

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

Lucas Braga Soares Rodrigues

AQbB aplicado a medicamentos na proposta da Química Verde: caso da associação  
de cafeína e dipirona

SÃO PAULO  
2023

Lucas Braga Soares Rodrigues

AQbB aplicado a medicamentos na proposta da Química Verde: caso da associação  
de cafeína e dipirona

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Orientadora:

Dra. Josiane Souza Pereira Daniel

São Paulo

2023

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUÇÃO .....	7
2. OBJETIVOS .....	10
2.1 Gerais .....	10
2.2 Específicos .....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
4 DESENVOLVIMENTO .....	12
4.1 Química Verde .....	12
4.2 Qualidade por Design Analítico (AQbD) .....	13
4.3 Validação de métodos analíticos .....	20
4.4 Dipirona e Cafeína .....	21
4.5 Proposta de desenvolvimento do método analítico .....	24
4.6 Softwares .....	30
5 CONCLUSÃO .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33

## **Lista de abreviaturas**

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: Atributo Crítico de Método

CMC: Atributo Crítico de Material

CPP: Parâmetros Críticos de Processo

CQA: Atributos Críticos de Qualidade

DoE: Planejamento de Experimentos

DS: Design Space

FDA: Food and Drug Administration

FMEA: Análise de Modo e Efeito de Falha

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

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

QbD: Quality by Design

QTTP: Perfil Alvo de Qualidade do Produto

## RESUMO

RODRIGUES, L. B. S.. AQbB aplicado a medicamentos na proposta da Química Verde: caso da associação de cafeína e dipirona. 2023. no. 37. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras chave: Cafeína. Dipirona. HPLC. Química Verde. AQbD.

**INTRODUÇÃO:** Os princípios da Química Verde levam em consideração o desenvolvimento de produtos e processos que sejam o mais ambientalmente benignos quanto possível, com enfoque na redução dos impactos negativos para a saúde humana e ao meio ambiente. Pode ser combinado com Qualidade por Design Analítico (AQbD), uma abordagem que visa otimizar e reduzir resíduos no desenvolvimento de um método analítico. Tais conceitos podem ser aplicados a um desenvolvimento de método analítico para dipirona e cafeína. **OBJETIVO:** Elaborar uma proposta de método analítico de HPLC para determinação de teor de dipirona e cafeína em comprimidos utilizando abordagem AQbD e princípios de Química Verde, a partir da revisão da literatura. **MATERIAL E MÉTODOS:** O levantamento bibliográfico inicial foi realizado de 20 de dezembro de 2022 a 15 de setembro de 2023, utilizando como palavras-chave: Dipirona; Metamizol; Cafeína; DoE; HPLC; AQbD; Etanol; Sustentável e Química Verde. As palavras-chaves foram utilizadas em diferentes combinações e a pesquisa foi realizada em português, inglês e espanhol. Utilizou-se como base de pesquisa PubMed, Scielo, Google Scholar e ScienceDirect. **RESULTADOS:** O princípio de Química Verde foi aplicado utilizando-se de etanol como constituinte de fase móvel em substituição a solventes orgânicos como acetonitrila e metanol. Verificou-se que a abordagem de AQbD pode representar um passo fundamental na melhoria de desenvolvimento de métodos analíticos. Com os levantamentos realizados a proposta de método consiste em usar a Acclaim® C18 (250,0 × 4,6 mm; partículas de 5,0 µm) como coluna cromatográfica. Taxa de fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> com modo de eluição isocrático e etanol/água (30/70 v/v) com de pH 7,5 ajustado com gotas de água:triétilamina (99:1 v/v). O volume de injeção de 20 µL. A temperatura da coluna 40°C e a detecção em comprimento de onda de 273 nm. Utilizando-se de água como diluente. Verificou-se que a aplicabilidade etanol como

constituente de fase móvel de métodos de HPLC, e a sua maior limitação refere-se a sua viscosidade que acarreta em uma diminuição da durabilidade da coluna cromatográfica, tal impasse pode ser mitigado com o aumento de temperatura da coluna e a diminuição da vazão. CONCLUSÃO: A Química Verde oferece versatilidade na sua aplicação, no contexto de metodologias analíticas de HPLC, o uso de etanol como constituinte de fase móvel pode ser uma alternativa viável, apesar de sua alta viscosidade, que pode ser superada ajustando a vazão e a temperatura. Substituir solventes tóxicos por etanol em métodos de HPLC é relativamente simples, exigindo apenas ajustes nas condições cromatográficas. A abordagem AQbD melhora a eficiência na elaboração de métodos analíticos, reduzindo significativamente os riscos de perdas e testes malsucedidos, resultando em menos resíduos. Tais abordagens combinadas a evolução contínua da tecnologia, incluindo o uso de softwares baseados em Inteligência Artificial, podem desempenhar um papel fundamental na redução de resíduos durante o desenvolvimento analítico.

## ABSTRACT

RODRIGUES, L. B. S.. AQB applied to medicines in the Green Chemistry proposal: the case of the association of caffeine and dipyrone. 2023. no. 37. Pharmacy-Biochemistry Course Conclusion Paper - Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Keywords: Caffeine. Dipyrone. HPLC. Green chemistry. AQB.

**INTRODUCTION:** The principles of Green Chemistry take into account the development of products and processes that are as environmentally benign as possible, with a focus on reducing negative impacts on human health and the environment. It can be combined with Analytical Quality by Design (AQB), an approach that aims to optimize and reduce waste in the development of an analytical method. These concepts can be applied to the development of an analytical method for dipyrone and caffeine. **OBJECTIVE:** To develop a proposal for a HPLC analytical method for determining the content of dipyrone and caffeine in tablets using the AQB approach and Green Chemistry principles, based on a review of the literature. **MATERIAL AND METHODS:** The initial bibliographic survey was carried out from December 20, 2022 to September 15, 2023, using as keywords: Dipyrone; Metamizole; Caffeine; DoE; HPLC; AQB; Ethanol; Sustainable and Green Chemistry. The keywords were used in different combinations and the research was carried out in Portuguese, English and Spanish. PubMed, Scielo, Google Scholar and ScienceDirect were used as search bases. **RESULTS:** The Green Chemistry principle was applied using ethanol as a mobile phase constituent to replace organic solvents such as acetonitrile and methanol. It was found that the AQB approach can represent a fundamental step in improving the development of analytical methods. Based on the surveys carried out, the proposed method consists of using Acclaim® C18 (250.0 × 4.6 mm; 5.0 µm particles) as a chromatographic column. Flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup> with isocratic elution mode and ethanol/water (30/70 v/v) with pH 7.5 adjusted with drops of water:triethylamine (99:1 v/v). The injection volume was 20 µL. Column temperature 40°C and detection at a wavelength of 273 nm. Using Water as a diluent. The applicability of ethanol as a mobile phase constituent in HPLC methods was verified,

and its main limitation is its viscosity, which leads to a reduction in the durability of the chromatographic column; this problem can be mitigated by increasing the temperature of the column and reducing the flow rate. CONCLUSION: Green Chemistry offers versatility in its application. In the context of HPLC analytical methodologies, the use of ethanol as a mobile phase constituent can be a viable alternative, despite its high viscosity, which can be overcome by adjusting the flow rate and temperature. Replacing toxic solvents with ethanol in HPLC methods is relatively simple, requiring only adjustments to the chromatographic conditions. The AQbD approach improves efficiency in the preparation of analytical methods, significantly reducing the risks of losses and unsuccessful tests, resulting in less waste. Such approaches with the continuous evolution of technology, including the use of Artificial Intelligence-based softwares, can play a key role in reducing waste during analytical development.

## 1. INTRODUÇÃO

Os princípios da Química Verde, descritos em 1998 por Anastas e Warner levam em consideração o desenvolvimento de produtos e processos que sejam o mais ambientalmente benignos quanto possível, com enfoque na redução dos impactos negativos para a saúde humana e o meio ambiente. Dentre os princípios descritos estão a prevenção da geração de resíduos e o uso de solventes mais seguros, são pontos que podem ser relacionados diretamente com a Química Analítica (ANASTAS; WARNER, 1998).

O termo "Química Analítica Verde", proposto por J. Namiesnik, levou em consideração a substituição de métodos que utilizam a química clássica por métodos instrumentais, assim minimizando o uso de solventes tóxicos e a quantidade de outros materiais e de amostra. O uso de solventes de baixo nível de toxicidade e provenientes de fontes renováveis viabiliza métodos mais ecológicos (KOEL; KALJURAND, 2006).

Factualmente, ao desenvolver um método analítico, a abordagem OFAT (do inglês, *One Factor At Time*), que consiste em testar cada variável de um método por vez, o que acarreta em um alto número de experimentos. Além disso, outra desvantagem, a partir dessa abordagem não há possibilidade de avaliar a interação entre as variáveis, o que aumenta o risco de encontrar problemas no desenvolvimento do método (CANDIOTI *et al.*, 2014. MOREIRA, 2019).

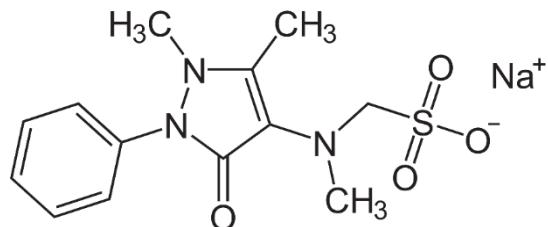
Como contraproposta à abordagem OFAT, se tem a abordagem de Qualidade por Design Analítico (AQbD - do inglês *Analytical Quality by Design*). Ela foi desenvolvida a partir do conceito de Quality by Design (QbD), disposto no Guia ICH Q8(R2), que consiste em “uma abordagem sistemática para desenvolvimento 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” (ICH, 2009) Assim o AQbD utiliza uma série de estratégias e ferramentas que possibilita a otimização do desenvolvimento de métodos analíticos (POLITIS *et al.*, 2017. MOREIRA, 2019). Um exemplo de estratégia aplicada a AQbD é o uso do Planejamento de Experimentos (DoE - do inglês *Design of Experiments*) que envolve identificar fatores envolvidos no processo e fazer uso dessas informações com dados estatísticos que possibilitam a otimização dos testes (POLITIS *et al.*, 2017).

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), do inglês *High Performance Liquid Chromatography*, é a técnica analítica mais

empregada em controle de qualidade farmacêutico, e apresenta diversas variáveis no desenvolvimento do método analítico, por exemplo configurações do instrumento, calibração dos equipamentos envolvidos no procedimento, características da amostra, parâmetros do método, dentre outros (MOREIRA, 2019). Logo, a otimização e uso de estratégias baseadas em Química Verde em métodos de HPLC tem grande potencial para diminuir o impacto negativo ao meio ambiente.

A dipirona sódica, é um fármaco analgésico usualmente indicado para o controle da dor. Seu mecanismo consiste na dessensibilização dos nociceptores periféricos, o que exerce bloqueio direto da hiperalgesia inflamatória. Esse mecanismo provavelmente envolve bloqueio de canais de potássio e ativação da via óxido nítrico - GMPc no nociceptor (VICENTINI *et al.* 2013). A estrutura da dipirona sódica é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Representação da estrutura química da dipirona sódica

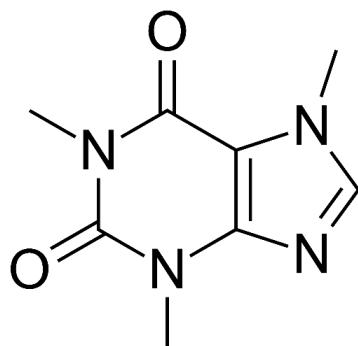


Fonte: NEUROTIKER, 2008.

A adição da cafeína parece modificar o efeito da dipirona sódica no controle da dor, porém o mecanismo de ação dessa associação ainda não está elucidado (VICENTINI *et al.* 2013).

A cafeína é comumente utilizada como fármaco adjuvante de analgésicos e anti-inflamatórios no controle da dor tensional e enxaqueca. O efeito antinociceptivo da cafeína ocorre pelo bloqueio de receptores de adenosina. Também provoca alterações na síntese e atividade de enzimas ciclo-oxigenases, o que favorece a ação analgésica de diversos fármacos indicados para o controle da dor aguda e crônica (DERRY *et al.*, 2012; VICENTINI *et al.* 2013). A estrutura da cafeína é apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Representação da estrutura química da cafeína



Fonte: VACCINATIONIST, 2016.

Alguns métodos de HPLC foram encontrados na literatura científica para a determinação de dipirona e cafeína, nenhum dos métodos usa etanol como fase móvel. A maioria desses métodos gera uma quantidade considerável de resíduos orgânicos, utilizam diluente e fase móvel com solventes orgânicos tóxicos como acetonitrila e metanol. O método para determinação de cafeína e dipirona, publicado por Vieira e colaboradores em 2017, utilizou como diluente e fase móvel acetonitrila/água (65:35 v/v), pH 7,5 usando gotas de água:trietylamina (99:1 v/v). Belal e colaboradores publicaram, em 2014, um método de HPLC para quantificar cafeína, dipirona e cloridrato de drotaverina, utilizaram como um gradiente da fase móvel composta por ácido ortofosfórico 0,05 M e acetonitrila. Altun, em 2001, descreveu um método para análise de paracetamol, dipirona e cafeína com fase móvel de tampão com fosfato de potássio (0,01 M):Metanol:Acetonitrila:Álcool isopropílico (420:20:30:30).

Diante do cenário da importância de preservar o meio ambiente, o presente estudo tem como objetivo apresentar ferramentas como a abordagem AQbD para reduzir resíduos e otimizar o desenvolvimento do método, somado aos princípios de Química Verde. Além de apresentar uma proposta de método analítico de HPLC ecologicamente sustentável. Dentro do exposto, pode-se exemplificar que uma das formas de aplicar Química Verde no desenvolvimento de um método analítico é utilizar etanol como fase móvel, já que esse solvente não é tóxico como os eluentes/solventes comumente empregados (acetonitrila e metanol), o que reduz a exposição a perigo e problemas com tratamento de resíduos. Além disso, o etanol apresenta vantagem de ser um solvente obtido por fontes renováveis.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Gerais

Elaborar uma proposta de método analítico para determinação de teor de dipirona e cafeína em comprimidos utilizando abordagem AQbD e princípios de Química Verde, a partir da revisão da literatura.

### 2.2 Específicos

- Revisão de literatura sobre Química Verde e AQbD.
- Revisão de literatura sobre métodos analíticos para determinação de cafeína e dipirona.
- Propor o uso de água como diluente e uma combinação de etanol e água como fase móvel.
- Apresentar softwares relevantes para propostas de desenvolvimento de métodos analíticos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico inicial foi realizado de 20 de dezembro de 2022 a 15 de setembro de 2023, utilizando como palavras-chave: Dipirona; Metamizol; Cafeína; DoE; HPLC; AQbD; Etanol; Sustentável e Química Verde. As palavras-chaves foram utilizadas em diferentes combinações e a pesquisa foi realizada em português, inglês e espanhol. Utilizou-se como base de pesquisa PubMed, Scielo, Google Scholar e ScienceDirect. As publicações foram selecionadas considerando a relevância para o tema, sendo divididos em nos principais tópicos: AQbD, Química Verde e métodos analíticos de cafeína e dipirona. Os critérios de inclusão são o uso de etanol na constituição da fase móvel, a diminuição de solventes tóxicos ou qualquer processo que minimize a quantidade de resíduos e efluentes e métodos analíticos convencionais com os ativos em estudo. O critério de exclusão será a inconformidade da publicação com os temas de interesse, por exemplo estudos clínicos e/ou ações farmacológicas dos fármacos de interesse e estudos de Química Verde que não estejam relacionados a desenvolvimento analítico. A partir das publicações e de informações das propriedade físico-químicas dos fármacos em estudo e pretende-se propor um método analítico de HPLC para quantificação de teor de dipirona e cafeína em comprimidos utilizando etanol em substituição a metanol e/ou acetonitrila.

## 4 DESENVOLVIMENTO

### 4.1 Química Verde

A Química Verde concentra-se na criação e implementação de processos que tendem a uma geração de poluição igual a zero. Uma abordagem baseada em Química Verde também pode gerar economia dos gastos relacionados aos procedimentos em que for devidamente implementada, já que pode mitigar e muito os custos associados ao armazenamento e tratamento de resíduos além do pagamento de indenizações. Em um cenário ideal, a implementação dos princípios da Química Verde resulta em uma regulamentação e controle rigorosos, evitando a necessidade de intervenções posteriores relacionadas à diminuição de danos (PRADO, 2003).

Os princípios que norteiam o conceito de Química Verde, foram descritos em 1998 por Anastas e Warner e podem ser apresentados nos doze tópicos seguintes:

1. Prevenir a formação de subprodutos é mais eficaz do que lidar com eles posteriormente;
2. Objetivar a economia de átomos, os métodos sintéticos devem ser desenvolvidos de forma que maximizem a utilização dos átomos dos reagentes nos produtos finais desejados;
3. Em reações de sínteses deve-se substituir compostos de alta toxicidade por compostos de menor toxicidade (o que viabiliza economia de tempo e reagentes relacionados aos processos de purificação);
4. Criar compostos seguros, é crucial que os produtos químicos sejam desenvolvidos de modo a desempenhar sua função desejada com a menor toxicidade possível;
5. Reduzir a utilização de solventes e auxiliares. É importante evitar, sempre que possível, o emprego de substâncias auxiliares tal qual solventes e agentes de separação ou optar por alternativas que sejam inócuas no processo em questão;
6. A eficiência energética deve ser considerada. Os métodos de síntese devem ser conduzidos a pressões e temperaturas ambiente para reduzir o consumo de energia. Tal estratégia pode ser um fator muito importante para diminuir a poluição e gerar economia;
7. Uso de substâncias recicladas, quando viável os produtos e subprodutos de processos químicos devem ser reutilizados;

8. Reduzir o uso de derivativos. A derivatização, que envolve o uso de reagentes bloqueadores, de proteção ou desproteção, deve ser minimizada quando viável. Tal princípio se baseia no fato de que os passos reacionais requerem reagentes adicionais e podem resultar na formação indesejada de subprodutos;
9. Uso de catalisadores, tal estratégia aumenta a velocidade e o rendimento dos processos químicos;
10. Desenvolvimento de compostos para degradação, produtos químicos devem ser projetados de modo que possam ser degradados de forma segura, evitando sua persistência no ambiente;
11. Metodologias analíticas precisam ser desenvolvidas para permitir o monitoramento em tempo real dos processos a fim de controlar a formação de compostos tóxicos;
12. Química Segura para a prevenção de acidentes: As substâncias usadas nos processos químicos devem ser escolhidas de maneira a minimizar potenciais acidentes, como explosões e incêndios.

O crescente foco global nos danos causados ao planeta devido a diversas atividades humanas está se tornando cada vez mais evidente na mídia. A forma mais eficiente para abordar esses problemas envolve uma combinação multifatorial e multidisciplinar levando em consideração os aspectos econômicos, científicos e sociais (PRADO, 2003).

Nesse sentido, a adoção da Química Verde representa uma das muitas iniciativas para conter a poluição descontrolada. Uma das infinitas possibilidades de aplicar tal conceito pode ser no desenvolvimento de métodos ecologicamente relevantes de HPLC.

Principalmente considerando que HPLC é a instrumentalização analítica mais empregada em controle de qualidade farmacêutico (MOREIRA, 2019).

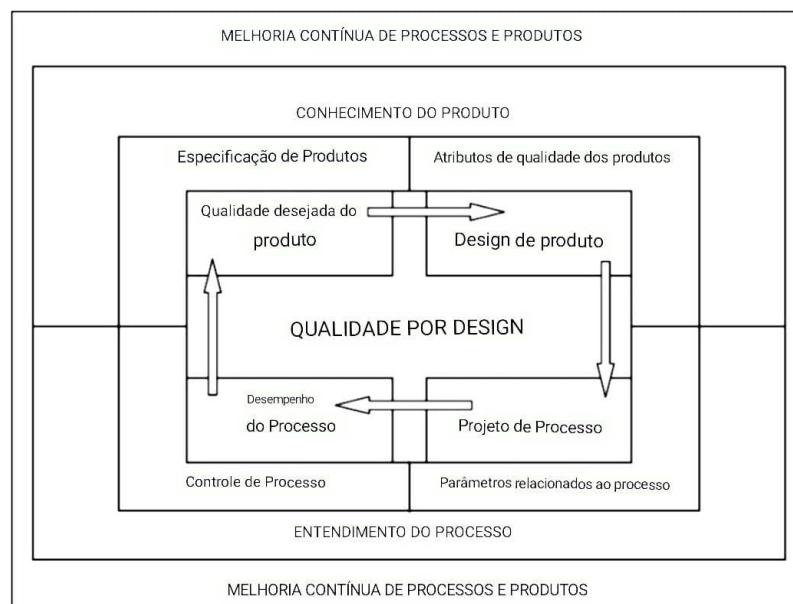
#### **4.2 Qualidade por Design Analítico (AQbD)**

Um ponto latente em Química Verde é a economia e gerenciamento adequado dos recursos buscando a melhor eficiência de processo para diminuir resíduos. Um conceito que se apropria desse mesmo ponto é AQbD, esse conceito foi definido a partir do termo *Quality by Design*, cunhado na década de 1960 pelo engenheiro elétrico Joseph Moses Juran que defendia que o produto deveria ser construído com

qualidade, segurança e eficácia desde a sua concepção (YU, 2008). Ao decorrer dos anos o conceito foi atualizado e aplicado em diversas áreas e contextos, essa abordagem surgiu como uma resposta à necessidade de maior flexibilidade nos processos de fabricação e é caracterizada por ser proativa, sistemática e baseada na análise de riscos durante o desenvolvimento do produto. O conceito de QbD é engenhosamente ilustrado na Figura 3.

É interessante ressaltar que a aplicação do conceito de QbD demonstra o nível de conhecimento e maturidade do processo de fabricação em todas as suas fases. Para implementá-lo eficazmente, é fundamental envolver uma equipe multidisciplinar, na qual o conhecimento é integrado desde a concepção do produto até a fase pós-regulatória (PRAMOD *et al.*, 2016).

Figura 3 – Esquema representativo do Sistema de QbD



Fonte: Adaptado, PRAMOND, *et al.* 2016

Em 2004 o Conselho Internacional de Harmonização (ICH, do inglês *International Council for Harmonization*) e Agência de Administração de Medicamentos e Alimentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*), introduziram o conceito de QbD por meio do programa piloto de revisão destinado a aprimorar o controle de fabricação na Indústria Farmacêutica. O objetivo era melhorar a qualidade e a segurança dos medicamentos, assegurando que o resultado desejado fosse mantido ao longo do processo de fabricação farmacêutica, com base na aplicação de conhecimentos científicos e de engenharia (ZHANG & MAO, 2017). O guia Q8(R2) do ICH define QbD como um processo sistemático que inicia com a

definição dos objetivos propostos e compreensão do produto em análise, com possibilidade de controlar o processo, utilizando uma ciência sólida e uma gestão de riscos de qualidade (YOGENDRARAJAH *et al.*, 2023). De acordo com esse guia, os elementos de QbD são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Elementos de QbD

Elementos de QbD	Objetivos
Perfil Alvo de Qualidade do Produto (QTPP, sigla do inglês <i>Quality Target Product Profile</i> )	Identificar quais atributos são essenciais para alcançar os níveis desejados de qualidade e segurança do produto, o que constitui o escopo do produto. Isso envolve a definição do perfil de qualidade e dos parâmetros que devem ser atingidos para assegurar a qualidade do produto.
Atributo Crítico de Qualidade (CQA, sigla do inglês <i>Critical Quality Attribute</i> )	Definir características do produto acabado, sejam elas de natureza físico-química, biológica ou microbiológica, que têm influência direta no QTPP. Elas precisam estar contidas em limites adequados, intervalos específicos ou distribuições precisas para garantir a qualidade desejada do produto.
Análise de risco (do inglês <i>Risk Assessment</i> )	Analizar os riscos, o gerenciamento de riscos envolve a identificação dos atributos do produto e dos parâmetros do processo que têm o potencial de afetar os CQAs do produto.
<i>Design Space</i> (DS)	Utilizar de uma combinação multidimensional que resulta da interação entre variáveis de entrada e parâmetros de processo, visando assegurar a qualidade desejada do produto.

Fonte: Adaptado, CHAVES 2017.

Os princípios de QbD foram aplicados para desenvolver os métodos analíticos, originando termo denominado de AQbD, que compartilha alguns elementos de QbD como avaliação de riscos e planejamento experimental com objetivos semelhantes (CHAVES, 2017). No Quadro 2 pode-se verificar um paralelo direto entre QbD e AQbD.

Quadro 2 - Comparação entre as etapas de QbD e AQbD

Etapa	QbD		AQbD	
	Elemento	Objetivo	Elemento	Objetivo
1	QTTP	Definir o tipo de sistema de entrega de medicamentos, forma farmacêutica, design de dosagem, farmacocinética, expectativa de estabilidade de formulação.	Perfil Analítico Alvo (Sigla do inglês, ATP <i>Analytical Target Profile</i> )	Define o que quantificar e como quantificar.
2	CQA	Definir os atributos físicos, identificação, ensaio, dissolução. Requisitos de perfil de impurezas e outras expectativas de qualidade.	CQA	Separação, identificação, exatidão, precisão, robustez e requisitos de robustez.
3	Processo Crítico de Parâmetro (CPP, sigla do inglês <i>Critical Process Parameter</i> )	Identificar os parâmetros do processo que podem ter impacto na qualidade, como nível crítico de carga, nível de agitação, temperatura, pH.	Atributo Crítico de Método (CMA, sigla do inglês <i>Critical Method Attribute</i> )	Identificar características do método que possam ter impacto no desempenho do método, tais como pH do tampão, temperatura da coluna, volume de injeção, proporção da fase orgânica, etc.
4	Critical Material Attributes (CMC)	Avaliar o tipo e o grau das matérias-primas utilizadas na formulação.	CMC	Avaliação dos reagentes, graus de reagentes e concentrações utilizadas na análise.
5	Design de Experimentos (DoE, sigla do inglês <i>Design of Experiments</i> )	Design fatorial para identificar um processo central e criar um <i>Design Space</i> .	DoE	Design fatorial para identificar um processo central e criar um Design Space.
6	Validação de Processo	Estabelecer provas práticas de que processo garante a qualidade.	Validação Analítica	Estabelecer provas práticas de que o método garante resultados confiáveis.
7	Estratégia de Controle	Estratégia para garantir a produção do produto com qualidade desejada.	Estratégia de Controle	Estratégia para garantir o desempenho do método analítico.

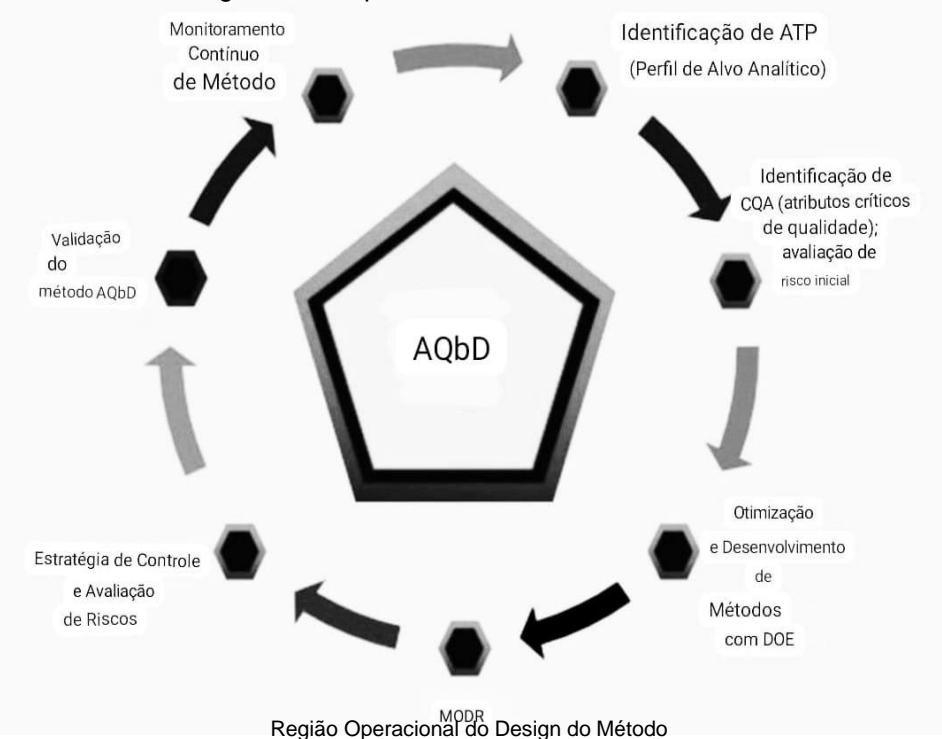
Fonte: Adaptado, JAYAGOPAL &amp; SHIVASHANKAR 2017.

Aplicação de AQbD ganhou muito destaque quando FDA e ICH implementaram QbD para controle da qualidade de fármacos (ZACHARIS; VASTARDI, 2018). AQbD é fundamentalmente ancorado em pesquisa sistemática, com o objetivo de identificar e reduzir as fontes de maior variabilidade dentro do sistema. Isso é realizado por meio de uma seleção criteriosa e otimização do método, utilizando fatores de entrada, com o propósito de assegurar que o método desenvolvido seja robusto ao longo do ciclo de vida do produto (RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015).

O desenvolvimento de métodos analíticos por meio da abordagem tradicional baseia-se em métodos empíricos, que envolvem a alteração dos parâmetros cromatográficos um de cada vez. Isso resulta em um processo de tentativa e erro demorado, uma vez que outros parâmetros são mantidos constantes, e as interações entre as variáveis em estudo não são completamente exploradas (MOREIRA, 2019. CHAVES, 2017). Esse tipo de abordagem apresenta riscos, especialmente quando o método analítico precisa ser transferido para outro laboratório. Isso pode requerer o desenvolvimento de um novo método analítico alternativo ou a revalidação do método, o que acarreta aumento significativo nos gastos de recursos.

O desenvolvimento do método analítico conforme as estratégias de AQbD obedece às etapas apresentadas na Figura 4.

Figura 4 – Esquema de ferramentas de AQbD



Fonte: Adaptado RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015.

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 as principais: configurações do instrumento, características da amostra, parâmetros do método e modelos de calibração (MOREIRA, 2019).

O ponto de partida no desenvolvimento de um método analítico com abordagem AQbD envolve a definição do propósito do método desejado. Isso implica determinar o que o método deve medir, como realizar a medição e como obter uma separação adequada dos analitos em análise. Esta fase inclui a identificação dos analitos alvos, como fármacos ou impurezas, compreendendo suas propriedades físico-químicas e interações com excipientes (MOREIRA, 2019).

Além disso, é necessário especificar as características desejadas desses analitos, a técnica de análise a ser utilizada para separá-los, bem como para quantificá-los ou identificá-los na amostra. A definição dos requisitos do método é alcançada por meio de ensaios ou análises de perfis de impurezas (RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015. MOREIRA, 2019).

Os CQAs podem ser definidos de acordo com a técnica analítica e o objetivo específico do processo. Alguns exemplos de CQAs para técnicas cromatográficas incluem o tempo de corrida, o fator de cauda, a resolução ( $R_s$ ), o tempo de retenção ( $tR$ ), o número de pratos teóricos ( $N$ ), a relação sinal-ruído ( $S/R$ ), o fator de simetria e a pureza do pico cromatográfico. É importante notar que os CQAs não estão limitados a esses exemplos e podem variar dependendo do que é definido como critério de qualidade e da técnica analítica em uso (MOREIRA, 2019).

A avaliação de riscos desempenha um papel fundamental na identificação e classificação das variáveis críticas para o método analítico. Diversas ferramentas de qualidade são empregadas para realizar essa classificação e definir o nível de risco associado a cada variável. Entre essas ferramentas, incluem-se o Diagrama de Causa e Efeito e a Análise de Modo e Efeito de Falha (FMEA – do inglês *Failure Modes, Effects Analysis*). No contexto do AQbD, o Diagrama de Causa e Efeito, também conhecido como Diagrama de Ishikawa, é frequentemente utilizado para definir os riscos envolvidos no processo analítico (JAYAGOPAL & SHIVASHANKAR, 2017). A

análise de riscos pode ser realizada utilizando a ferramenta FMEA que é uma ferramenta mais complexa de análise (CHAVES, 2017).

O DoE é uma abordagem estruturada e organizada para investigar as relações entre os fatores (variáveis independentes, representadas como "xi") que influenciam uma ou mais respostas (variáveis dependentes, representadas como "y"). Isso é alcançado por meio da construção de modelos matemáticos que relacionam as variáveis independentes com as respostas ( $y = f(xi)$ ) (MOREIRA, 2019).

A escolha do delineamento experimental adequado depende das metas estabelecidas, do número de variáveis independentes envolvidas, das interações desejadas a serem estudadas e do uso eficaz da estatística para validar os resultados (FUKUDA *et al.*, 2018). Os delineamentos experimentais podem ser classificados em dois tipos principais:

a) 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 (MOREIRA, 2019).

b) Delineamentos de otimização do método analítico: Focam em variáveis contínuas e empregam estratégias como o Box-Behnken, o central composto e fatores de três níveis para estudar e aperfeiçoar o método analítico (MOREIRA, 2019).

Segundo O ICH Q8 (R2) a Região Operacional do Design do Método (MODR do inglês *Method Operable Design Region*) define a região operacional do desenho do método como a combinação de variáveis do processo que garantem a qualidade do método, determina a região mais robusta do método analítico e a robustez do método deve ser avaliada dentro de MODR. A maior vantagem do MODR é que possibilita a modificação das variáveis de qualidade dentro dos limites (JAYAGOPAL & SHIVASHANKAR, 2017).

Após definir o MODR é necessário estabelecer as estratégias de controle, que são projetadas para garantir que o método está funcionando conforme o esperado. A estratégia de controle é consequência de todos os dados e resultados obtidos no desenvolvimento. E por fim, se tem o monitoramento contínuo do método, é a última etapa do ciclo de desenvolvimento AQbD (JAYAGOPAL & SHIVASHANKAR, 2017. MOREIRA, 2019).

### 4.3 Validação de métodos analíticos

A validação analítica é um processo contínuo que visa a verificação da confiabilidade dos resultados obtidos no desenvolvimento de um método. Tem a finalidade de confirmar, por meio de evidências objetivas, se um procedimento analítico é apropriado para o seu uso pretendido. A validação analítica tem como objetivo garantir que os resultados obtidos com o método atendam aos requisitos das aplicações analíticas, assegurando, assim, a confiabilidade desses resultados (BRASIL, 2017). Os parâmetros que compõem o processo de validação analítica são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Parâmetros de Validação Analítica

Parâmetro	Descrição
Seletividade	A capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse de forma inequívoca, mesmo na presença de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como impurezas, diluentes e componentes da matriz.
Linearidade	Deve ser comprovada pela capacidade de gerar respostas analíticas que sejam diretamente proporcionais à concentração de um analito presente em uma amostra.
Efeito Matriz	Deve ser avaliado pela comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas utilizando a solução padrão de referência do analito em um solvente e a amostra fortificada com a substância química de referência do analito.
Faixa de trabalho	Determinada com base nos estudos de linearidade, bem como nos resultados de precisão e exatidão, e deve ser definida de acordo com a finalidade específica de aplicação do método.
Precisão	Avaliação da concordância entre os resultados obtidos por meio de ensaios realizados em amostras preparadas de acordo com as instruções do método analítico a ser validado. A precisão é frequentemente expressa em termos de repetibilidade, precisão intermediária ou reproduzibilidade.
Exatidão	Avaliada pela concordância dos resultados individuais obtidos com o método em análise em relação a um valor considerado como verdadeiro ou aceito como referência.
Limite de Detecção	Determinado ao obter a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, embora não necessariamente quantificada, nas condições experimentais especificadas.
Limite de Quantificação	A menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

Parâmetro	Descrição
Robustez	Parâmetro geralmente avaliado durante o desenvolvimento de um método analítico e representa a capacidade do método de resistir a pequenas variações deliberadas nas condições analíticas.

Fonte: Adaptado, BRASIL, 2017.

Anteriormente a robustez era um parâmetro de validação pela, porém essa abordagem apresenta o risco de descobrir tarde que o método não é robusto, resultando na perda de todos os testes realizados até então, pois o método precisaria ser desenvolvido novamente. A abordagem do teste de robustez, quando conduzida usando o DoE, permite examinar e identificar as possíveis fontes de variabilidade que afetam uma ou várias respostas do método. Essa abordagem faz parte do desenvolvimento do procedimento analítico. A amplitude das variações nos parâmetros do método deve ser determinada de acordo com o MODR, garantindo que a região de teste de robustez esteja contida dentro dos limites estabelecidos pelo MODR. Isso evita a descoberta tardia de problemas de robustez no método assim diminuindo riscos de perda e desperdício de recursos (HEYDEN *et al.* 2001).

Uma estratégia interessante para testar a robustez é o teste de Youden, se trata de uma abordagem confiável para avaliar a robustez de métodos analíticos, empregando um delineamento que engloba sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos (CÉSAR, 2009).

#### 4.4 Dipirona e Cafeína

Levando em consideração o que foi exposto buscou-se uma forma de aplicar o conceito de Química Verde ao desenvolvimento de método analítico, foram consideradas algumas combinações de fármacos. Escolheu-se a combinação de cafeína e dipirona.

A cafeína tem sido identificada como um coadjuvante terapêutico eficaz no tratamento da dor crônica e tensional quando usada em conjunto com analgésicos. Estudos comparativos revelaram que a combinação de cafeína com fármacos como paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e naproxeno melhora a absorção e distribuição plasmática desses medicamentos, contribuindo para a inibição da liberação de mediadores inflamatórios envolvidos na hiperalgesia (VICENTINI *et al.*, 2013).

A dipirona sódica é um medicamento amplamente empregado no controle da dor de origem inflamatória. Sua eficácia como analgésico se deve a um mecanismo de ação periférico distinto em comparação aos outros medicamentos normalmente utilizados. A inclusão de cafeína na formulação parece alterar o efeito da dipirona sódica no tratamento da dor, embora o mecanismo exato dessa interação ainda não tenha sido totalmente compreendido (VICENTINI et al., 2013).

Diversos autores observaram melhorias nas dores de cabeça tensionais e aquelas associadas à punção dural ou à baixa pressão do fluxo cérebro-espinhal com o uso da cafeína. Esses benefícios provavelmente resultam do aumento do tônus cerebrovascular, que leva à vasoconstrição e à redução do fluxo sanguíneo cerebral. Além disso, em pacientes que sofrem de cefaleia, a cafeína tem um efeito positivo no humor. Em doses variando de 65 a 500 mg, a cafeína demonstra aprimorar o desempenho psicomotor e o estado de alerta (SAWYNOK & YAKSH, 1993).

No GUIA INTERFARMA de 2022 foi apresentado um ranking que apresenta os 20 medicamentos líderes em números de vendas, o ranking é apresentado na TABELA 1, onde estão destacados os principais medicamentos que contêm cafeína e/ou dipirona.

Tabela 1 - Ranking dos Medicamentos no Brasil - Varejo

RK	Laboratórios	MAT DEZ 2021		MAT DEZ 2020		MAT DEZ 2019		MAT DEZ 2018		MAT DEZ 2017	
		Rk	Faturamento R\$								
1	OZEMPIC (N-N)	1	1.133.142	4	420.016	55	120.453	12226	0	11321	0
2	XARELTO (BYP)	2	807.417	1	676.674	1	547.451	2	446.498	2	363.858
3	DORFLEX (S.A)	3	638.334	2	592.172	2	537.282	1	549.571	1	501.195
4	SAXENDA (N-N)	4	600.653	3	445.928	3	379.511	3	283.732	16	167.443
5	GLIFAGE XR (MCK)	5	487.086	5	415.597	4	309.735	5	246.322	8	212.024
6	XIGDUO XR (AZN)	6	375.293	8	300.972	15	214.582	25	153.465	97	77.455
7	JARDIANCE (B.I.)	7	366.014	6	330.403	6	265.953	15	196.865	26	133.518
8	IVERMECTINA MG (VI-)	8	365.647	7	323.074	760	22.492	1116	13.465	1615	7.629
9	NOVALGINA (S.A)	9	337.734	13	280.566	7	253.444	14	199.404	21	139.867
10	ARADOIS (BS2)	10	330.831	9	298.741	12	224.934	12	207.169	6	227.644
11	VENVANSE (TAK)	11	325.690	22	224.301	16	213.288	19	164.808	42	114.706
12	TORSILAX (N.Q)	12	321.828	12	287.533	8	252.392	6	234.114	5	233.881
13	PURAN T-4 (S.A)	13	308.708	10	289.779	9	248.904	10	221.951	9	203.695
14	DEXILANT (TAK)	14	299.558	16	251.530	14	217.510	32	144.506	331	37.519
15	FORXIGA (AZN)	15	296.653	21	226.437	21	185.687	29	147.657	46	112.293
16	ELIQUIS (PFZ)	16	293.331	20	231.930	26	172.909	44	124.586	92	82.409
17	NEOSALDINA (HYQ)	17	290.168	11	289.200	5	279.284	4	265.960	3	247.136
18	ADDERA D3 (MF+)	18	279.794	14	259.288	23	181.615	9	221.966	7	216.644
19	ALENIA (A4H)	19	277.730	17	250.302	18	203.349	16	179.512	20	155.737
20	ANTHELIOS (LRP)	20	275.582	19	238.969	10	245.938	8	222.506	11	199.611

PMB, Dez 2021. Faturamento: preço com desconto no ato da venda (PPP), valores em mil reais.

Fonte: INTERFARMA, 2022.

A partir desse guia se tem que o mercado farmacêutico vem registrando crescimento relativamente constante nos últimos anos. E um ponto interessante são as primeiras colocações em vendas. O Dorflex se apresenta como primeiro colocado nos anos de 2017 e 2018, e ainda mantém uma posição alta nos dados de 2021. Dorflex possui dipirona sódica monoidratada, citrato de orfenadrina e cafeína, o medicamento é muito usado para dor de cabeça, cólica menstrual e dores musculares (SANOFI).

Também aparece na lista a Neosaldina que apresenta em sua composição dipirona, mucato de isometepteno e cafeína. O uso usual é no tratamento de dores de cabeça, musculares e até tensões (COSMED). Também com efeito analgésico, se verifica o Torsilax, que apresenta em sua composição diclofenaco sódico, paracetameol, carisprodol e cafeína. O medicamento também é indicado para o tratamento de diversos tipos de dores (BRAINFARMA).

Para o trabalho considerou-se a formulação de genérico comercializada pela Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A apresentada no Quadro 4.

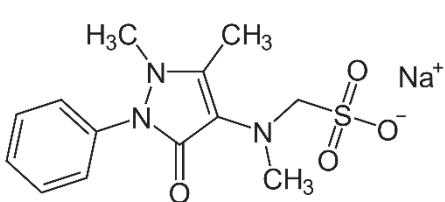
Quadro 4 – Composição de comprimido de dipirona associada à cafeína

Cada comprimido contém	
Dipirona monoidratada (equivalente a 500,0mg de dipirona)	525,6 mg
Cafeína	65,0 mg
Excipiente q.s.p (povidona, amido e estearato de magnésio).	1 comprimido

Fonte: BRAINFARMA.

O Quadro 5 apresenta as características físico-químicas da dipirona e da cafeína que são importantes para o desenvolvimento do método.

Quadro 5 - Características dos fármacos

Nome	CAS	Estrutura Molecular	Massa molar	PKa	Solubilidade em água (g/mL H <sub>2</sub> O)
Dipirona	68-89-3		333,34 g/mol	-1,2	Altamente solúvel 67 g/100 mL

Nome	CAS	Estrutura Molecular	Massa molar	PKa	Solubilidade em água (g/mL H <sub>2</sub> O)
Cafeína	58-08-2		194.19 g/mol	0,6 e 14	Solúvel 2 g/100 mL (água a 20°C) 66 g/100 mL (99°C).

#### 4.5 Proposta de desenvolvimento do método analítico

Atualmente, a HPLC é uma das técnicas analíticas mais amplamente empregadas em diversos laboratórios, utilizada para separar, identificar e quantificar compostos, permitindo resultados precisos em um curto espaço de tempo. Além disso, a HPLC oferece alta eficiência na separação de compostos e detecção, podendo ser usada de forma independente ou em combinação com outras técnicas instrumentais de análise (CHAWLA & CHAUDHARY, 2019).

Não há métodos HPLC de associação dipirona e cafeína em compêndios oficiais. Considerando que alguns métodos de HPLC foram encontrados na literatura científica para a determinação de dipirona e cafeína, nenhum dos métodos usa etanol como fase móvel. A maioria dos métodos encontrados gera uma quantidade considerável de resíduos orgânicos, já que utilizam diluente e fase móvel constituídos com solventes orgânicos tóxicos como acetonitrila e metanol.

Nenhum método de HPLC ecológico foi encontrado para a separação de cafeína e dipirona. O Quadro 6 apresenta métodos analíticos de HPLC que apresentam como analitos cafeína e dipirona.

Quadro 6 - Métodos para associação de dipirona e cafeína em comprimidos encontrados em literatura

Parâmetros	Referência (VIERA <i>et al.</i> 2017)	Referência (ALTUN, 2002)	Referência (BELAL <i>et al.</i> 2014)
Analito	Cafeína e Dipirona	Paracetamol, Cafeína e Dipirona	Cafeína, Dipirona e Drotaverina
Diluente	Fase móvel	Fase móvel	Água destilada.
Fase móvel	Acetonitrila/água (65:35 v/v), pH 7,5 usando gotas de água:trietilamina (99:1 v/v).	0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -metanol-acetonitrila-álcool isopropílico (420:20:30:30) (v/v/v/v)	Ácido ortofosfórico 0,05 M e Acetonitrila.

Parâmetros	Referência (VIERA <i>et al.</i> 2017)	Referência (ALTUN, 2002)	Referência (BELAL <i>et al.</i> 2014)
Modo de eluição e vazão	Isocrático, 1 mL min <sup>-1</sup>	Isocrático, 1 mL min <sup>-1</sup>	Gradiente, início com 15% (em volume), A proporção de acetonitrila foi aumentada linearmente para 60% em 3 min. A proporção de 60% foi mantida até o final. 1 mL min <sup>-1</sup> .
Tempo de corrida	4 min	10 min	10 min
Volume de injeção	20 µL	10 µL	20 µL
Coluna	Acclaim® C18 (250,0 × 4,6 mm; partículas de 5,0 µm)	µ-Bondapack C8 (5 µm, 250 mmx 4.6 mm). Coluna de guarda (10 µm Bondapak C18)	Waters Symmetry: C18 (3,9 × 150 mm, tamanho de partícula de 5 µm)
Temperatura	-	-	25 °C
Comprimento de onda (Detecção)	273 nm	215 nm	210 nm

Com o presente estudo pretende-se discutir a aplicabilidade do etanol como constituinte de fase móvel em um método de HPLC. A proposta ressalta o conceito de Química Verde utilizando o etanol como constituinte de fase móvel já que é uma substância que pode ser obtida por fontes renováveis e não representa riscos de danos ao meio ambiente na mesma ordem de grandeza que a acetonitrila e o metanol, que são mais comumente utilizados.

Ribeiro e colaboradores em 2004 avaliaram misturas de etanol:água para o uso como fases móveis em cromatografia de fase reversa. Para a otimização das condições cromatográficas para as colunas C8 e C18 utilizaram um planejamento factorial no qual consideraram a temperatura, a concentração de etanol e a vazão da fase móvel como fatores relevantes. Com a fase estacionária C8, as assimetrias dos picos não foram significativamente afetadas em diferentes pontos do planejamento factorial. No entanto, os fatores de retenção e as resoluções foram ligeiramente menores em temperaturas mais elevadas, onde a viscosidade do etanol é menor. O mesmo comportamento se repetiu com as colunas cromatográficas C18.

A eficiência da fase móvel etanol:água na separação de misturas contendo compostos neutros e básicos foi comparada com as fases móveis metanol:água e

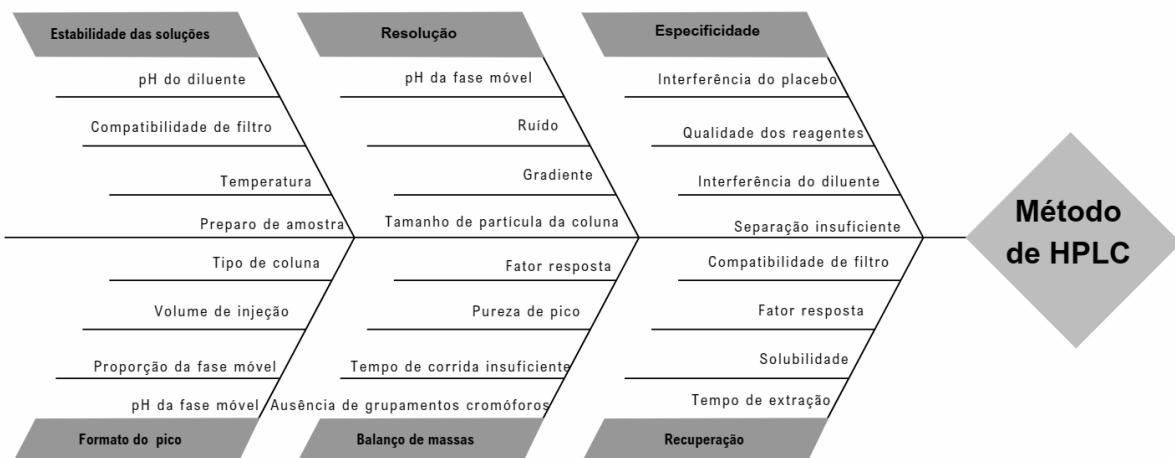
acetonitrila:água. O etanol demonstrou ser um bom modificador orgânico para cromatografia de fase reversa, apresentando propriedades cromatográficas satisfatórias. Além disso, considerando a menor toxicidade do etanol, sua facilidade de descarte e custo favorável, ele pode ser a escolha preferencial como fase móvel em diversas aplicações de cromatografia de fase reversa (RIBEIRO *et al.* 2004).

Porém um ponto fundamental deve ser considerado: o etanol, devido à sua maior viscosidade, proporciona uma pressão de sistema muito mais alta do que o metanol ou acetonitrila, e isso pode comprometer o tempo de durabilidade da coluna cromatográfica, isso pode ser mitigado utilizando de temperaturas ligeiramente mais altas, que respeitem a estabilidade térmica dos analitos em questão.

Em 2008, Destandau e Lesellier verificaram que para moléculas de triazina, as separações realizadas com etanol e metanol são comparáveis, com resolução um pouco melhor utilizando etanol como constituinte de fase móvel. A força de eluição do etanol permite um menor consumo de proporção orgânica do eluente, cerca de 10-20% menor do que com metanol para o mesmo tempo de análise, mantendo desempenhos e condições cromatográficas satisfatórias.

O objetivo do método a ser proposto é desenvolver um método de HPLC capaz de quantificar simultaneamente cafeína e dipirona (65 mg e 527 mg, respectivamente) em comprimidos, para análise de liberação de lote em controle de qualidade. A análise de riscos no início do procedimento é essencial para garantir a eficiência da abordagem AQbD. Na Figura 5 se tem o diagrama de Ishikawa de um desenvolvimento de método de HPLC.

Figura 5 - Diagrama de Ishikawa mostrando a análise de causa e efeito para um método de HPLC



Fonte: Adaptado, JAYAGOPAL & SHIVASHANKAR, 2017.

Mas objetivando uma análise mais completa dos riscos no Quadro 7 é apresentado o FMEA de desenvolvimento analítico de HPLC.

Quadro 7 - Análise de risco para o desenvolvimento de método analítico de HPLC usando FMEA

Parâmetro	Falha Potencial	Dano ou Efeito	Causa da falha	Ocorrência (O)	Severidade (S)	Deteção (D)	RPN
Seletividade	Interferência do placebo	Detecção e quantificação incorreta do IFA	Desenvolvimento do método. Método de eluição (gradiente ou isocrático) não adequado.	2	8	2	32
	Qualidade dos reagentes	Detecção incorreta de impurezas	Não utilização de reagentes de grau HPLC	1	8	4	32
	Separação não suficiente	Detecção e quantificação incorreta do IFA. Detecção incorreta de impurezas. Balanço de massas inconsistente	Desenvolvimento do método.	5	10	6	300
	Interferência do diluente	Detecção e quantificação incorreta do IFA	Desenvolvimento do método. Diluente não adequado.	1	8	2	16
Resolução	pH da Fase móvel	Ionização de componentes da mistura. Alteração nos tempos de retenção. Não detecção de impurezas. Balanço de massas inconsistente.	Desenvolvimento do método. Erro de preparo pelo analista. Equipamento não calibrado corretamente.	4	8	3	96
	Tamanho de partícula da coluna	Alteração nos tempos de retenção. Não detecção de impurezas. Balanço de massas inconsistente.	Desenvolvimento do método. Coluna com armazenamento incorreto.	4	6	5	120
	Ruído	Dificuldade na detecção de impurezas. Dificuldade na integração dos picos.	CLAE sem qualificação ou com lavagem do sistema deficiente. Lâmpadas com número de horas acima do recomendado.	1	5	1	5
	Gradiente	Alteração no tempo de retenção. Modificação na separação, especificidade e seletividade dos picos. Não detecção de impurezas.	Desenvolvimento. CLAE sem qualificação. Erro na configuração do método pelo analista.	4	6	3	72
Estabilidade das soluções	pH do diluente	Degradação do pico principal. Aumento de impurezas potenciais.	Desenvolvimento do método. Erro de preparo pelo analista. Equipamento não calibrado corretamente.	3	5	1	15
	Compatibilidade do filtro	Alteração na recuperação. Aparecimento de picos que podem ser confundidos com impurezas.	Teste de filtro não realizado ou realizado incorretamente. Troca de material pelo analista.	1	5	1	5
	Temperatura	Degradação dos analitos. Aumento de impurezas potenciais. Evaporação do diluente. Precipitação do analito.	Armazenamento das soluções não estabelecido ou estabelecido incorretamente. Erro de armazenamento pelo analista. Falta de controle de temperatura.	1	5	1	5
	Procedimento de extração	Degradação dos analitos. Aumento de impurezas potenciais. Evaporação do diluente. Precipitação do analito. Modificação na separação e na recuperação.	Desenvolvimento do método. Ausência de definição no método. Erro do analista.	2	6	3	36
Formato do pico	Tipo de coluna	Altera as interações analito x fase estacionária. Mudança na resolução e tempo de análise.	Desenvolvimento do método. Troca de material.	5	10	3	150
	pH e fração de orgânico do diluente	Incompatibilidade com a fase móvel. Precipitação. Solubilidade do analito. Mudança na resolução e inconsistência no balanço de massas.	Desenvolvimento do método. Erro de preparo pelo analista.	4	7	4	112
	pH da Fase móvel	Ionização dos componentes da mistura. Alteração da separação, resolução e balanço de massas.	Desenvolvimento do método. Erro de preparo pelo analista.	3	8	3	72
	Volume de injeção	Ultrapassa os limites de absorção. Difícil a detecção de PD em baixa concentrações	Desenvolvimento. CLAE sem qualificação. Erro na configuração do método.	2	5	1	10
Balanço de massas	Fator resposta dos PDs	Falta de entendimento sobre a degradação e aparecimento de impurezas.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica. Ausência da identificação de impurezas.	6	10	6	360
	Pureza do pico principal	Falta de especificidade e seletividade dos picos. Não detecção de impurezas.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica. Ausência da identificação de impurezas.	6	10	6	360
	Ausência de grupos cromóforos	Não detecção de impurezas.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica. Ausência da identificação de impurezas.	4	6	2	48
	Tempo de corrida insuficiente	Não detecção de impurezas.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica. Ausência da identificação de impurezas.	4	6	2	48
Recuperação	Compatibilidade do filtro	Alteração na recuperação. Aparecimento de picos que podem ser confundidos com impurezas. Não detecção de impurezas.	Teste de filtro não realizado ou realizado incorretamente. Troca de material pelo analista.	1	5	1	5
	Fator resposta dos PDs	Falta de entendimento sobre a degradação e aparecimento de impurezas.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica. Ausência da identificação de impurezas.	6	10	6	360
	Solubilidade dos PDs	Não aparecimento de PDs. Balanço de massas inconsistente.	Desenvolvimento de métodos. Pesquisa bibliográfica.	6	10	6	360
	Tempo de extração	Balanço de massas inconsistente.	Desenvolvimento do método. Ausência de definição no método. Erro do analista.	2	6	3	36

Fonte: CHAVES, 2017.

Para a execução dos experimentos e determinação das respostas, algumas etapas devem ser obedecidas:

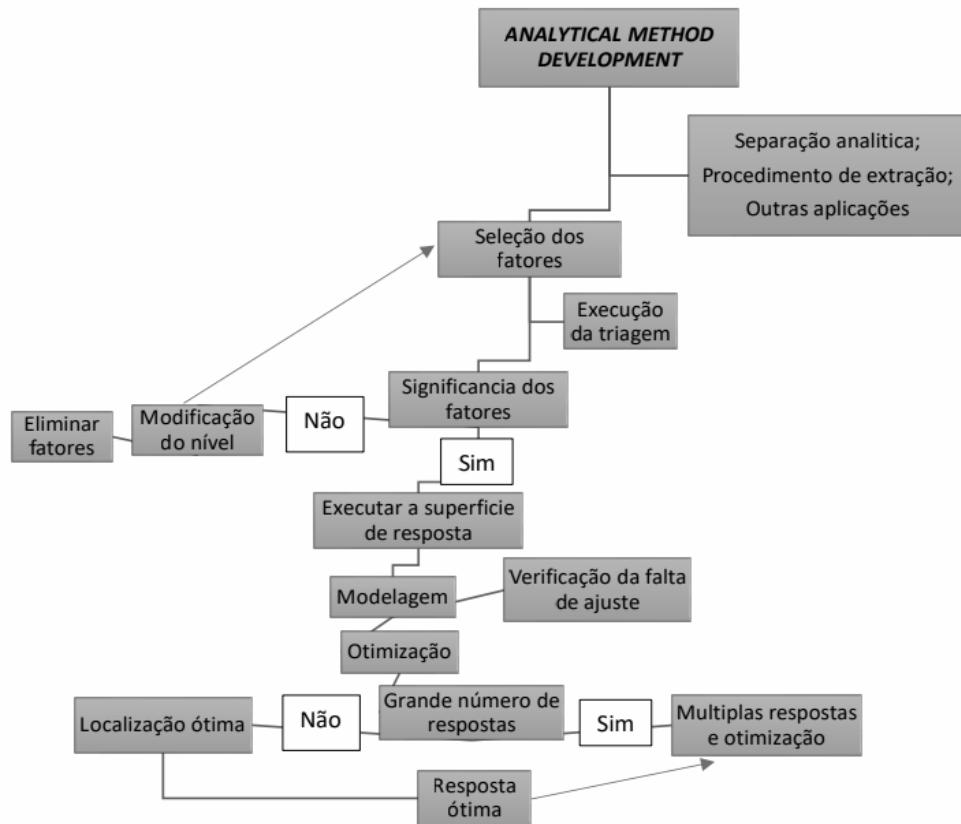
(a) É crucial que as observações e erros sejam variáveis aleatórias e independentes.

(b) Quando o número de experimentos se estende por mais de um dia de análise, é apropriado conduzir esses experimentos em blocos, onde cada bloco representa um dia ou sequência distinta.

(c) No início, é necessário realizar cálculos para estimar os efeitos dos fatores em uma resposta. No entanto, todas as estimativas estão sujeitas a erros. Para determinar se um efeito é estatisticamente significativo em uma escala, é fundamental conhecer o desvio padrão desse efeito, também chamado de erro padrão do efeito, que pode ser calculado considerando o erro experimental, erro aleatório e incerteza experimental (OLIVEIRA, 2021).

A partir da literatura e tudo que foi exposto até este parágrafo pode-se apresentar o fluxograma de tomada de decisão apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma da tomada de decisão no desenvolvimento analítico



Fonte: OLIVEIRA, 2021.

Assim para preparo de soluções e preparo de amostra pode-se considerar uma solução de dipirona a 25,0 µg mL<sup>-1</sup> obtida através de uma solução estoque 100,0 µg mL<sup>-1</sup>, com ambas tendo água ultra purificada como diluente. O mesmo procedimento

para cafeína, com uma concentração final de 3,0 µg mL<sup>-1</sup>. Como método de preparo de amostra, utilizar vinte comprimidos que devem ser pulverizados em almofariz e pistilo. Uma quantidade de pó equivalente a 77,0 mg de dipirona e 10,0 mg cafeína deve ser pesada com precisão e transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL, completado até esse volume com água, e submetido à ultrassonografia por 15,0 min. Posteriormente, uma alíquota de 1,5 mL deve ser transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e completado com fase móvel, obtendo-se o volume final. Soluções com concentrações próximas de 23,0 µg mL<sup>-1</sup> para dipirona e 3,0 µg mL<sup>-1</sup> para cafeína. O teste de filtro deve ser realizado.

No Quadro 8 se tem os parâmetros para realizar o DoE baseando-se no CMP, CQA e QTMP.

Quadro 8 – Apresentação de CMA, planejamento do DoE, ATP e CQA do método proposto

CMA	Amplitude de cada parâmetro utilizado para o DoE		ATP	CQA
	menor	Maior		
Vazão	0,5 mL min <sup>-1</sup>	1,0 mL min <sup>-1</sup>	Método de HPLC com uso de etanol e água como fase móvel capaz quantificar de 90 a 110% da concentração nominal. Com incerteza de medição alvo de no máximo 2% para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Resolução cromatográfica não deve ser inferior a 2.	Resolução entre os picos de cafeína e dipirona.
pH da fase móvel	pH 6,5	pH 8,5		
Proporção de etanol na fase móvel	30%	70%		
Temperatura do forno da coluna	30°C	60°C		
Tempo da amostra no ultrassom	10 min	20 min		

O Quadro 9 apresenta as condições esperadas para o método analítico em questão.

Quadro 9 - Condições esperadas método de HPLC para dipirona e cafeína

Parâmetros	
Analito	Cafeína e Dipirona
Diluente	Água ultrapurificada
Fase móvel	etanol/água (30/70 v/v)*, pH 7,5 c gotas de água:trietylamina (99:1 v/v).
Modo de eluição e vazão	0,8* mL min <sup>-1</sup>
Tempo de corrida	30 min*
Volume de injeção	20 µL
Coluna	Acclaim® C18 (250,0 × 4,6 mm; partículas de 5,0 µm)

Parâmetros	
Temperatura	40 °C*
Comprimento de onda	273 nm

A proporção de fase móvel, vazão e temperatura estão sujeitas a mudanças baseando-se no DoE proposto no Quadro 8. Há muitas possibilidades de otimizar o método, o tempo de corrida relativamente alto é para checar os picos dos analitos, o ajuste do tempo de corrida depende do tempo de redenção dos analitos. O melhor resultado, visando lidar com a alta pressão proporcionada pela viscosidade mais alta do etanol. Antes de iniciar os testes deve-se considerar as análises de riscos. O DoE proposto também pode fornecer a MODR.

Considerando a otimização proporcionada pelos testes de DoE e a literatura pode-se planejar curvas de calibração dipirona e cafeína seriam construídas usando soluções-estoque em água ultrapurificada na concentração de 100 e 50 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Em 2017, Vieira e colaboradores verificaram uma faixa linear de determinação de 5,0–35,0 µg mL<sup>-1</sup> para dipirona e 1,0–7,0 µg mL<sup>-1</sup> para cafeína. A linearidade das curvas seria avaliada pelo coeficiente de correlação (*r*) e confirmada por ANOVA.

Com as etapas anteriores concluídas pode-se delimitar a estratégia de controle através dos vários dados coletados durante a fase de desenvolvimento do método. Por fim, se aplica o monitoramento contínuo do método.

#### 4.6 Softwares

Um ponto interessante que pode ser somado aos conceitos de Química Verde e AQbD é o uso de softwares. Como o DryLab, que é um software de desenvolvimento e otimização de métodos de HPLC desenvolvido por Lloyd Snyder colaboradores. O DryLab prevê cromatogramas sob uma gama muito mais ampla de condições experimentais do que seria possível em laboratório. O software permite que se varie simultaneamente vários parâmetros do método, como pH, temperatura, concentração de tampão e muito mais. Com o auxílio do software pode-se otimizar ainda mais o uso de recursos (DryLab).

Software exclusivo de desenvolvimento de método HPLC totalmente automatizado, mesmo para as misturas mais complicadas. Baseado na teoria e na prática da cromatografia líquida

Também pode-se apresentar o ChromSwordAuto® Developer que é um software que aplica métodos numéricos e técnicas de inteligência artificial ao processamento e análise de dados, onde a análise detalhada de uma amostra e perfil completo de todos os compostos acarreta na economia significativa de tempo e dinheiro. O ponto mais interessante é que o sistema controla o HPLC e analisa os resultados automaticamente, onde cada corrida é usada para tomar decisões sobre as condições da próxima corrida, a fim de encontrar o melhor método (ChromSword 2022).

Além dos dois softwares mencionados, também pode-se destacar Pesos (Perkin-Elmer Corp., EUA); Diamond (ATI, EUA); LC-Simulator® (ACD Labs, Canadá); Osiris (Datalys, França); Fusion® (Smatrix, EUA); Prisma (GraphPad Software, EUA); Umetrics™ Suite (MKS, Suíça); ISOS (Agilent, EUA); Statistica (Statsoft, EUA) e MatLab (MathWorks, EUA) (CHAVES, 2017).

## 5. CONCLUSÃO

Química Verde é um princípio multifacetado que pode ser aplicado em diversos contextos e de diferentes formas. A proposta do uso de etanol como fase móvel pode ser uma opção viável de eluente alternativo, sendo sua maior desvantagem a alta viscosidade, porém isso pode ser contornado diminuindo a vazão e elevando a temperatura da análise. A substituição de constituintes de fase móvel como metanol e acetonitrila por etanol é facilmente aplicável, já que a substituição pode ser feita apenas ajustando as condições cromatográficas do sistema de HPLC.

Além da substituição de solventes a implementação da abordagem AQbD que possibilita maior eficiência ao desenvolver o método analítico e diminui muito os riscos relacionados a perdas e testes falhos. Assim diminuindo consideravelmente a geração de resíduos. Além disso, a tecnologia tende a se aprimorar com o passar dos anos e softwares baseados em Inteligência Artificial também podem representar um ponto-chave na redução de resíduos gerados no processo de desenvolvimento analítico.

Vale considerar que a aplicação dos conceitos de Química Verde e AQbD representam muitos desafios e exigem envolvimento e interesse. Mas a aplicação de tais conceitos podem significar um aumento na qualidade do desenvolvimento analítico. Considerando custo-benefício, os conceitos de Química Verde, especialmente quanto ao uso de etanol, podem mitigar os custos relacionados a tratamento de resíduos e abordagem AQbD gera economia diminuindo os resíduos e o tempo gasto para validar os métodos analíticos.

Aplicar os conceitos estudados foi um desafio, e uma perspectiva para um possível projeto no futuro seria a realização dos testes em laboratório.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUN, M. L.. "HPLC Method for the Analysis of Paracetamol, Caffeine and Dipyrone," **Turkish Journal of Chemistry**, v. 26: n. 4. 2002. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/chem/vol26/iss4/8>. Acesso: 4 fev. de 2023.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, NewYork (1998).

BELAL, Tarek S. et al. High Performance Liquid Chromatographic Determination of the Ternary Mixture of Caffeine, Dipyrone and Drotaverine Hydrochloride in Tablet Dosage Form. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 33-39, 2014. Open Science Publishers LLP. <http://dx.doi.org/10.7324/japs.2014.40605>.

BRAINFARMA - Indústria Química e Farmacêutica S.A. Bula. DIPIRONA + CAFEÍNA.

BRAINFARMA - Indústria Química e Farmacêutica S.A. Bula. TORSILAX® (cafeína + carisoprodol + diclofenaco sódico + paracetamol).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.

CANDIOTI, L. V.; ZAN, M. M. de; CÂMARA, M. S.; GOICOECHEA, H. C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, [S.L.], v. 124, p. 123-138, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>.

CÉSAR, I. da C.; PIANETTI, G. A.. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 235-240, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502009000200007>.

CHAVES, J. A. P.. Aplicação do princípio de Quality by Design no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade. 2017. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

CHAWLA, G.; CHAUDHARY, K. K.. A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. **International Journal Of Pharmaceutical Chemistry And Analysis**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 27-39, 15 ago. 2019. IP Innovative Publication Pvt Ltd. <http://dx.doi.org/10.18231/j.ipca.2019.006>.

ChromSwordAuto® Developer. Disponível em: <http://www.chromsword.com/developer/>. Acesso. 16 mar. 2023

COSMED - Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A. Bula. NEOSALDINA® (dipirona + mucato de isometepteno + cafeína).

DERRY C. J.; DERRY S.; MOORE R. A.. Caffeine as an analgesic adjuvant for acute pain in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Mar 14;(3):CD009281. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD009281.pub2>.

DESTANDAU, E.; LESELLIER, E.. Chromatographic Properties of Ethanol/Water Mobile Phases on Silica Based Monolithic C18. Chromatographia. V. 68. p. 985-990. 2008. 10.1365/s10337-008-0819-8.

DJAJIĆ, N. et al. Modified aqueous mobile phases: a way to improve retention behavior of active pharmaceutical compounds and their impurities in liquid chromatography. **Journal Of Chromatography Open**, [S.L.], v. 2, p. 100023, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100023>.

FUKUDA, I. M.; PINTO, C. F. F.; MOREIRA, C. dos S.; SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R.. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 54, n. , p. 1-16, 8 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>.

HEMDAN, A. et al. Response surface design as a powerful tool for the development of environmentally benign HPLC methods for the determination of two antihypertensive combinations: greenness assessment by two green analytical chemistry evaluation tools. **Journal Of Separation Science**, [S.L.], v. 41, n. 16, p. 3213-3223, 17 jul. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201800317>.

HEYDEN Y. V., NIJHUIS A.; SMEYERS-VERBEKE J.; VANDEGINSSTE, B. G. M.; MASSART D. L.. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2001, Vol. 10, pp. 723-753

ICH, International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland), Harmonised Tripartite Guideline. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES:TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Agosto de 2009. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>

ICH, International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland). Harmonised Tripartite Guideline. Q2(R1) Revision/Q14 Analytical Procedure Development Guideline. 24 de março de 2022. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>

ICH, International Conference on Harmonisation, IFPMA, Geneva (Switzerland). Harmonised Tripartite Guideline. Q2(R1) Revision/Q14 Analytical Procedure Development Guideline. 24 de março de 2022. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>

INTERFARMA, Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa. GUIA 2022. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/wp-content/uploads/2022/08/Guia-Interfarma-2022.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2023.

JAYAGOPAL, B.; SHIVASHANKAR, M.. Analytical Quality by Design – A Legitimate Paradigm for Pharmaceutical Analytical Method Development and Validation. 2017.

KOEL, M.; KALJURAND, M.. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. Pure And Applied Chemistry, [S.L.], v. 78, n. 11, p. 1993-2002, 1 jan. 2006. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200678111993>.

MARRA, M. C.; SILVA, P. L.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.. Ultra-Fast Determination of Scopolamine, Orphenadrine, Mepyramine, Caffeine, Dipyrone, and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 913-919, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140061>.

MOLNÁR-INSTITUTE for Applied Chromatography | DryLab®DryLab. Disponível em: <https://molnar-institute.com/drylab/>. Acesso. 16 mar. 2023

MOREIRA, C. dos S.. Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado no desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos. 2019. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. doi: 10.11606/D.9.2020.tde-19022020-164639.

NEUROTIKER. Metamizol.svg. 13 abr. 2008. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Metamizol.svg>. Acesso em: 17 out. 2023.

OLIVEIRA, L. G. de. Qualidade por Design Analítico (AQbD) aplicado ao desenvolvimento de métodos por cromatografia gasosa na matéria-prima de Cloridrato de Duloxetina. 2021. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2021.

POLITIS, S. N. et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 889-901, 23 fev. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>.

PRADO, A. G. S.. QUÍMICA VERDE, OS DESAFIOS DA QUÍMICA DO NOVO MILÊNIO. **Quim. Nova**, Brasília, v. 26, n. 5, p. 738-744, 31 mar. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Lr7DQT8pwNDfDPYJ53DwH6J/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 mar. 2023.

PRAMOD, K.; TAHIR, M. A.; CHAROO, N. A.; ANSARI, S. H.; ALI, J. Pharmaceutical product development: A quality by design approach. International journal of pharmaceutical investigation, v. 6, n. 3, p. 129–38, 2016.

PubChem. National Center for Biotechnology Information. Compound Summary for CID 522325, Dipyrone. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dipyrone>. Acesso em: 3 de fevereiro de 2023.

PubChem. National Center for Biotechnology Information. Compound Summary for CID 2519, Caffeine. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. Acesso em: 3 de fevereiro de 2023.

RAMAN, N. V. V. S. S.; MALLU, Useni Reddy; BAPATU, Hanimi Reddy. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance Manufacturing. **Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 2015, p. 1-8, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/435129>.

RIBEIRO, R. L. V. et al. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 300-306, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532004000200022>.

SANOFI - Medley Farmacêutica Ltda. Bula. DORFLEX® (dipirona monoidratada + citrato de orfenadrina + cafeína anidra).

SAWYNOK J; YAKSH TL. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. **Pharmacol Rev.** v. 1, n. 45, p.43-85. 1993

SUH, SY. et al. Caffeine as an Adjuvant Therapy to Opioids in Cancer Pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal Of Pain And Symptom Management**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 474-482, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpainsympman.2012.10.232>.

USP–NF, Farmacopeia dos Estados Unidos-Formulário Nacional. ANALYTICAL PROCEDURE LIFE CYCLE. Maio, 2022. Disponível em:  
[https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/gc-1220-pre-post-20210924.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/usp-nf-notices/gc-1220-pre-post-20210924.pdf). Acesso. 10 set. 2023.

VACCINATIONIST. Caffeine structure.svg. 24 dez. 2016. Disponível em:  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caffeine\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caffeine_structure.svg) Acesso em: 17 out. 2023.

VICENTINI, C. B. et al. Efeito comparativo entre a dipirona sódica e a dipirona sódica associada à cafeína no controle da dor pós-exodontia. **Revista Dor**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 174-178, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-00132013000300004>.

VIEIRA, J. C. et al. HPLC–DAD Method for Simultaneous Determination of Dipyrone (Metamizole) and Caffeine in Tablets and Identification of Major Degradation Product by Direct Infusion ESI–MS. **Chromatographia**, [S.L.], v. 80, n. 3, p. 489-495, 27 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-017-3263-9>.

YOGENDRARAJAH, P. et al. Application of design space and quality by design methodologies combined with ultra high-performance liquid chromatography for the optimization of the sample preparation of complex pharmaceutical dosage forms. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 227, p. 115149, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115149>.

YU, L. X. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 4, p. 781–791, 2008.

ZACHARIS, C. K.; VASTARDI, E.. Application of analytical quality by design principles for the determination of alkyl p -toluenesulfonates impurities in Aprepitant

by HPLC. Validation using total-error concept. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 150, p. 152-161, fev. 2018. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.009>.

ZHANG, L.; MAO, S. Application of quality by design in the current drug development. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-8, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>

**São Paulo, 02 de dezembro de 2023.**

*Lucas B. Soares Rodrigues*

Assinatura do Aluno

*Josiane S. P. Daniel*

Assinatura do Orientador