. 8, 2014, Pharma Times., Vol. 46, pp. 71-75.
4. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. 76, 2008, pp. 965-977.
5. Candiotti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014, pp. 123-138.
6. Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug. Develop. Ind. Pharm.* 43, 2017, Vol. 6, pp. 889-901.
7. *Quality by Design (QbD) in Analytical Sciences: An Overview*. BHUTANI, H., SINGH, B. e KURMI, M. 8, Agosto de 2014, Vol. 46, pp. 71-75.
8. USP Validation and Verification Expert Panel, Lifecycle Management of Analytical Procedures: Method Development, Procedure Performance Qualification, and Procedure Performance Verification. [Online] United States Pharmacopeia. [Citado em: 20 de Janeiro de 2018.] https://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN.
9. *Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements*. M. Schweitzer, M. Pohl, M. Hanna-Brown, P. Nethercote, P. Borman, G. Hansen, K. Smith, J. Larew. 2010, Vol. 34, pp. 52-57.
10. *Quality by design approach: regulatory need*. Sangshetti JN, Deshpande M, Zaherr Z, Shinde DB, Arote R. 2017, Arab. J. Chem, Vol. 10, pp. S3412-S3425.

11. *Application of quality by design in the current drug development*. Zhang L, Mao S. 2017, Asian J. Pharm. Sci, Vol. 12, pp. 1-8.
12. *Understanding pharmaceutical quality by design*. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, Woodcock J. 4, 2014, AAPS Journal, Vol. 16, pp. 771-783.
13. Lourenço, Felipe Rebello, et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 54(Special), 2018.
14. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*.
15. Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, Vol. 10, pp. 723-753.
16. Anvisa. Bula para o profissional da saúde - Cloridrato de Verapamil 80 mg. [Online] http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=4988622014&pIdAnexo=2094728.
17. DrugBank. DrugBank. *DrugBank*. [Online] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00661>.
18. Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions. *Chemicalize*. [Online] <https://chemicalize.com/welcome>.
19. *O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações*. Borges, Endler Marcel, Goraieb, Karen e Collins, Carol H. 5, 2012, Química Nova, Vol. 35, pp. 993-1003.
20. *The British Pharmacopeia*. Norwich : TSO, 2019.
21. United States Pharmacopeia. *USP 41*. 2019.
22. *Analytical method development and validation for the analysis of verapamil hydrochloride and its related substances by using ultra performance liquid chromatography*. S. Vijayabaskar, V. Mahalingam, Kalaivani. 137, s.l. : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, pp. 189-195.

23. *Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of related substances in verapamil hydrochloride.* L. Valvo, R. Alimenti, S. Alimont, S. Raimondi, F. Foglietta, F. Campana. 15, s.l. : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, pp. 989-996.
24. *Development and validation of a stability-indicating RPHPLC assay method of Verapamil, its suitability for impurity analysis and characterization of degradation impurities by LC-MS/MS.* P.K. Ragham, K.B. Chandrasekhar. 2016.
25. *Stability Indicating RP-HPLC Method Development and Validation of Simultaneous Estimation of Trandolapril and Verapamil Hydrochloride with Forced Degradation in Studies in Bulk and Commercial Products.* Ganipisetty Lakshmi Aswini, D. Dachinamoorthy, J.V.L.N. Seshagiri Rao. I-4, 2015, Vols. V-4.
26. John Dolan. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. [Online] https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf.
27. Bill Champion. Tips and Tricks of HPLC Separations. [Online] [https://sites.chem.colostate.edu/diverdi/C433/experiments/HPLC/references/Agilent_Tips%20and%20Tricks%20of%20HPLC%20Separation%20\(4-12-2011\).pdf](https://sites.chem.colostate.edu/diverdi/C433/experiments/HPLC/references/Agilent_Tips%20and%20Tricks%20of%20HPLC%20Separation%20(4-12-2011).pdf).
28. Edgar Naegele. Making your LC Method Compatible with Mass Spectrometry. [Online] <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990--7413EN.pdf>.
29. Paula Hong; Patricia McConville. A Complete Solution to Perform a Systematic Screening Protocol for LC Method Development. [Online] <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>.
30. Waters . Care and Use Manual - XSelect Charged Surface Hybrid (CSH) Columns. [Online] <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003396en.pdf>.
31. AOAC. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [Online] http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
32. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°166, de 24 de julho de 2017. [Online] <https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>.
33. Baertschi, W.S., Alsante, K. M. e REED, R. A. *Pharmaceutical Stress Testing: predicting drug degradation.* 2^a. 2011.

34. *RDC 53 de 4 de Dezembro de 2015*. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2015, Diário Oficial da União, p. 53.