

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

**FERRAMENTA *IN SILICO* PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS - APLICAÇÃO EM MISTURAS DE FILTROS
SOLARES**

Paula Beatriz Silva Passarin

MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. 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

**FERRAMENTA *IN SILICO* PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS - APLICAÇÃO EM MISTURAS DE FILTROS
SOLARES**

Paula Beatriz Silva Passarin

Versão Original

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

P286f Passarin, Paula Beatriz Silva
FERRAMENTA IN SILICO PARA DESENVOLVIMENTO DE
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS - APLICAÇÃO EM MISTURAS DE
FILTROS SOLARES / Paula Beatriz Silva Passarin. -
São Paulo, 2019.
66 p.

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

1. Planejamento de Experimentos. 2. Relação
Quantitativa entre Estrutura e Retenção. 3.
Descritores Moleculares. 4. Cromatografia Líquida.
5. Método de Monte Carlo. I. T. II. Lourenço, Felipe
Rebello, orientador.

Paula Beatriz Silva Passarin

**FERRAMENTA *IN SILICO* PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS - APLICAÇÃO EM MISTURAS DE FILTROS
SOLARES**

Comissão Julgadora
Dissertação para Obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____

*“A igreja diz: o corpo é uma culpa.
A ciência diz: o corpo é uma máquina.
A publicidade diz: o corpo é um negócio.
O corpo diz: eu sou uma festa.”*

Eduardo Galeno

AGRADECIMENTOS

A vida sempre me foi gentil e, leve como uma brisa, vive a me presentear. Sou grata por ter me proporcionado a experiência do mestrado. Foi um período intenso, de aprendizados intelectuais e emocionais, contribuindo para o fortalecimento individual que eu tanto buscava. Nesse caminho tive a oportunidade de conhecer diferentes pessoas que de alguma forma contribuíram para meu projeto e enriquecimento pessoal. Nesse período tive a oportunidade de conviver com meu orientador, Felipe, um ser gentil e atencioso, que tem a capacidade incrível de respeitar a individualidade e liberdade das pessoas, algo simples, mas tão difícil de encontrar. Estreitei laços também com a minha amiga maravilhosa, Luciana. Uma mulher forte, determinada e extremamente companheira. Sou muito grata pela sua amizade, pelo seu exemplo. Agradeço ao Aldo, meu companheiro, por toda compreensão, carinho e apoio. Sou muito feliz em dividir a vida com você. Finalmente, tudo isso só foi possível graças ao apoio da minha família, Ana, Valéria e Paulo. Pessoas maravilhosas que me ensinaram grande parte do que sou como pessoa e que sempre estiverem ao meu lado. Termino o mestrado uma pessoa diferente, mais centrada, forte e madura. Sou só gratidão!

RESUMO

PASSARIN P.B.S. **FERRAMENTA *IN SILICO* PARA DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS - APLICAÇÃO EM MISTURAS DE FILTROS SOLARES**. 2019. (Dissertação de Mestrado) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O Planejamento de Experimentos (DoE) permite obter e explorar conhecimentos sobre inúmeros sistemas, facilitando a coleta de informações com reduzido número de experimentos. No entanto, DoE é restrito ao delineamento do desenho experimental. Para superar essa limitação e permitir uma previsão precisa dos tempos de retenção para uma seleção de filtros UV orgânicos sob diversas condições, usamos a Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção combinada com o método de Monte Carlo para desenvolver uma plataforma *in silico* capaz de prever o perfil cromatográfico de filtros UV orgânicos. Sete analitos foram usados para estabelecer o modelo de predição: benzofenona-3, avobenzona, ethilhexil triazona, octil dimetil PABA, metoxicinamato de octila, tinosorb® S e octocrileno. Os valores residuais obtidos no modelo de análise de regressão múltipla mostraram distribuição normal, homocedasticidade e independência. Os coeficientes de determinação (R^2) e predição (R^2_{pred}) foram de 99,82% e 99,71%, respectivamente. A plataforma *in silico* apresentou grande potencial para predição do perfil cromatográfico de filtros UV orgânicos, da coeluição de analitos, de seus parâmetros cromatográficos, além de permitir, sem experimentação, uma visão geral do comportamento de retenção de compostos sob diversas condições cromatográficas.

PALAVRAS CHAVES: Planejamento de Experimentos, Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção, Descritores Moleculares, Cromatografia Líquida, Método de Monte Carlo.

ABSTRACT

PASSARIN P.B.S. *IN SILICO* TOOL FOR DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHODS - APPLICATION IN MIXTURES OF SUNSCREENS. 2019. (Masters Dissertation) – Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Design of Experiments (DoE) allows obtaining and exploring knowledge about innumerable systems, facilitating the information collection with reduced number of experiments. However, DoE is restricted to the limited range which experimental design was delineated. In order to overcome this limitation and enable accurate prediction of retention times for a selection of organic UV filters under various conditions, we used the Quantitative Structure-Retention Relationships tool combined with Monte Carlo method to develop an *in silico* platform capable of predicting chromatographic profile of organic UV filters. Seven analytes were used to establish the prediction model: benzophenone-3, butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl triazone, ethylhexyl dimethyl PABA, ethylhexyl methoxycinnamate, bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine and octocrylene. Residual values obtained from multiple regression analysis model showed normal distribution, homoscedasticity, and independence. Determination (R^2) and prediction (R^2 pred) coefficients were found to be 99,82% and 99,71%, respectively. *In silico* platform presented great potential for predicting chromatographic profile of organic UV filters, analytes coelution, chromatographic parameters and allowing, without experimentation, an overview of retention behavior of compounds under various chromatographic conditions.

KEYWORDS: Design of Experiments, Quantitative Structure-Retention Relationships, Molecular Descriptors, Liquid Chromatography, Monte Carlo method.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 1.1. Qualidade por Design Analítico | 3 |
| 1.2. Planejamento de Experimentos | 5 |
| 1.2.1. Planejamento Fatorial Completo e Fracionado..... | 6 |
| 1.2.2. Análise de Variância..... | 7 |
| 1.3. Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção | 10 |
| 1.4. Monte Carlo | 11 |
| 1.5. Filtros Orgânicos..... | 12 |
| 1.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 17 |
| 2. OBJETIVO..... | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 3.1. Filtros Orgânicos e Reagentes | 29 |
| 3.2. Preparo de amostra..... | 29 |
| 3.3. Preparo de Fase Móvel | 30 |
| 3.4. Instrumentação | 30 |
| 3.5. Planejamento de Experimentos | 31 |
| 3.6. Descritores Moleculares..... | 32 |
| 3.7. Modelagem | 33 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 4.1. O Modelo..... | 37 |
| 4.2. Simulando Cromatograma com o ChromSimulator..... | 46 |
| 5. CONCLUSÕES | 55 |
| REFERÊNCIAS..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Nomenclatura (usual e INCI), abreviação, comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e máxima concentração permitida (MCP) no Brasil dos filtros UV utilizados. 14
- Tabela 2** - Informações e propriedades físico-químicas dos filtros UV utilizados. 15
- Tabela 3** - Análise de variância (ANOVA) para o tempo de retenção (Y1) de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp). 38
- Tabela 4** - Equação de regressão e coeficientes de determinação para o tempo de retenção (Y1) de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp). 39
- Tabela 5** – Valores de retenção, assimetria, pratos teóricos e resolução entre picos determinado a partir do cromatograma obtido por 50.000 simulações de Monte Carlo, utilizando a equação de regressão para o tempo de retenção. 49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química dos filtros benzofenona-3 (BZ3), avobenzona (BMDM), octil dimetil PABA (ODPABA), metoxinamato de octila (OMC), ethilhexil triazona (ET), octocrileno (OCT) e tinosorb® S (EMT). Fonte: Pubchem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), 2019..... 16
- Figura 2** - Gráfico de efeitos principais para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).40
- Figura 3** - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).41
- Figura 4** - Gráfico de interações para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).44
- Figura 5** – Gráfico de dispersão para o tempo de retenção previsto versus o tempo de retenção experimental, para ajuste do modelo de regressão (●) e validação externa (■).46
- Figura 6** – Ilustração do uso do *ChromSimulador* para simular o perfil cromatográfico de uma mistura de 5 filtros.48
- Figura 7** – Comparação entre o cromatograma experimental (A) e simulado (B) para BZ3, OCT, ODPABA, MET, e AVO, obtido utilizando proporção de etanol na fase móvel (%EtOH = 70,0 ± 0,1 %), pH da fase móvel (pH = 2,4 ± 0,05), fluxo da fase móvel (FI = 0,60 ± 0,05 mL min⁻¹) e temperatura da coluna (Temp = 40,0 ± 0,1 °C).50

LISTA DE ABREVIações

| | |
|--------|---|
| AQbD | Qualidade por <i>Design</i> Analítico |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ARM | Análise de regressão múltipla |
| BMDM | Avobenzona |
| BZ3 | Benzofenona-3 |
| C8 | Coluna de sílica octilada |
| C18 | Coluna de sílica octadecilada |
| DAD | Detector de arranjo de diodos |
| DoE | Planejamento de Experimentos |
| EMT | Tinosorb® S |
| ET | Ethilhexil triazona |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FPS | Fator de Proteção Solar |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| ICH | Conferência Internacional de Harmonização |
| INCI | <i>Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i> |
| µL | Microlitro |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| N | Número de pratos teóricos |
| ODPABA | Octil Dimetil PABA |
| OCT | Octocryleno |
| OMC | Metoxicinamato de octila |

| | |
|---------------------|---|
| OOS | <i>Out-of-specification</i> |
| PABA | Ácido para-amino benzoico |
| pH | Potencial de hidrogênio iônico |
| QbD | Qualidade por <i>Design</i> |
| QSRR | Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção |
| R ² | Coefficientes de Determinação |
| R ² aj | Coefficientes de Determinação Ajustado |
| R ² pred | Coefficientes de Determinação de Predição |
| UV | Ultravioleta |
| UVA | Ultravioleta A |
| UVAI | Ultravioleta A I |
| UVAII | Ultravioleta A II |
| UVB | Ultravioleta B |
| UVC | Ultravioleta C |
| °C | Graus Celsius |
| λ | Comprimento de onda |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Encontrar condições ótimas de separação com base em previsões teóricas de retenção e separação, na ausência de experimentação anterior ou com experimentação mínima, com assertividade suficiente para apoiar o desenvolvimento analítico, é um passo importante no desenvolvimento racional de métodos para cromatografia líquida (TARAJI et al., 2017). Para o devido fim, é crescente o desenvolvimento sistemático de métodos de cromatografia líquida de acordo com os princípios de Qualidade por *Design* Analítico (AQbD). A proposta deste trabalho é utilizar *Design* de Experimentos (DoE) unido à compreensão química oferecida pela Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção (QSRR), combinada com o método de Monte Carlo (MMC), com a intenção de criar uma ferramenta *in silico* capaz de prever o perfil cromatográfico de misturas de filtros orgânicos ultravioleta, baseado nos descritores dessas moléculas, assim como nas condições cromatográficas, a fim de racionalizar o desenvolvimento de um método analítico e facilitar a possível aplicação da abordagem AQbD.

1.1. Qualidade por *Design* Analítico

Qualidade por *Design* (do inglês *Quality by Design* – QbD) foi um conceito, primeiramente desenvolvido, pelo pioneiro da qualidade, Dr. Joseph M. Juran, que acreditava que a qualidade deveria ser projetada em um produto (YU et al., 2014). A abordagem QbD é uma abordagem científica, sistemática e abrangente que cria qualidade no processo, em vez do processo tradicional de testar a qualidade do

produto ao longo do ciclo de vida biofarmacêutico (por exemplo, desenvolvimento e fabricação) (NAGASHIMA et al., 2013).

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH), define QbD como “uma abordagem sistemática para o desenvolvimento farmacêutico que começa com objetivos predefinidos e enfatiza a compreensão do produto e processo e seu controle, com base em ciência sólida e gerenciamento de risco de qualidade” (ICH EXPERT WORKING GROUP, 2009). Por meio de documentos técnicos, que fornecem instruções de alto nível em relação ao escopo e definição de QbD aplicado à indústria farmacêutica, a ICH busca definir uma nova concepção na produção de medicamentos. O Food and Drug Administration (FDA) reconhece e incentiva abordagens baseadas em riscos e a adoção dos princípios de QbD no desenvolvimento, fabricação e regulamentação de medicamentos (YU et al., 2014).

O conceito de QbD pode ser estendido para o desenvolvimento analítico, sendo assim chamado de Qualidade por *Design* Analítico (em inglês *Analytical Quality by Design – AQbD*). Seu principal objetivo é atingir o desempenho ideal do método (YAO et al., 2016), proporcionando maior compreensão e controle sobre os parâmetros analíticos críticos, visando gerenciar riscos, garantindo um sistema eficiente e com região de operação do método bem definida (IZAT; YERLIKAYA; CAPAN, 2014).

Para isso, o AQbD pode fazer uso de diversas ferramentas matemáticas, estatísticas, de avaliação de risco, de tecnologia analítica de processo (PAT) e de melhoria contínua que focam principalmente na identificação de parâmetros críticos e na definição de um espaço de projeto (IZAT; YERLIKAYA; CAPAN, 2014). Dessa forma, é possível obter flexibilidade regulatória (ROZET et al., 2013), reduzir as rejeições de produtos (resultados fora de especificação ou OSS – do inglês *out-of-*

specification), os custos (IZAT; YERLIKAYA; CAPAN, 2014), a variabilidade dos resultados analíticos e portanto, melhorar o desempenho do método analítico (YU et al., 2014; PATEL et al., 2016).

1.2. Planejamento de Experimentos

O conceito de Planejamento de Experimentos (do inglês *Design of Experiments* - DoE) originou-se na década de 1920, com trabalho do estatístico Ronald Fisher, cuja contribuição para as bases da ciência estatística moderna é amplamente reconhecida. Fisher destacou a necessidade de considerar a análise estatística durante as fases de planejamento da pesquisa e não somente nas fases finais da experimentação. Enquanto os primeiros DoEs foram aplicados por Fisher no campo da agricultura, seu uso entrou na indústria de processos químicos durante a década de 1950 (POLITIS et al., 2017).

O DoE é uma abordagem estruturada e organizada que abrange a compreensão completa do produto, bem como do método analítico (DHAT et al., 2017). Sendo assim, se estabelece um projeto de experimentação, a fim de estudar o efeito dos fatores que afetam a resposta do método, definir um espaço de projeto robusto, onde o método pode ser operado em qualquer lugar nessa região (PATEL et al., 2016), além de encontrar valores de fatores que otimizam a resposta do método (HIBBERT, 2012).

A aplicação de DoE permite obter: i) máximo de informações de um número mínimo de experimentos; ii) estudar os efeitos individualmente variando todos os parâmetros operacionais simultaneamente; iii) considerar a variabilidade dos

experimentos; iv) identificar interações entre parâmetros analíticos; e v) caracterizar intervalos aceitáveis de parâmetros analíticos críticos, contribuindo para a identificação de um espaço de *design* (SHIVHARE; MCCREATH, 2010).

Os estudos de DoE começam com uma seleção cuidadosa de experimentos planejados. Existem inúmeros planejamentos, e a escolha do projeto experimental deve ser conduzida tanto pela hipótese quanto pela necessidade de compreensão, onde a escolha seja com rigor estatístico para assegurar que o efeito de um determinado fator não seja confundido com outro (TABORA; DOMAGALSKI, 2017).

O projeto experimental dá origem a dados multifatoriais que podem ser ajustados a uma função empírica, geralmente linear ou quadrática com termos de interação, que podem ser usados para fornecer informações sobre o sistema (HIBBERT, 2012). Portanto, DoE utiliza técnica de regressão múltipla para aplicação sistemática de estatística à experimentação (FICARRA et al., 2002), através da geração de um modelo matemático por análise de variância (ANOVA), extrapolação de dados, e geração e representações gráficas, mostrando correlação entre fatores de entrada e resposta dentro de uma região operável (PATEL et al., 2016; DHAT et al., 2017).

1.2.1. Planejamento Fatorial Completo e Fracionado

Diversas variáveis podem afetar a resposta de um sistema, portanto, é necessário selecionar quais das diversas variáveis experimentais e suas interações apresentam efeitos significativos. Para isso, planejamentos de triagem empregando planejamentos fatoriais são usados na primeira etapa do DoE (FRANCISCO et al.,

2014; FUKUDA et al., 2018). Dessa forma, as corridas cromatográficas acontecem a partir de combinações entre os fatores e seus níveis. A escolha dos níveis é importante e deve ser apropriada, contendo informações úteis. Níveis com valores muito próximos não permitem variação suficiente na resposta a ser observada (HIBBERT, 2012)

O planejamento fatorial completo de dois níveis é bastante poderoso, sendo capaz de estimar os principais efeitos dos fatores e suas interações que afetam as respostas. Porém, sua principal limitação está no grande número de experimentos necessários, quando comparados a experimentos fatoriais fracionados (FUKUDA et al., 2018). Por esse motivo o planejamento fatorial fracionado se torna interessante, pois é capaz de identificar efeitos principais realizando um subconjunto específico de experimentos (HIBBERT, 2012) que permite a avaliação de um número relativamente grande de fatores a partir de um número reduzido de experimentos (CANDIOTI et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

1.2.2. Análise de Variância

O modelo matemático deve ser selecionado com base na aplicação de análise de variância (ANOVA), um método estatístico baseado no teste F que compara a variabilidade decorrente da mudança de nível para cada fator de entrada, com a variabilidade devido ao erro residual. Essa comparação permite avaliar a significância do modelo de regressão. O resíduo (diferença entre a resposta prevista pelo modelo matemático e a resposta experimental) da regressão deve apresentar distribuição normal, homocedasticidade e independência. Quando necessário, uma

transformação da resposta de interesse (por exemplo, transformação logarítmica) pode ser usada para melhorar a normalidade e homocedasticidade de resíduos (VIEIRA, 2006)

A fim de simplificar o modelo, os termos são adicionados ou removidos de acordo com sua significância (p-valor < 0,05) (SHIVHARE; MCCREATH, 2010; TABORA; DOMAGALSKI, 2017). Desse modo, o modelo é criado dando origem à uma expressão polinomial, que permite estimar as relações entre as variáveis através de uma função de regressão (SAHU et al., 2014), exemplificada abaixo:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1X_2 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2$$

Onde, Y é a resposta; b_0 é a média aritmética de todos os resultados quantitativos das séries experimentais; b_1 e b_2 são os coeficientes estimados a partir dos valores experimentais observados de Y para os termos lineares X_1 e X_2 ; b_{12} é o coeficiente para os termos de interação X_1X_2 ; e b_{11} e b_{22} são os coeficientes para os termos quadráticos, ou de segunda ordem, X_1^2 e X_2^2 . Um sinal positivo na frente dos termos indica relação diretamente proporcional entre o fator de entrada e a resposta, enquanto sinal negativo indica relação inversamente proporcional entre o fator de entrada e a resposta (DHAT et al., 2017).

O ajuste do modelo de regressão múltipla deve ser avaliado com base nos coeficientes de determinação (R^2 , R^2 aj e R^2 pred). O coeficiente de determinação (R^2) indica a proporção da variância da resposta de interesse que é explicada pelo modelo de regressão e será próximo de 100% quando o modelo é bem ajustado aos dados experimentais. O R^2 aj é uma versão modificada do R^2 que é ajustada para o número de termos no modelo de regressão, sendo o mais indicado para a

comparação entre modelos com diferente número de termos. O R^2 pred indica o quão bem um modelo de regressão prevê respostas de interesse para novas observações (ROMERO; LOURENÇO, 2017). O R^2 pred é calculado removendo sistematicamente cada observação do conjunto de dados, estimando a equação de regressão e determinando quão bem o modelo prediz a observação removida (PERES et al., 2017). Esse processo é conhecido como validação cruzada de exclusão única (*cross validation leave-one-out*).

A validação interna permite que o modelo tenha uma complexidade adequada, evitando *underfitting* (um modelo muito simples) e *overfitting* (um modelo super ajustado aos dados de calibração) (VARMUZA; FILZMOSER; DEHMER, 2013). Com o propósito de confirmar a confiabilidade do modelo de predição para a finalidade pretendida, a validação externa também deve ser realizada. A validação externa é realizada usando um conjunto de dados de validação independente a fim de verificar a capacidade do modelo de prever novas respostas (ROY et al., 2016; POR; AKOWUAH; GAURAV, 2018).

Portanto, com a expressão polinomial, que consiste apenas de fatores significativos, um espaço de conhecimento multivariado pode ser delineado para encontrar regiões de risco, o desempenho ideal do modelo (TABORA; DOMAGALSKI, 2017), bem como permitir a extrapolação de dados (DHAT et al., 2017).

1.3. Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção

A ferramenta de Relação Quantitativa entre Estrutura e Retenção, do inglês *Quantitative Structure - Retention Relationships* (QSRR), estabelece relações matemáticas estatisticamente derivadas entre os parâmetros de retenção cromatográfica e a estrutura química dos analitos, visando encontrar relações significativas entre eles (PARK et al., 2017; MALJURIĆ et al., 2018; WEN et al., 2018) e permitindo a minimização da experimentação (Park et al., 2017). A partir de um procedimento lógico e matemático, softwares possibilitam a transformação de informações químicas em um número útil, dando origem de centenas à milhares de descritores moleculares (ROY et al., 2016; MALJURIĆ et al., 2018). Com isso, uma seleção desses descritores se faz necessária (VARMUZA; FILZMOSE; DEHMER, 2013).

A obtenção dos descritores para estabelecer o modelo matemático deve ser claramente definida, fácil e reprodutível, além de gerar um algoritmo inequívoco. O algoritmo é caracterizado pelo método matemático de cálculo utilizado e pelos descritores moleculares específicos exigidos na equação matemática do modelo. Portanto, o procedimento exato usado para calcular os descritores, incluindo pré-tratamento dos compostos, o software empregado e o método de seleção de variáveis para o desenvolvimento do modelo devem ser considerados como partes integrantes da definição geral de um algoritmo inequívoco (GRAMATICA, 2007). Finalmente, o desenvolvimento de modelos utilizando descritores moleculares é uma maneira oportuna de estimar tempos de retenção de compostos (TUMPA et al., 2016).

1.4. Monte Carlo

Aplicado inicialmente no ano de 1940, o método de Monte Carlo foi utilizado por cientistas para calcular as probabilidades de um átomo de urânio em fissão ocasionar a fissão de outro átomo. Tendo em vista a escassez de urânio, o método foi usado para criar dados simulados suficientes e confiáveis, reduzindo a quantidade de urânio necessária para os testes. Portanto, os dados simulados podem ser usados em situações onde os recursos são limitados ou quando obter dados reais é muito caro ou impraticável (SHEEHY; MARTZ, 2012).

O método de Monte Carlo é uma técnica probabilística que utiliza uma amostragem aleatória para simular dados de um determinado modelo matemático a fim de obter resultados específicos (SHEEHY; MARTZ, 2012). Ela considera o risco e a incerteza do modelo ao incluir a variabilidade dos resultados obtidos durante os experimentos analíticos (SCIBILIA, 2009; ROMERO; LOURENÇO, 2017), tendo assim, utilidade na avaliação da robustez do método (BEG et al., 2017).

Cada fator e suas interações são representados por possíveis valores aleatórios, onde esses valores são inseridos na equação matemática que define o modelo, e então, são calculadas as respostas para cada possibilidade. Desse modo, cada réplica da simulação deve representar adequadamente o intervalo de possíveis valores de fatores e respostas e fornecer resultados precisos permitindo uma inferência estatística. O valor de 50.000 simulações é considerado padrão, sendo suficiente para obter um espaço amostral (ROMERO; LOURENÇO, 2017).

1.5. Filtros Orgânicos

Autoridades sanitárias internacionais recomendam o uso de produtos contendo filtro ultravioleta (UV) a fim de reduzir os efeitos deletérios causados pelo excesso de exposição à radiação UV (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018). A radiação UV (100-400 nm) é prejudicial, constituindo um risco para a saúde humana com efeitos adversos agudos, como queimaduras solares, e doenças crônicas, como o câncer de pele (SMAOUI et al., 2017; COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018). A radiação UV é dividida em: i) UVA (320 a 400 nm) que pode ser subdividido em UVAI (340 a 400 nm) e UVAIL (320 a 340 nm); ii) UVB (290 a 320 nm); e iii) UVC (100 a 290 nm) (BALOGH et al., 2011)

Protetores solares são preparações cosméticas, que podem se apresentar de diversas formas, frequentemente formulados a partir de uma mistura de filtros UV (BALOGH et al., 2011). Os agentes de proteção solar são comumente utilizados em combinação, uma vez que nenhum filtro UV, utilizado nos níveis atualmente permitidos pela legislação, proporciona um fator de proteção solar (FPS) suficientemente elevado (DÍAZ-CRUZ et al., 2008).

Os filtros UV podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os inorgânicos são micropartículas minerais, que agem refletindo e dispersando a radiação. Usualmente são utilizados filtros orgânicos que possuem alta absorvidade na faixa da luz UV, convertendo-a em calor (DÍAZ-CRUZ et al., 2008; MORETA; TENA, 2011). Os filtros UV orgânicos podem ser divididos em: i) filtros UVA, que exercem proteção contra a radiação UVA; ii) filtros UVB, que exercem proteção frente à radiação UVB, são amplamente utilizados há décadas e são bastante efetivos, podendo filtrar até 90%

da radiação UVB; e iii) filtros de amplo espectro, capazes de proteger contra radiação UVA e UVB (BALOGH et al., 2011).

Os filtros orgânicos são classificados em diferentes grupos de acordo com sua estrutura química: derivados da benzofenona, derivados do ácido p-aminobenzóico, salicilatos, cinamatos, derivados do benzotriazol, derivados do benzimidazol, derivados da cânfora, derivados da triazina e outros (CHISVERT; SALVADOR, 2007). Uma característica comum a eles é a presença de estruturas aromáticas com uma cadeia lateral exibindo diferentes graus de instauração (DÍAZ-CRUZ et al., 2008; WHARTON et al., 2011).

Em relação à solubilidade, podem ser divididos em lipossolúveis ou hidrossolúveis (BALOGH et al., 2011), sendo os lipossolúveis os mais empregados devido à sua resistência à água. Cada país regula os compostos que podem ser usados como filtros UV em cosméticos e suas concentrações máximas permitidas (CHISVERT; TARAZONA; SALVADOR, 2013). Nos diferentes países, a concentração habitual está entre 0,1 e 10%. As concentrações mais baixas estão presentes em formulações cosméticas em que o filtro UV atua para proteger outros componentes da mistura contra a degradação por UV (KHALIKOVA et al., 2018).

A concentração de filtros UV em formulações cosméticas deve ser monitorada para verificar se os níveis estão dentro do limite máximo permitido pela legislação e garantir o FPS rotulado nas preparações comerciais (SALVADOR; CHISVERT, 2005a). Dessa maneira, é possível garantir a segurança do produto final, uma vez que existem vários efeitos colaterais dermatológicos indesejáveis pelo uso de filtros solares (SMAOUI et al., 2017).

No presente trabalho utilizamos sete filtros UV orgânicos lipossolúveis comumente utilizados (Tabela 1), com diferentes estruturas químicas (Figura 1) e

propriedades físico-químicas (Tabela 2), para o desenvolvimento da ferramenta *in silico*.

Tabela 1 - Nomenclatura (usual e INCI), abreviação, comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) e máxima concentração permitida (MCP) no Brasil dos filtros UV utilizados.

| Nome Usual | Nome INCI ⁽¹⁾ | Abreviação | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) ⁽²⁾ | MCP (%) ⁽³⁾ |
|------------------------|--|------------|--|------------------------|
| Benzofenona-3 | Benzophenone-3 | BZ3 | 290 | 10 |
| Avobenzona | Butyl methoxydibenzoilmethane | BMDM | 358 | 5 |
| Octil Dimetil PABA | Ethylhexyl Dimetyl PABA | ODPABA | 310 | 8 |
| Metoxinamato de octila | Ethylhexyl methoxycinnamate | OMC | 306 | 10 |
| Ethilhexil triazona | Ethylhexyl triazone | ET | 310 | 5 |
| Octocrileno | Octocrylene | OCT | 300 | 10 |
| Tinosorb® S | Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine | EMT | 340 | 10 |

Fonte: ^{1,3}(ANVISA, 2016); ²(DÍAZ-CRUZ et al., 2008)

A cetona aromática benzofenona-3 (BZ3) (BALOGH et al., 2011), pertencente ao grupo das benzofenonas (KHALIKOVA et al., 2018), absorve radiação UVB e UVA-II. Ela utiliza a transferência de prótons intramoleculares no estado excitado de um grupo hidroxila para dissipar a energia da luz de maneira inofensiva, convertendo a energia do fóton absorvida em calor (SMAOUI et al., 2017).

O filtro avobenzona (BMDM) é um derivado de dibenzoilmetano e foi o primeiro filtro UV a apresentar proteção contra a radiação UVA-I. Este filtro é altamente fotolábil, podendo afetar outros ingredientes ativos, tornando-se necessária a fotoestabilização das formulações (BALOGH et al., 2011; SAMBANDAN; RATNER, 2011). Por isso, a fim de aumentar sua fotoestabilidade e eficácia, é comumente combinada com uma variedade outros filtros UV, tais como o octocrileno (COZZI; PERUGINI; GOURION-ARSIQUAUD, 2018) e o tinosorb® S (SAMBANDAN; RATNER, 2011). Portanto, o octocrileno (OCT), apesar de fraco

absorvedor UVB (BALOGH et al., 2011), é um filtro fotoestável, capaz de melhorar a fotoestabilidade do produto final quando combinado com outros filtros solares (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

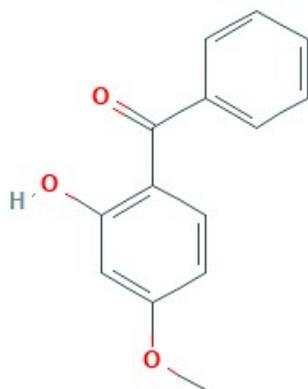
O metoxinamato de octila (OMC) é um éster derivado do ácido cinâmico, capaz de absorver a radiação UVB. O OMC é um ingrediente comum em filtros solares e outros produtos de cuidados com a pele para minimizar fotodanos ao DNA. Igualmente, o éster derivado do ácido aminobenzóico, octil dimetil PABA (ODPABA), é um efetivo agente protetor UVB (BALOGH et al., 2011), geralmente usado em combinação com outros filtros UV para aumentar o FPS geral (SAMBANDAN; RATNER, 2011).

Tabela 2 - Informações e propriedades físico-químicas dos filtros UV utilizados.

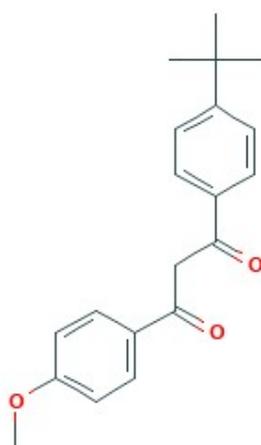
| | pKa⁽¹⁾ | LogP⁽¹⁾ | Solubilidade⁽²⁾ |
|---------------|------------------------------|---------------------------|--|
| BZ3 | 7,07 | 3,62 | |
| BMDM | 6,55 | 4,56 | |
| ODPABA | 2,9 | 5,11 | |
| OMC | Não possui átomos ionizáveis | 5,38 | Baixa solubilidade ou insolúvel em água; solúvel na maioria dos solventes orgânicos. |
| ET | 3,66 / 11,26 | 15,29 | |
| OCT | Não possui átomos ionizáveis | 6,78 | |
| EMT | 0,35 / 6,37 | 11,62 | |

Fonte: ⁽¹⁾Chemicalize (chemicalize.com), 2019; ⁽²⁾Pubchem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), 2019.

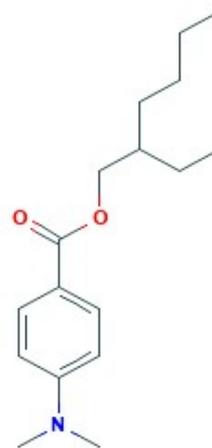
O etilhexil triazona (ET) é um filtro UVB solúvel em óleo usado em formulações cosméticas em concentrações de até 5%. Devido à sua insolubilidade em água e afinidade pela queratina da pele, é particularmente adequado para produtos resistentes à água. Sua excelente fotoestabilidade e alto coeficiente de absorção o tornam um ingrediente valioso quando é necessário um alto valor de FPS (SOBANSKA; PYZOWSKI, 2012)



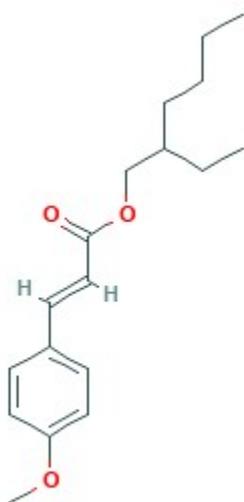
Benzofenona-3



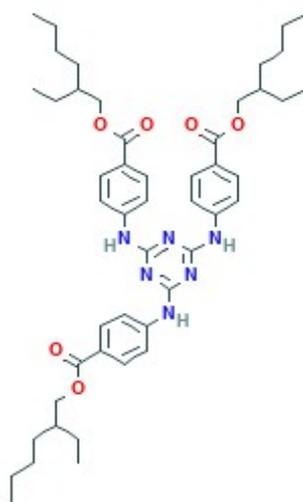
Avobenzona



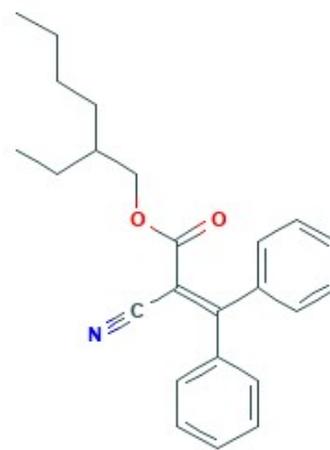
Octil dimetil PABA



Metoxinamato de octila



Etilhexil triazona



Octocrileno



Tinosorb® S

Figura 1 - Estrutura química dos filtros benzofenona-3 (BZ3), avobenzona (BMDM), octil dimetil PABA (ODPABA), metoxinamato de octila (OMC), ethilhexil triazona (ET), octocrileno (OCT) e tinosorb® S (EMT). Fonte: Pubchem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), 2019.

Diferentemente dos filtros anteriores, tinosorb® S (EMT) é um filtro UV de amplo espectro, com excelente absorção em toda a gama de radiação UVA. Apresenta alta fotoestabilidade como resultado de sua estrutura molecular que facilita a dissipação da energia incidente; não formando, portanto, nenhuma espécie intermediária reativa e nenhum produto de decomposição fotolítica na pele. O EMT foi utilizado com sucesso para melhorar a fotoestabilidade e a eficácia de filtros solares contendo BMDM e OMC (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

1.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Não há métodos analíticos oficiais para a determinação de filtros UV em cosméticos de proteção solar (SMAOUI et al., 2017). Os órgãos reguladores indicam especificações técnicas que, diferente dos métodos oficiais, não são obrigatórias, porém são padrões voluntários que oferecem uma garantia de qualidade (MILDAU, 2018). Portanto, métodos eficientes e confiáveis são necessários para controlar esses produtos.

Devido à preocupação científica e pública com a saúde e o meio ambiente, nos últimos anos práticas chamadas "verdes", "ecológicas", ou "favoráveis ao meio ambiente" (MOHAMED, 2015) estão sendo utilizadas para a análise de filtros UV (CHISVERT; PASCUAL-MARTÍ; SALVADOR, 2001a; CHISVERT; PASCUAL-MARTÍ; SALVADOR, 2001b; CHISVERT; SALVADOR, 2002; J. SCHAKEL; KALSBECK; BOER, 2004; SALVADOR; CHISVERT, 2005b; DESTANDAU; LESELLIER, 2008; NYEBORG et al., 2010; WHARTON et al., 2011; CHISVERT; TARAZONA; SALVADOR, 2013). Os principais objetivos de se utilizar um método

verde são a redução ou eliminação de solventes orgânicos tóxicos e outras substâncias com efeitos perigosos (MALJURIĆ et al., 2018). Desta forma, considerando solventes alternativos, entre outros, em termos de toxicidade, custo, segurança, trabalhabilidade, seletividade cromatográfica e força de eluição (SHEN; CHEN; VAN BEEK, 2015).

Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), é a técnica mais utilizada para a determinação de filtros UV em produtos cosméticos. HPLC é compatível com a baixa volatilidade dos filtros (CHISVERT; TARAZONA; SALVADOR, 2013; SMAOUI et al., 2017), além de ser capaz de separar, identificar e quantificar componentes em uma mistura complexa. Apresenta rapidez, precisão, baixo custo, robustez e flexibilidade (GIL, 2007; SKOOG et al., 2015).

Em HPLC, a amostra é solubilizada em um líquido, chamado de fase móvel, que a partir de uma pressão constante, passa por uma coluna, chamada fase estacionária. A separação dos analitos ocorre pela afinidade com a coluna (SEPAROVIC; SAVIANO; LOURENÇO, 2018), fazendo com que a diferença de interação de cada componente altere sua velocidade de eluição em relação ao fluxo da fase móvel. A fase móvel pode apresentar um único solvente ou uma mistura constante de solventes, chamada de eluição isocrática, ou ainda apresentar uma variação contínua da composição de solventes, chamada de eluição por gradiente (GIL, 2007; SKOOG et al., 2015).

O metanol, a acetonitrila e tetrahidrofurano são comumente utilizados como fase móvel em análises de filtros solares, porém, são compostos altamente tóxicos. O etanol, por outro lado, é um substituinte menos tóxico para estes compostos. Devido à maior força de eluição, o uso de misturas etanol-água também permite

diminuir a quantidade de solvente orgânico necessário para conseguir uma separação, enquanto que, apesar de uma maior viscosidade, as eficiências cromatográficas são tão boas quanto às obtidas com as fases móveis clássicas, requerendo apenas alguns ajustes nas condições analíticas (DESTANAU; LESELLIER, 2008).

Com base na polaridade da fase móvel e estacionária, a cromatografia pode ser dividida em normal ou reversa. Na primeira, a fase estacionária é polar em relação à fase móvel, favorecendo a eluição de componentes polares. Na reversa, a fase estacionária é apolar e a móvel relativamente polar (GIL, 2007; SKOOG et al., 2015). Nesse caso, o aumento da polaridade da fase móvel eleva o tempo de eluição. Na análise de filtros solares, em sua grande maioria resistentes à água, são utilizadas, idealmente, colunas de fase reversa (SMAOUI et al., 2017).

As colunas empregadas usualmente para análise de filtros UV compreendem empacotamentos de sílica ligada a grupos polares de cadeia longa, no caso, uma cadeia de dezoito carbonos para a coluna C18 e oito carbonos para a C8 (SMAOUI et al., 2017). A hidrofobicidade da coluna depende tanto do comprimento da cadeia ligante como de sua densidade. Colunas C18 possuem valores maiores de hidrofobicidade comparadas às colunas C8 (D. NEUE; MÉNDEZ, 2007). A coluna deve apresentar certa seletividade para obter uma boa separação dos analitos, característica também relacionada ao comprimento da cadeia apolar do ligante ou à incorporação de um grupo polar (VISKY, 2007).

Controlar a composição da fase móvel é a maneira mais simples e eficiente de regular as interações entre o analito e a fase estacionária, obtendo a separação desejada (GIL, 2007; AGRAFIOTOU et al., 2011). Ao modificar a composição do eluente é possível alterar as cargas dos grupos ionizáveis do analito e da fase

estacionária, alterando assim a solubilidade, o tempo de retenção e as propriedades de pico dos compostos de interesse, além da força de eluição da fase móvel (POUSTORRES et al., 2007; SUBIRATS; ROSÉS; BOSCH, 2007; AGRAFIOTOU et al., 2011; HUO; LI; ZHANG, 2013).

Para compostos ionizáveis, outro fator é capaz de alterar a retenção cromatográfica, o pH da fase móvel. Para um analito ionizável, a proporção entre as concentrações das formas neutra e iônica dependem do pH da fase móvel e do pKa do composto (ROSÉS; SUBIRATS; BOSCH, 2009). O estado de ionização de um composto, ou seja, o pKa, ilustra o valor onde há o equilíbrio entre a quantidade de moléculas ionizadas e não ionizadas (HUO; LI; ZHANG, 2013), influenciando em sua lipofilicidade e solubilidade (S. BHARATE; KUMAR; A. VISHWAKARMA, 2016). A variação de pKa depende da natureza dos compostos, do pKa do tampão e do conteúdo de solvente orgânico na mistura (SUBIRATS; ROSÉS; BOSCH, 2007).

Para compostos que apresentam pKa próximo do valor de pH da fase móvel, uma pequena mudança no pH pode produzir grandes mudanças no tempo de retenção, portanto, dois analitos semelhantes com pequenas diferenças em seus valores de pKa podem ser separados com sucesso por um controle adequado do pH da fase móvel (SUBIRATS; ROSÉS; BOSCH, 2007).

A lipofilicidade representa a afinidade de uma molécula por um ambiente lipofílico já que é definida como a tendência de um composto químico a distribuir-se entre um solvente orgânico apolar e não miscível, e a água (solvente polar) (DĄBROWSKA et al., 2017). Pode ser expressa como LogP, o logaritmo do coeficiente de partição de um composto neutro em um sistema n-octanol / água, ou LogD, o logaritmo do coeficiente de distribuição de um composto ionizado (XU et al., 2015). O parâmetro de polaridade é considerado um bom descritor da retenção,

permitindo a previsão aproximada da ordem de eluição e sobreposições de pico. Idealmente, dois compostos com polaridades semelhantes possuem o mesmo comportamento de retenção na mesma coluna e sistema de solventes (TORRES-LAPASÍÓ et al., 2002).

A temperatura é uma variável analítica útil em cromatografia líquida. É conhecido que, em geral, o aumento na temperatura leva a um aumento da solubilidade do composto, diminui a viscosidade do solvente, afetando fatores de retenção, seletividade e tempo total de análise, podendo afetar a forma do pico e a eficiência da coluna (ROSÉS; SUBIRATS; BOSCH, 2009; AGRAFIOTOU et al., 2011; KHALIKOVA et al., 2018). Além disso, trabalhar em temperaturas elevadas permite trabalhar em fluxos elevados, alterando o tempo total de análise e os fatores de retenção (CHISVERT; TARAZONA; SALVADOR, 2013).

Em termos gerais, mudanças de seletividade associadas à temperatura são maiores para compostos ionizáveis. Embora a temperatura geralmente não seja tão influente na seletividade quanto o modificador orgânico ou pH da fase móvel, (POUS-TORRES et al., 2007) a temperatura pode proporcionar uma melhora na resolução entre compostos em coeluição (SMAOUI et al., 2017). No caso de compostos ionizáveis, podem ser esperadas interações entre o conteúdo do solvente e o pH, e a temperatura e o pH (POUS-TORRES et al., 2007).

Considerando que os filtros UV possuem absorbância significativa na faixa do UV, o detector de espectrometria UV / visível utilizado com comprimento de onda único ou o detector de arranjo de diodos (DAD) são os mais adequados para análise em HPLC (CHISVERT; TARAZONA; SALVADOR, 2013). O uso de um detector DAD permite obter todo o espectro de UV para cada pico, e isso tem sido usado para fins de identificação (SMAOUI et al., 2017).

Apesar das vantagens das abordagens de DoE em conjunto com QSRR e MMC para o desenvolvimento e otimização de métodos, é possível encontrar na literatura poucos estudos sobre suas aplicações (TARAJI et al., 2017). E não há, em literatura recente, artigos que utilizem essas abordagens para desenvolver metodologia capaz de prever tempo de retenção e perfil cromatográfico de filtros solares.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver ferramenta *in silico* capaz de prever o perfil cromatográfico de diferentes misturas de filtros orgânicos, com base em suas características físico-químicas, possibilitando o desenvolvimento racional de métodos analíticos em produtos cosméticos. São objetivos específicos:

- Estabelecer um modelo matemático que explique as respostas cromatográficas (tempo de retenção, assimetria, pratos teóricos, resolução, dentre outros) em função das condições analíticas (pH, composição da fase móvel, fluxo, temperatura, dentre outras) e das características dos compostos analisados (descritores moleculares).
- Validar o modelo matemático empregando abordagem de validação interna (validação cruzada) e validação externa (usando conjunto de dados de validação independente).
- Desenvolver planilha de cálculo que possibilite a predição do perfil cromatográfico de misturas de filtros orgânicos, a partir do modelo matemático estabelecido, empregando o método de Monte Carlo.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Filtros Orgânicos e Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de amônio, acetato de sódio, acetato de etila, ácido fosfórico, ácido acético, álcool etílico absoluto, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, todos de qualidade analítica obtida pela Synth (Diadema, SP, BR) e álcool etílico absoluto (HPLC Scharlau, ES). Os filtros UV orgânicos utilizados foram: avobenzona (Seleron, BR), benzofenona-3 (Vivimed, IN), octocrileno (BASF, DE), metoxicinamato de octila (Chemistry, BR), octil dimetil PABA (CMT, BR), etilhexil triazona e tinosorb[®] S (BASF, DE). Todos os filtros UV foram doados pelo Laboratório de Cosmetologia do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Utilizou-se um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA).

3.2. Preparo de amostra

Para as análises, amostras de filtro UV foram preparadas diariamente em álcool etílico absoluto com uma concentração de aproximadamente 0,01 mg.mL⁻¹. Somente as soluções estoque de ET e EMT foram preparadas adicionando acetato de etila para facilitar sua solubilização em etanol (J. SCHAKEL; KALSBECK; BOER, 2004). Para facilitar a dissolução completa das amostras, elas foram colocadas em banho ultrassônico por 5 minutos. As amostras foram filtradas através de um filtro de

seringa Millex[®] (0,45 μ m, PTFE, Millipore, EUA), sendo os primeiros 2 mL descartados, para só então as amostras serem colocadas em *vials*.

3.3. Preparo de Fase Móvel

A fase móvel consistiu em etanol e tampão, onde a quantidade de solvente orgânico e o pH da fase aquosa foram variados de acordo com o planejamento de experimentos. A solução aquosa foi preparada com acetato de sódio para pH 5,0, acetato de amônio para pH 7,0 e ácido fosfórico para pH 2,4. A fase móvel foi filtrada em filtro de membrana de 0,45 μ m, constituída de mistura de ésteres de celulose.

3.4. Instrumentação

As análises foram realizadas em eluição isocrática utilizando o cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Tóquio, Japão), empregando o software EZChrom Elite (Hitachi, JP, versão 3.2.2 SPe), e o cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), empregando o software LCSolution (Lab Solutions, Shimadzu, JP, versão 1.25 SP5), ambos equipados com bomba quaternária, desgaseificador, amostrador automático, injetor automático, forno de coluna e detectores DAD L-2455 (Hitachi, JP) e SPD-M20A (Shimadzu, JP), respectivamente. A leitura do DAD foi feita na faixa de comprimento de onda entre 290 e 400 nm. A coluna cromatográfica empregada para análise foi a coluna Ultremex C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m, Phenomenex, EUA). O volume de injeção das amostras foi de 20 μ L, sendo que

foram variados, de acordo com o planejamento de experimento, o fluxo, a composição da fase móvel, pH da fase móvel e temperatura do forno de coluna.

Para quantificar os sete filtros UV, qualquer comprimento de onda entre 305 e 315 nm forneceu boa sensibilidade para todos os analitos, com exceção do BMDM e BZ3. Portanto, o tempo de retenção para BMDM foi obtido em 360 nm e BZ3 em 290 nm, comprimentos de onda correspondentes ao máximo de absorbância para cada filtro, respectivamente. O restante dos analitos foram determinados em 310 nm.

As amostras e reagentes foram pesadas utilizando uma balança analítica (AUY 220, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) e os ajustes de pH dos tampões da fase móvel foram realizados usando o pHmetro (PG1800, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil).

3.5. Planejamento de Experimentos

O planejamento de experimentos foi desenvolvido com o objetivo de selecionar os parâmetros críticos, estabelecer a faixa sobre a qual seriam variados (níveis) e avaliar como as condições analíticas (composição e pH da fase móvel, temperatura do forno de coluna, fluxo, dentre outros) afetam as características dos cromatogramas (tais como, tempo de retenção, resolução entre picos, área, assimetria, entre outros).

As análises foram realizadas seguindo o planejamento fatorial fracionado, em que variavam em diferentes níveis a proporção de etanol na fase móvel (de 65 a 95 %), fluxo da fase móvel (de 0,6 a 1,0 mL.min⁻¹), pH da fase móvel (de 2,4 a 7,0) e

a temperatura da coluna (de 25 a 45 °C). Além disso, as diferenças nos descritores dos compostos em função do pH (de 2,4 a 7,0) também foram consideradas no modelo de predição. A fim de estabelecer uma faixa abrangente para a aplicação do modelo de predição foram aplicados três níveis para cada fator cromatográfico.

Os fatores foram selecionados com base na criticidade observada durante os testes e na experiência obtida em estudos anteriores com o objetivo de adaptar o método em relação às condições cromatográficas. Todos os experimentos foram randomizados para minimizar o viés.

3.6. Descritores Moleculares

Nas estruturas 2D e 3D dos compostos, a ferramenta “Clean” do software MarvinSketch (versão 19.21.0) foi aplicada com o propósito de encontrar a conformação de menor energia. Então, as estruturas foram usadas como entrada para o cálculo de mais de 200 descritores moleculares na Calculadora de Descritores CDK (v1.4.8, CDK v2.0), obtendo descritores híbridos, constitucionais, topológicos, eletrônicos e geométricos. Os estados de protonação de cada analito foram analisados usando a Calculadora do MarvinSketch (versão 19.21.0). Se a porcentagem da microespécie principal for <90% em qualquer valor de pH considerado, a média aritmética ponderada será aplicada entre os valores dos descritores para as principais microespécies e os valores dos descritores da próxima forma mais prevalente. Por conseguinte, uma matriz de correlação (Correlação de Pearson) foi feita utilizando o software KNIME (versão 4.0.2).

O conjunto inicial de descritores foi reduzido por: (i) remoção de descritores com valores zero; (ii) remoção de descritores que tenham um coeficiente de correlação com a variável dependente menor que $|0,1|$; e (iii) removendo descritores altamente correlacionados ($R > |0,8|$), se vários descritores eram altamente intercorrelacionados, apenas aquele com a melhor correlação com a variável dependente era mantido (TUMPA et al., 2016). Após essa etapa de pré-processamento, 16 descritores permaneceram. Os descritores foram utilizados como variáveis independentes para construir o modelo matemático.

3.7. Modelagem

O software validado Minitab 19 (Minitab Inc., EUA, 19.2 - 64 bit), com as ferramentas de análise de regressão múltipla (ARM), foi usado para estabelecer um modelo matemático que relaciona o tempo de retenção dos analitos às condições analíticas e aos descritores moleculares. A equação de regressão com melhor ajuste (valor mais alto do coeficiente de determinação ajustado, R^2 adj) foi obtida por meio de regressão *stepwise*. O método de Monte Carlo foi implementado usando uma planilha do MS-Excel (Microsoft Inc., EUA, Microsoft Office 365, versão 1903), adotando um gerador aleatório normal e considerando uma amostra aleatória de 50.000 simulações para cada entrada. Os valores de entrada simulados foram aplicados ao modelo matemático, que permite calcular a resposta de saída (tempo de retenção dos analitos). O modelo de previsão desenvolvido foi validado usando validação interna (validação cruzada de exclusão única – *leave-one-out cross*

validation) e validação externa (usando um conjunto de dados de validação independentes).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvemos uma plataforma *in silico*, usando DoE em combinação com QSRR e MCM, para prever o perfil cromatográfico de misturas de filtros UV orgânicos, permitindo o desenvolvimento racional de métodos analíticos. Essa abordagem foi projetada para facilitar a previsão de coeluição dos analitos, onde o QSRR correlaciona os parâmetros de retenção cromatográfica e a estrutura química dos analitos, com o objetivo de encontrar relações significativas entre eles (J. SCHAKEL; KALSBEEK; BOER, 2004); e Monte Carlo, que, com base em amostragens aleatórias, simula dados de um determinado modelo matemático, incluindo a variabilidade dos resultados analíticos (TUMPA et al., 2016).

4.1. O Modelo

Após a aquisição dos resultados dos ensaios experimentais, é necessário ajustar uma equação matemática, geralmente usando termos lineares, quadráticos e de interação, para descrever o comportamento da resposta em relação aos valores das variáveis (fatores de entrada) e seus respectivos níveis estudados (FICARRA et al., 2002; HIBBERT, 2012). Portanto, usamos a análise de regressão múltipla (ARM) para a aplicação sistemática de estatística à experimentação.

Os tempos de retenção foram explicados em função das condições analíticas e dos descritores moleculares. Os resultados de ANOVA obtidos por ARM são fornecidos na Tabela 3. A equação de regressão e os respectivos coeficientes de determinação encontram-se na Tabela 4.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para o tempo de retenção (Y1) de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

| Fonte | GL | SQ | QM | F | p-valor |
|-------------------------------|-----|---------|---------|---------|---------|
| Regressão | 22 | 62,6207 | 2,84639 | 3936,48 | 0,000 |
| % EtOH | 1 | 0,7116 | 0,71163 | 984,17 | 0,000 |
| pH | 1 | 0,0134 | 0,01343 | 18,57 | 0,000 |
| FI | 1 | 0,0013 | 0,00128 | 1,77 | 0,185 |
| Temp | 1 | 0,2054 | 0,20541 | 284,07 | 0,000 |
| Wlambda3.unity | 1 | 0,0757 | 0,07574 | 104,75 | 0,000 |
| ATSc5 | 1 | 0,0000 | 0,00000 | 0,00 | 0,972 |
| geomShape | 1 | 0,0804 | 0,08039 | 111,18 | 0,000 |
| % EtOH*% EtOH | 1 | 1,6773 | 1,67727 | 2319,62 | 0,000 |
| Temp*Temp | 1 | 0,0594 | 0,05938 | 82,12 | 0,000 |
| Wlambda3.unity*Wlambda3.unity | 1 | 0,0091 | 0,00913 | 12,63 | 0,001 |
| geomShape*geomShape | 1 | 0,0361 | 0,03611 | 49,93 | 0,000 |
| % EtOH*FI | 1 | 0,0123 | 0,01228 | 16,98 | 0,000 |
| % EtOH*Temp | 1 | 0,1176 | 0,11761 | 162,65 | 0,000 |
| % EtOH*Wlambda3.unity | 1 | 0,4909 | 0,49094 | 678,95 | 0,000 |
| % EtOH*ATSc5 | 1 | 0,0088 | 0,00883 | 12,21 | 0,001 |
| % EtOH*geomShape | 1 | 0,3567 | 0,35668 | 493,28 | 0,000 |
| pH*ATSc5 | 1 | 0,0304 | 0,03042 | 42,07 | 0,000 |
| FI*Wlambda3.unity | 1 | 0,0158 | 0,01576 | 21,79 | 0,000 |
| Temp*Wlambda3.unity | 1 | 0,0401 | 0,04009 | 55,44 | 0,000 |
| Temp*geomShape | 1 | 0,0574 | 0,05739 | 79,37 | 0,000 |
| Wlambda3.unity*ATSc5 | 1 | 0,2066 | 0,20664 | 285,77 | 0,000 |
| ATSc5*geomShape | 1 | 0,0162 | 0,01619 | 22,40 | 0,000 |
| Erro | 154 | 0,1114 | 0,00072 | | |
| Total | 176 | 62,7320 | | | |

GL = graus de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, F = valor de Fisher, p-valor = significância do teste F.

Tabela 4 - Equação de regressão e coeficientes de determinação para o tempo de retenção (Y1) de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

| Equação de Regressão | R ² | R ² adj | R ² pred |
|--|----------------|--------------------|---------------------|
| $\begin{aligned} \text{Ln}(Y1) = & 18,959 - 0,28135 \% \text{ EtOH} + 0,01272 \text{ pH} + 0,341 \text{ FI} - \\ & 0,1845 \text{ Temp} + 0,6592 \text{ Wlambda3.unity} - 0,06 \text{ ATSc5} - \\ & 8,809 \text{ geomShape} + 0,001385 \% \text{ EtOH} * \% \text{ EtOH} \\ & + 0,001503 \text{ Temp} * \text{Temp} - 0,00782 \\ & \text{Wlambda3.unity} * \text{Wlambda3.unity} + 4,177 \\ & \text{geomShape} * \text{geomShape} - 0,01057 \% \text{ EtOH} * \text{FI} + 0,000980 \\ & \% \text{ EtOH} * \text{Temp} - 0,005593 \% \text{ EtOH} * \text{Wlambda3.unity} - \\ & 0,01183 \% \text{ EtOH} * \text{ATSc5} + 0,04084 \% \text{ EtOH} * \text{geomShape} - \\ & 0,1609 \text{ pH} * \text{ATSc5} - 0,0547 \text{ FI} * \text{Wlambda3.unity} - 0,002500 \\ & \text{Temp} * \text{Wlambda3.unity} + 0,02148 \text{ Temp} * \text{geomShape} \\ & + 1,2104 \text{ Wlambda3.unity} * \text{ATSc5} - 12,63 \\ & \text{ATSc5} * \text{geomShape} \end{aligned}$ | 99,82% | 99,80% | 99,71% |

R² = coeficiente de determinação, R² adj = coeficiente de determinação ajustado, R² pred = coeficiente de determinação de predição.

Os coeficientes de regressão foram determinados a partir de 176 corridas cromatográficas usando BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em diferentes condições analíticas (conforme definido na seção de Planejamento de Experimentos), estabelecendo uma faixa abrangente para a aplicação do modelo de previsão. No ARM, 16 descritores foram testados inicialmente, porém apenas três deles (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape) foram incluídos no modelo de regressão, de acordo com os resultados obtidos pela regressão *stepwise*.

A partir dos resultados da ARM, o gráfico de efeitos principais (Figura 2) e o gráfico de Pareto (Figura 3) foram construídos para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

O gráfico de efeitos principais indica como uma variável independente está relacionada à resposta, exibindo graficamente o valor médio da resposta em cada

nível de um determinado fator de entrada (FUKUDA et al., 2018). Ele exhibe a magnitude (força do efeito) e a direção (sinal do efeito) da mudança na resposta à medida que você altera os níveis dos fatores, permitindo comparar os efeitos dos fatores (ANTONY, 2014).

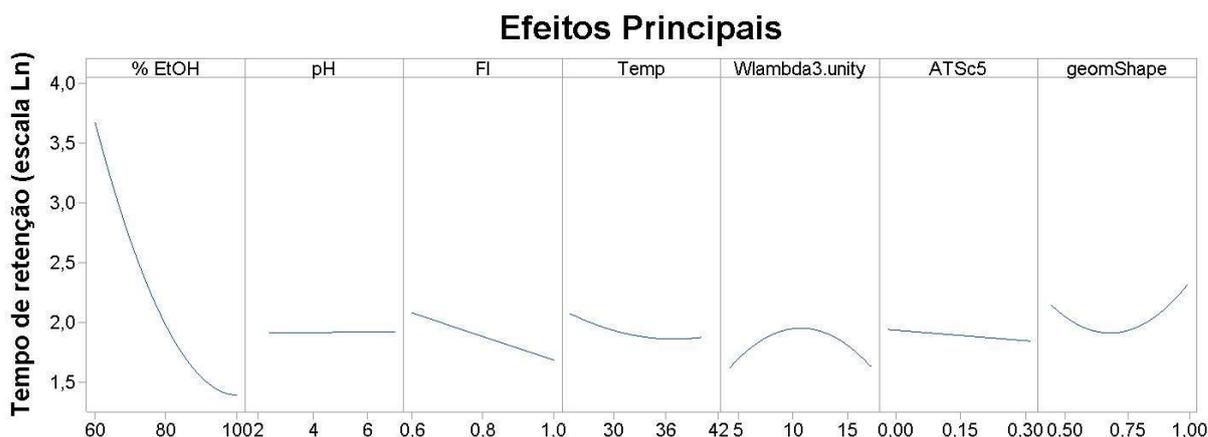


Figura 2 - Gráfico de efeitos principais para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

Diferentemente do gráfico de efeitos principais, o gráfico de Pareto não pode determinar quais efeitos aumentam ou diminuem a resposta, ele mostra os valores dos efeitos em um gráfico de barras de frequência, exibindo a frequência relativa dos diferentes fatores, do maior para o menor efeito (GROSFELD-NIR; RONEN; KOZLOVSKY, 2007; FUKUDA et al., 2018). O gráfico de Pareto permite detectar os fatores e efeitos de interação que são mais importantes (ANTONY, 2014), representando uma linha de referência para indicar quais efeitos são significativos. A linha de referência para significância estatística depende do nível de significância (FUKUDA et al., 2018).

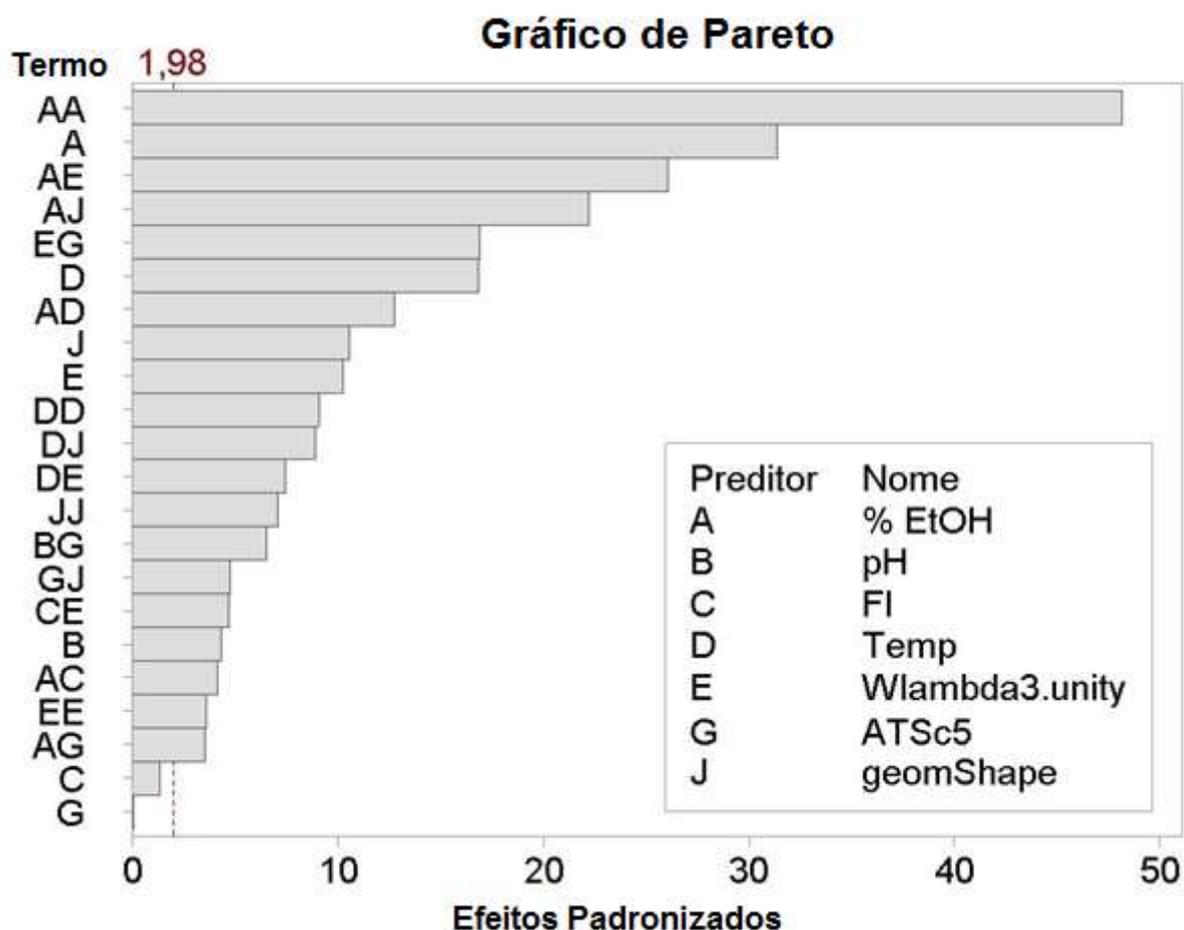


Figura 3 - Gráfico de Pareto para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

O gráfico de Pareto indica claramente que os efeitos principais (% EtOH, pH, Temp, Wlambda3.unity, geomShape) e suas interações e termos quadráticos são significativos ao nível de significância de 5%. Analisando o comportamento de retenção dos filtros UV investigados, a proporção de etanol da fase móvel (% EtOH) foi o fator que apresentou resposta de maior magnitude. Isso significa que a resposta média é significativamente afetada pelos níveis deste fator de entrada (FUKUDA et al., 2018).

Como regra geral, em RP-HPLC, a retenção de analitos apolares aumenta com o aumento da concentração de solvente orgânico na fase móvel (JANDERA,

2011). Verificamos (Figura 2) que o aumento do etanol levou a uma redução no tempo de retenção dos filtros UV. A variação na composição da fase móvel promove sua mudança de polaridade, afetando não apenas o tempo de retenção, mas também a ionização do analito (AGRAFIOTOU et al., 2011; ZHANG; HU, 2017). Por isso, o teor de solvente orgânico e o pH são os principais fatores que afetam as separações cromatográficas, devido ao seu forte efeito na retenção e seletividade de analitos (POUS-TORRES et al., 2007).

Os descritores ATSc5, Wlambda3.unity e geomShape estão diretamente relacionados ao estado de ionização das moléculas e, conseqüentemente, ao pH da fase móvel. O ATSc5 está inversamente relacionado ao aumento do tempo de retenção (Figura 2). Ele é um descritor de autocorrelação 2D de Moreau-Broto (TAKAKU et al., 2015), ponderado por cargas parciais, indicando associação de cargas parciais espaciais (PEREIRA; LATINO; AIRES-DE-SOUSA, 2011). O descritor estrutural 3D Wlambda3.unity (GRAMATICA, 2006), é um descritor molecular holístico invariável ponderado (em inglês *weighted holistic invariant molecular* - WHIM) introduzido por R. Todeschini, relacionado ao tamanho molecular ao longo de um eixo principal (POR; AKOWUAH; GAURAV, 2018). E por fim, o descritor geomShape, um índice de forma geométrica 3D descrito por Bath et al. que mede a anisotropia em uma molécula (PETITJEAN, 1992; BATH et al., 1995).

Em relação à interferência do fluxo da fase móvel no tempo de retenção, o aumento da vazão é capaz de diminuir o espaçamento entre os picos, reduzindo o tempo de análise. Além disso, a redução na vazão é capaz de causar maior retenção de compostos, sendo possível melhorar a separação entre eles (GLAJCH et al., 1986). Na Figura 1, observamos que nosso resultado estava de acordo com

Glajch et al. (1986), uma vez que o aumento da vazão foi capaz de reduzir o tempo total de análise.

Também obtivemos um resultado compatível com o observado por autores (ROSÉS; SUBIRATS; BOSCH, 2009; AGRAFIOTOU et al., 2011) sobre a influência da temperatura no tempo de retenção. O aumento da temperatura é capaz de ocasionar o aumento da solubilidade do composto, a diminuição da viscosidade do solvente, afetando a retenção e a seletividade, reduzindo assim, o tempo total de análise.

O gráfico de interações (Figura 4) indicou que todos os fatores obtiveram ao menos uma interação. A proporção de etanol na fase móvel foi o fator que mais apresentou interação com os demais fatores, porém as principais interações foram entre $W_{\lambda 3}$ e a proporção de etanol na fase móvel; e entre os descritores $W_{\lambda 3}$ e $ATSc_5$. Para os termos que não apresentam interação, seus gráficos encontram-se em branco. Nos gráficos de efeitos principais e de interações, a curvatura indica termos quadráticos.

O modelo de predição desenvolvido foi validado para confirmar sua confiabilidade para a finalidade pretendida, usando as seguintes abordagens: validação interna (validação cruzada de exclusão única – *leave-one-out cross validation*) e validação externa (usando um conjunto de dados de validação independentes).

Gráfico de Interações

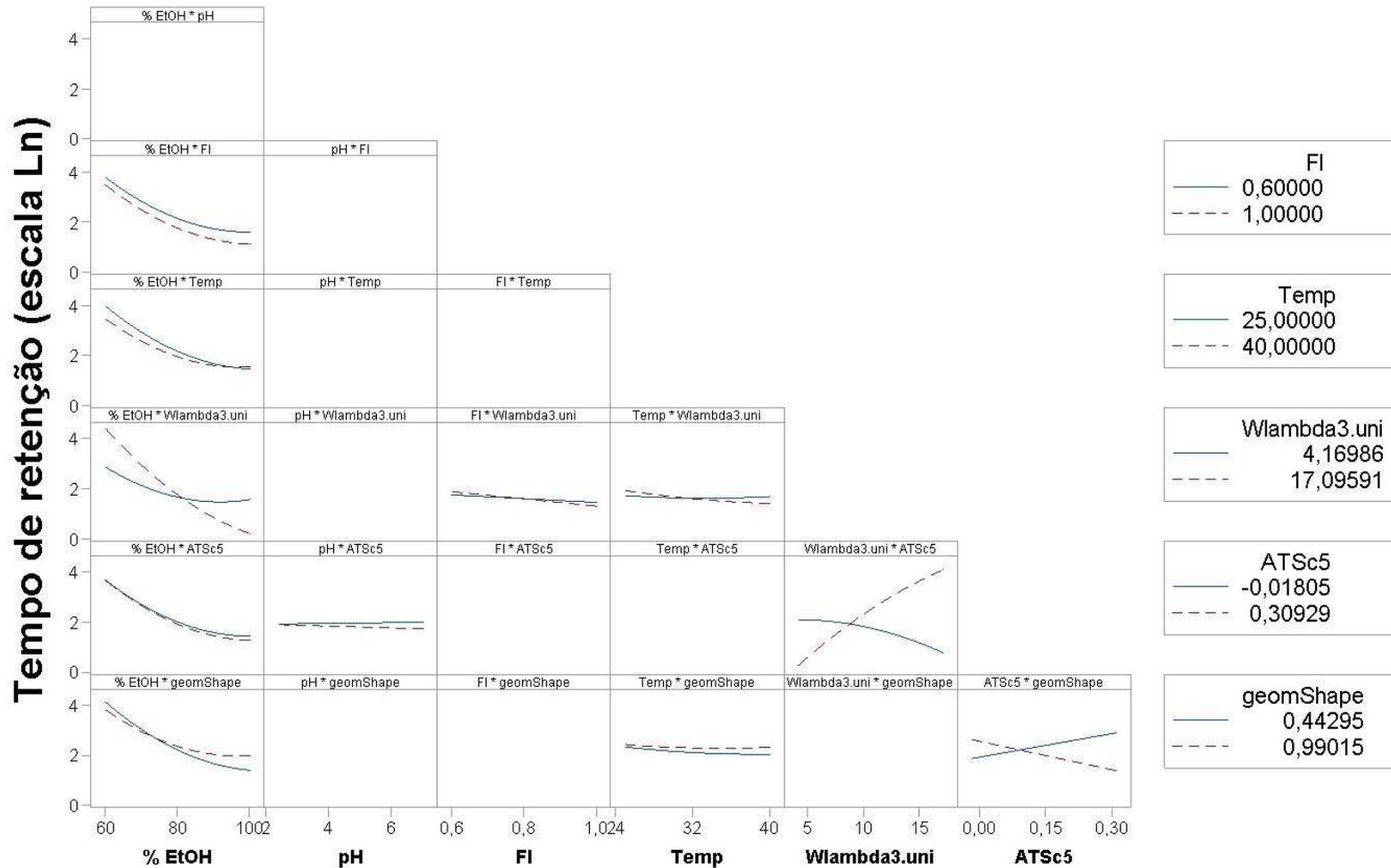


Figura 4 - Gráfico de interações para o tempo de retenção de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT em função dos descritores moleculares (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), proporção de etanol na fase móvel (% EtOH), pH da fase móvel (pH), fluxo da fase móvel (FI) e temperatura da coluna (Temp).

Um procedimento de validação cruzada de exclusão única, calculado usando o Minitab 19, foi aplicado para definir o coeficiente de determinação de predição do modelo (POR; AKOWUAH; GAURAV, 2018). Na validação interna, usamos 176 corridas cromatográficas como um conjunto de treinamento/teste, em que cada corrida é removida uma a uma do conjunto de dados e um modelo é construído com as corridas restantes. Este procedimento é repetido até que todas as corridas sejam usadas como teste (PERES et al., 2017). A validação cruzada permite definir um modelo com complexidade apropriada, evitando, dessa maneira, um modelo muito simples (*underfitting*) ou um modelo super ajustado aos dados de calibração (*overfitting*) (VARMUZA; FILZMOSE; DEHMER, 2013).

A validação externa foi realizada com base em corridas experimentais não contempladas pelo modelo, onde, com base em simulações do cenário real, a capacidade do modelo de prever novos fatores de retenção foi verificada usando 87 corridas cromatográficas (ROY et al., 2016; POR; AKOWUAH; GAURAV, 2018).

A normalidade, a homoscedasticidade e a independência dos resíduos foram confirmadas. Além disso, o coeficiente de determinação para o ajuste do modelo de regressão ($R^2 = 99,21\%$) e para a validação externa ($R^2 = 99,79\%$) endossou que a equação de regressão foi considerada adequada para prever o perfil cromatográfico de misturas de filtros UV orgânicos, com base nas propriedades e descritores moleculares. O gráfico de dispersão para o tempo de retenção previsto versus o tempo de retenção experimental, para ajuste do modelo de regressão e validação externa, é mostrado na Figura 5.

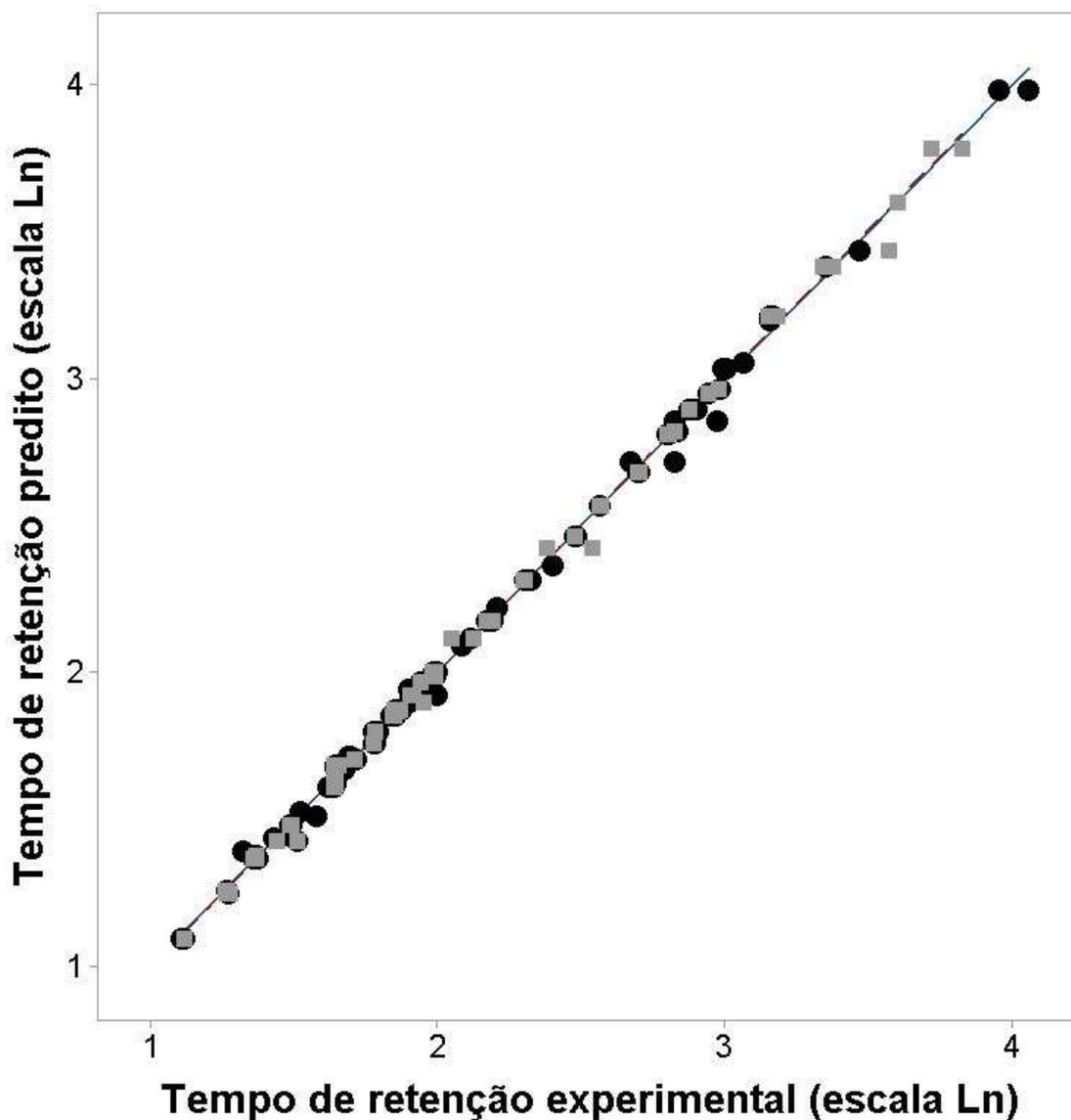


Figura 5 – Gráfico de dispersão para o tempo de retenção previsto versus o tempo de retenção experimental, para ajuste do modelo de regressão (•) e validação externa (■).

4.2. Simulando Cromatograma com o *ChromSimulator*

O método de Monte Carlo foi utilizado para simular as respostas cromatográficas (tempo de retenção, pratos teóricos, fator de simetria e resolução entre picos) para uma mistura de BMDM, BZ3, ET, OMC, OC, ODPABA e EMT,

usando o modelo matemático que explica o tempo de retenção em função das condições analíticas e características dos filtros UV. Para isso, foram simulados 50.000 valores aleatórios com distribuição normal, adotando as condições analíticas e os descritores moleculares apresentados como material suplementar (arquivo ChromSimulator.xlsm).

Para a predição do tempo de retenção, é necessário fomentar a planilha com os filtros UV desejados (células B16: B22), seus descritores (células D16: I22) e condições analíticas (D9: D12). Além disso, a variabilidade adotada nas simulações de MCM pode ser informada nas células I12 (para descritores moleculares / químicos) e E9: E11 (para condições analíticas). O tempo de corrida do cromatograma pode ser definido na célula I11. As respostas cromatográficas (tempo de retenção, pratos teóricos e fator de simetria) são fornecidas nas células D42: I48. A matriz de resoluções entre os picos também é fornecida nas células C54: I60. O arquivo *ChromSimulator* apresenta três botões de macro: "*Increase cells* (Ctrl + i)" aumenta o número de simulações de 10 para 50.000; "*Delete cells* (Ctrl + d)" diminui o número de simulações de 50.000 para 10; e "*Run simulation* (Ctrl + r)" executa simulações de MCM com as condições fornecidas. O status dessa operação é informado nas células G9: I9. Os valores dos descritores moleculares para cada filtro orgânico nos diversos valores de pH são dados na aba chamada "Descriptors". A Figura 6 ilustra o uso do *ChromSimulador* para simular o perfil cromatográfico de uma mistura de 5 filtros.

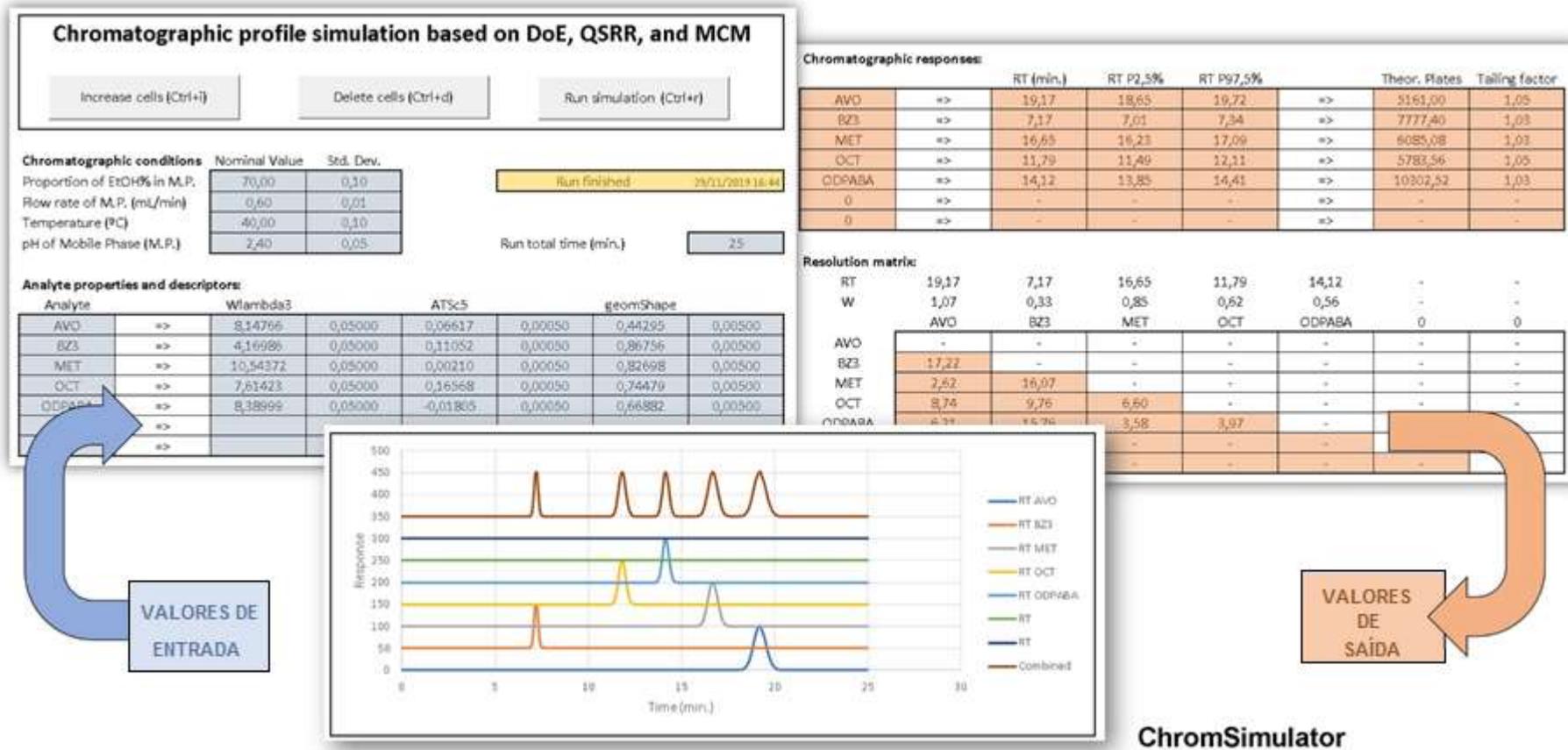


Figura 6 – Ilustração do uso do *ChromSimulator* para simular o perfil cromatográfico de uma mistura de 5 filtros.

Para ilustrar o resultado de uma corrida cromatográfica simulada, um resumo dos resultados é apresentado na Tabela 5 e o cromatograma simulado é mostrado na Figura 7. Como o cromatograma simulado não contempla a concentração do analito, o cromatograma simulado indica apenas o tempo de retenção e, conseqüentemente, os picos têm a mesma altura.

Tabela 5 – Valores de retenção, assimetria, pratos teóricos e resolução entre picos determinado a partir do cromatograma obtido por 50.000 simulações de Monte Carlo, utilizando a equação de regressão para o tempo de retenção.

| Filtro | Tempo de retenção experimental | Tempo de retenção simulado* | Fator de simetria* | Pratos teóricos* | Resolução entre picos* |
|--------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|------------------|------------------------|
| BZ3 | 6,972 | 7,13 | 1,03 | 7777 | - |
| OCT | 11,953 | 11,79 | 1,05 | 5784 | 9,76 ^a |
| ODPABA | 14,892 | 14,12 | 1,03 | 10303 | 3,97 ^b |
| MET | 16,501 | 16,65 | 1,03 | 6085 | 3,58 ^c |
| AVO | 18,995 | 19,17 | 1,05 | 5161 | 2,62 ^d |

*Valores estimados para 50.000 simulações. ^aresolução entre BZ3 e OCT, ^bresolução entre OCT e ODPABA, ^cresolução entre ODPABA e MET, e ^dresolução entre MET e AVO.

Obtivemos tempos de retenção simulados semelhantes aos valores do tempo de retenção experimental (Tabela 5), obtendo-se um perfil análogo entre o perfil cromatográfico previsto e o experimental (Figura 7). Considerando a coluna utilizada neste estudo, os valores simulados de pratos teóricos atingiram valores adequados em relação à eficiência da coluna, que se refere ao desempenho da fase estacionária e significa quão bem a coluna está compactada. Existem vários métodos para medir a eficiência da coluna que podem ou não levar em consideração anomalias cromatográficas, como cauda ou “ombro”. No presente estudo, o número de pratos teóricos (N) foi calculado usando a seguinte equação: $N = 16 (t_R / W)^2$,

onde t_R significa o tempo de retenção e W refere-se à largura da base dos picos dos componentes (Zakeri-Milani et al, 2005).

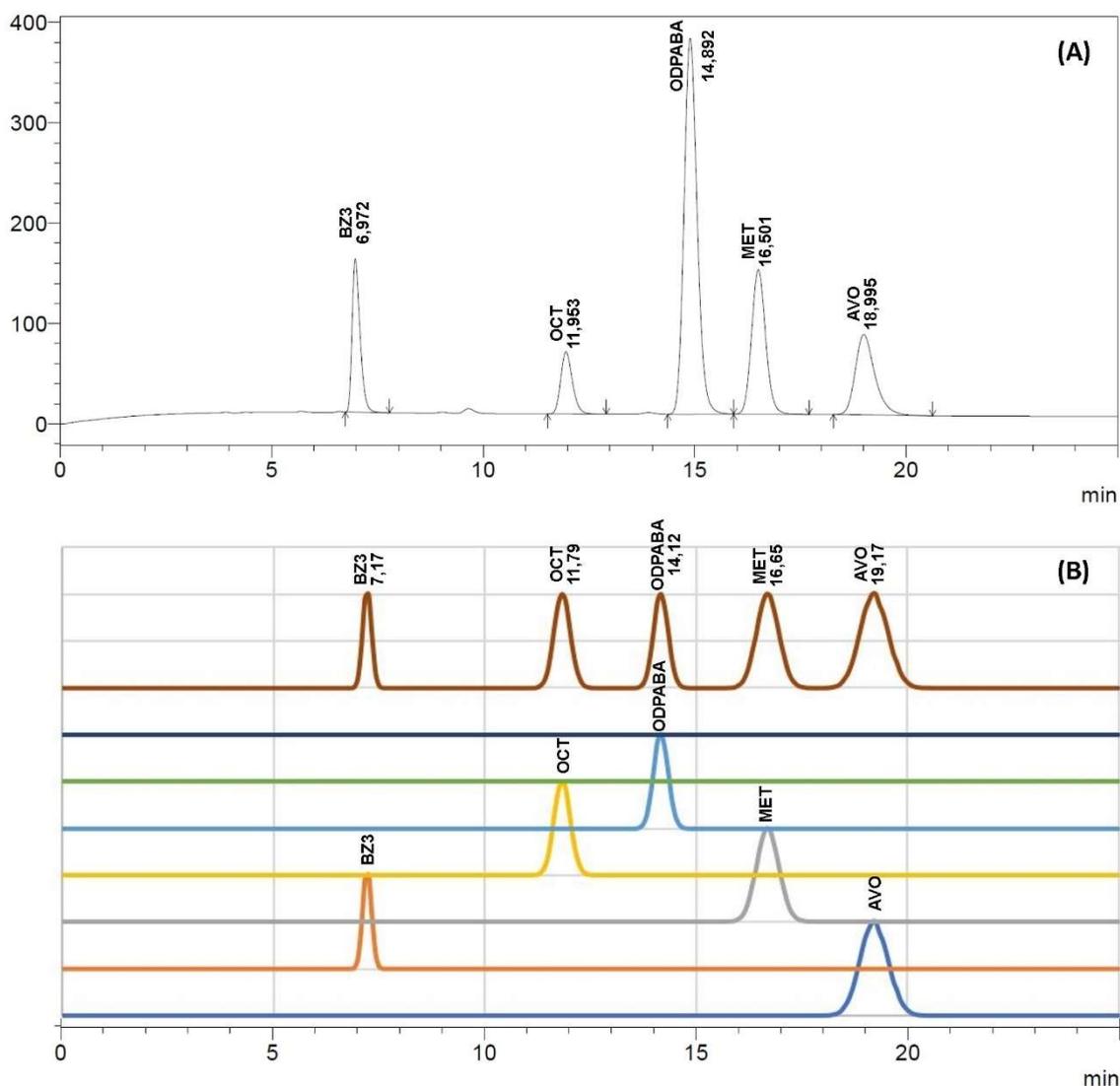


Figura 7 – Comparação entre o cromatograma experimental (A) e simulado (B) para BZ3, OCT, ODPABA, MET, e AVO, obtido utilizando proporção de etanol na fase móvel (%EtOH = $70,0 \pm 0,1$ %), pH da fase móvel (pH = $2,4 \pm 0,05$), fluxo da fase móvel (FI = $0,60 \pm 0,05$ mL min⁻¹) e temperatura da coluna (Temp = $40,0 \pm 0,1$ °C).

Os valores de assimetria obtidos (Tabela 5) indicam presença de “cauda”. Assimetria de pico é um desvio significativo no formato, considerando um pico simétrico. Seu cálculo é feito por B/A , onde A significa a área inicial do pico até sua

intersecção e B a área a partir da intersecção até o limite final do pico. Valores menores que 1 significam que o pico possui maior assimetria na área A, apresentando “ombro”, e valores superiores a 1 significam maior assimetria de área em B, apresentando “cauda” (PÁPAI; L. PAP, 2002).

A resolução entre os picos foi superior a 1,5, indicando separação completa entre dois filtros (ZAKERI-MILANI et al., 2005). A resolução é uma medida do grau de separação entre os picos adjacentes. Para dois compostos, A e B, numa corrida cromatográfica, a resolução (R) é expressa como $R = 2 (t_A - t_B) / (W_A + W_B)$ em que t_A e t_B são os tempos de retenção e W_A e W_B refere-se à largura da base dos picos dos componentes. Um valor de 1,5 para resolução implica uma separação completa de dois compostos (Zakeri-Milani et al., 2005).

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Estabelecemos uma plataforma *in silico* capaz de prever tempos de retenção de filtros UV orgânicos em função das condições analíticas (proporção de etanol na fase móvel, pH da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna) e dos descritores moleculares dos analitos (Wlambda3.unity, ATSc5 e geomShape), usando DoE em combinação com QSRR e método de Monte Carlo.

As previsões relatadas aqui mostraram assertividade suficiente para determinar a probabilidade de coeluição dos analitos e obter diferentes parâmetros cromatográficos. Foi demonstrado que o estudo de fatores críticos de entrada e de descritores moleculares de filtros UV é satisfatório para obter precisão de previsão suficiente. O modelo matemático obtido foi validado empregando abordagem de validação interna (validação cruzada) e validação externa (usando conjunto de dados de validação independente), apresentando coeficientes de determinação de 99,21% e 99,79%, respectivamente. O modelo apresentou alto desempenho na validação interna e externa, indicando sua robustez e capacidade preditiva. A planilha *ChromSimulator.xlsm* foi desenvolvida, permitindo a simulação do perfil cromatográfico de diferentes misturas de filtros UV, em função dos descritores moleculares e das condições analíticas previstas no modelo matemático.

Demonstramos, desta forma, que é possível gerar modelos simples, robustos e preditivos que permitem visualizar o comportamento de retenção de vários compostos, sob diversas condições cromatográficas, sem experimentação, contribuindo para o desenvolvimento analítico racional, particularmente no que diz respeito à abordagem analítica de qualidade por *design* analítico.

REFERÊNCIAS

AGRAFIOTOU, P. et al. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4995–5009, 29 jul. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311000264>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ANTONY, J. Design of Experiments for A Systematic Methodology for Design of Experiments 4 4.1 Introduction. In: ANTONY, J. (Ed.). **Design of Experiments for Engineers and Scientists**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 33–50.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 69 de 23 de março de 2016. Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2863150/RDC_69_2016_COMP.pdf/5689ac91-e621-45b7-a122-b3163e4b3cc3>. Acesso em: 10 out. 2017.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732–742, ago. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000400016&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 23 jul. 2018.

BATH, P. A. et al. The Extent of the Relationship between the Graph-Theoretical and the Geometrical Shape Coefficients of Chemical Compounds. **J. Chem. Inf. Comput. Sci**, v. 35, n. 4, p. 714–716, 1995. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ci00026a007>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

BEG, S. et al. Applications of Monte-Carlo simulation and chemometric techniques for development of bioanalytical liquid chromatography method for estimation of rosuvastatin calcium. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, n. 18, p. 907–920, 8 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10826076.2017.1382377>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 15 jun. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014000459>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTÍ, M.-C.; SALVADOR, A. Determination of UV-filters in sunscreens by HPLC. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, n. 7–8, p. 638–641, 24 abr. 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002160100701>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

CHISVERT, A.; PASCUAL-MARTÍ, M. .; SALVADOR, A. Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high-performance liquid chromatography: Use of cyclodextrins as mobile phase modifier. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 207–215, 6 jul. 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301008664>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 2, p. 277–280, 22 nov. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302014115#!>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A. UV Filters in Sunscreens and other Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods. In: SALVADOR, A.; CHISVERT, A. (Ed.). **Analysis of Cosmetic Products**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 83–120.

CHISVERT, A.; TARAZONA, I.; SALVADOR, A. A reliable and environmentally-friendly liquid-chromatographic method for multi-class determination of fat-soluble UV filters in cosmetic products. **Analytica Chimica Acta**, v. 790, p. 61–67, 6 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267013008556#bibl0005>>. Acesso em: 2 ago. 2019.

COZZI, A. C.; PERUGINI, P.; GOURION-ARSQUAUD, S. Comparative behavior between sunscreens based on free or encapsulated UV filters in term of skin penetration, retention and photo-stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, n. May, p. 309–318, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.001>>.

D. NEUE, U.; MÉNDEZ, A. Selectivity in reversed-phase separations: General influence of solvent type and mobile phase pH. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 7, p. 949–963, maio 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600451>>.

DĄBROWSKA, M. et al. Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 115–124, 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098717300581>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

DESTANDAU, E.; LESELLIER, E. Chromatographic properties of ethanol/water mobile phases on silica based monolithic C18. **Chromatographia**, v. 68, n. 11–12, p. 985–990, dez. 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1365/s10337-008-0819-8>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

DHAT, S. et al. Risk management and statistical multivariate analysis approach for

design and optimization of satranidazole nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 273–283, 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098716304183>>. Acesso em: 8 jan. 2019.

DÍAZ-CRUZ, M. S. et al. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 873–887, 1 nov. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993608001878#!>>. Acesso em: 7 ago. 2019.

FICARRA, R. et al. An experimental design methodology applied to the enantioseparation of a non-steroidal anti-inflammatory drug candidate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 989–997, 1 ago. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502001395>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

FRANCISCO, F. L. et al. Development, optimization and validation of a rapid colorimetric microplate bioassay for neomycin sulfate in pharmaceutical drug products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 104–111, 2014.

FUKUDA, I. M. et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. spe, 8 nov. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000700405&lng=en&tling=en>. Acesso em: 22 jan. 2019.

GIL, E. S. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou Alta Performance (CLAE ou HPLC). In: **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. second ed. Brasil: Pharmabooks, 2007. p. 396–398.

GLAJCH, J. L. et al. Separation of peptide mixtures by reversed-phase gradient elution. Use of flow rate changes for controlling band spacing and improving resolution. **Analytical Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 280–285, fev. 1986. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00293a004>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

GRAMATICA, P. WHIM descriptors of shape. **QSAR and Combinatorial Science**, v. 25, n. 4, p. 327–332, abr. 2006.

GRAMATICA, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 26, p. 694–701, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/qsar.200610151>>.

GROSFELD-NIR, A.; RONEN, B.; KOZLOVSKY, N. The Pareto managerial principle: When does it apply? **International Journal of Production Research**, v. 45, n. 10, p. 2317–2325, maio 2007. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00207540600818203>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2–13, 1 dez. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023212000505>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

HUO, H.; LI, T.; ZHANG, L. pKa determination of oxysophocarpine by reversed - Phase high performance liquid chromatography. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/2193-1801-2-270>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

ICH EXPERT WORKING GROUP. PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2). In: **Anais...2009**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>>. Acesso em: 6 nov. 2019.

IZAT, N.; YERLIKAYA, F.; CAPAN, Y. A glance on the history of pharmaceutical quality by design. **OA Drug Design & Delivery**, v. 18, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://www.oapublishinglondon.com/article/1190>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

J. SCHAKEL, D.; KALSBECK, D.; BOER, K. Determination of sixteen UV filters in suncare formulations by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1–2, p. 127–130, set. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304012683>>.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1–2, p. 1–25, 29 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267011002728>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

KHALIKOVA, M. A. et al. Development and validation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography method for quantitative determination of nine sunscreens in cosmetic samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1034, p. 184–194, 30 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701830775X#cebib0010>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 6, p. 937–958, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962204022674#!>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

MALJURIĆ, N. et al. Quantitative structure –retention relationship modeling of selected antipsychotics and their impurities in green liquid chromatography using

cyclodextrin mobile phases. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2533–2550, 13 abr. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-018-0911-3>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

MILDAU, G. General Review of Official Methods of Analysis of Cosmetics. In: AMPARO SALVADOR AND ALBERTO CHISVERT (Ed.). **Analysis of Cosmetic Products**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 67–83.

MOHAMED, H. M. **Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* Elsevier B.V., 1 mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615000047?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

MORETA, C.; TENA, M. T. Determination of UV filters in packaging by focused ultrasonic solid–liquid extraction and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 21, p. 3392–3399, 27 maio 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310016754#fig0010>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

NAGASHIMA, H. et al. Application of a Quality by Design Approach to the Cell Culture Process of Monoclonal Antibody Production, Resulting in the Establishment of a Design Space. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 12, p. 4274–4283, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24122699>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

NYEBORG, M. et al. Validation of HPLC method for the simultaneous and quantitative determination of 12 UV-filters in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, n. 1, p. 47–53, fev. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2009.00544.x>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

PÁPAI, Z.; L. PAP, T. Analysis of peak asymmetry in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 953, n. 1–2, p. 31–38, 12 abr. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302001218>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

PARK, S. H. et al. Towards a chromatographic similarity index to establish localised Quantitative Structure-Retention Relationships for retention prediction. III Combination of Tanimoto similarity index, logP, and retention factor ratio to identify optimal analyte training sets for ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 107–116, 20 out. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317313365>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

PATEL, K. G. et al. Validated high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) method for simultaneous determination of nadifloxacin, mometasone furoate, and miconazole nitrate cream using fractional factorial design. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 3, p. 610–619, 1 jul. 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300333>>. Acesso em: 7 dez. 2018.

PEREIRA, F.; LATINO, D. A. R. S.; AIRES-DE-SOUSA, J. Estimation of mayr electrophilicity with a quantitative structure-property relationship approach using empirical and DFT descriptors. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 22, p. 9312–9319, 18 nov. 2011.

PERES, D. D. et al. Quality by design (QbD), Process Analytical Technology (PAT), and design of experiment applied to the development of multifunctional sunscreens. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 2, p. 246–256, 13 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2016.1236809>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

PETITJEAN, M. Applications of the Radius-Diameter Diagram to the Classification of Topological and Geometrical Shapes of Chemical Compounds. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 32, n. 4, p. 331–337, 1 fev. 1992. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci00008a012>>. Acesso em: 5 nov. 2019.

POLITIS, S. N. et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 6, p. 889–901, 3 jun. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2017.1291672>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

POR, C. S.; AKOWUAH, G. A.; GAURAV, A. Quantitative structure-activity relationship modeling of S-triazines and 2-arylpyrimidines as selective PDE4B inhibitors. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 69–83, 2018. Disponível em: <<http://www.tjps.pharm.chula.ac.th>>. Acesso em: 30 out. 2019.

POUS-TORRES, S. et al. Combined effect of solvent content, temperature and pH on the chromatographic behaviour of ionisable compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, n. 1–2, p. 49–62, 7 set. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730701014X?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 set. 2019.

ROMERO, D. C.; LOURENÇO, F. R. Measurement uncertainty of dissolution test of acetaminophen immediate release tablets using Monte Carlo simulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, p. e00163, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502017000300613&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 8 nov. 2019.

ROSÉS, M.; SUBIRATS, X.; BOSCH, E. Retention models for ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 10, p. 1756–1775, mar. 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308022206>>.

ROY, K. et al. Be aware of error measures. Further studies on validation of predictive QSAR models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 152, p. 18–33, 15 mar. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169743916000095>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ROZET, E. et al. Design Spaces for analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 157–167, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993612002786#b0100>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

S. BHARATE, S.; KUMAR, V.; A. VISHWAKARMA, R. Determining Partition Coefficient (Log P), Distribution Coefficient (Log D) and Ionization Constant (pKa) in Early Drug Discovery. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 19, n. 6, p. 461–469, 2016. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1386-2073&volume=19&issue=6&spage=461>>.

SAHU, P. K. et al. **RP-HPLC Method for Determination of Metaxalone Using Box-Behnken Experimental Design** *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/cde9/329f0eef4375c289b98ec36b645b9692ba0c.pdf>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. An environmentally friendly (“green”) reversed-phase liquid chromatography method for UV filters determination in cosmetics. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1–2, p. 15–24, 29 abr. 2005a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326700401685X>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, n. 1–2, p. 1–14, 29 abr. 2005b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005001169#bib39>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

SAMBANDAN, D. R.; RATNER, D. Sunscreens: An overview and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 748–758, 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962210000228>>. Acesso em: 6 ago. 2019.

SCIBILIA, B. **Monte Carlo Simulation with Minitab® Statistical Software**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.minitab.com>. Acesso em: 21 jan. 2019.

SEPAROVIC, L.; SAVIANO, A. M.; LOURENÇO, F. R. Using measurement uncertainty to assess the fitness for purpose of an HPLC analytical method in the pharmaceutical industry. **Measurement: Journal of the International Measurement**

Confederation, v. 119, p. 41–45, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224118300617>>. Acesso em: 2 dez. 2019.

SHEEHY, P.; MARTZ, E. **Fazer simulação de Monte Carlo no Minitab Statistical Software. - Minitab**. Disponível em: <[https://www.minitab.com/pt-br/Published-Articles/Fazer-simulação-de-Monte-Carlo-no-Minitab-Statistical-Software-/](https://www.minitab.com/pt-br/Published-Articles/Fazer-simula%C3%A7%C3%A3o-de-Monte-Carlo-no-Minitab-Statistical-Software-/)>. Acesso em: 21 jan. 2019.

SHEN, Y.; CHEN, B.; VAN BEEK, T. A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 4073–4081, 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/GC/C5GC00887E#!divAbstract>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

SHIVHARE, M.; MCCREATH, G. Practical Considerations for DoE Implementation in Quality By Design. **BioProcess International**, p. 22–30, 2010. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/2b3c/9420cc8cbc0a2519fd8324cd4e9ec11bae61.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos da Química Analítica**. 9ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

SMAOUI, S. et al. Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1216–S1222, 1 fev. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853521300066X#b0130>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

SOBANSKA, A. W.; PYZOWSKI, J. Quantification of sunscreen ethylhexyl triazone in topical skin-care products by normal-phase TLC/densitometry. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22629203>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

SUBIRATS, X.; ROSÉS, M.; BOSCH, E. On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the pKa of Analytes—A Review. **Separation & Purification Reviews**, v. 36, p. 231–255, 2007. Disponível em: <http://quimica.udea.edu.co/~carlopez/cromatohplc/effect_ph_pk_review_2008.pdf>. Acesso em: 30 set. 2019.

TABORA, J. E.; DOMAGALSKI, N. Multivariate Analysis and Statistics in Pharmaceutical Process Research and Development. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 8, n. 1, p. 403–426, 7 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101418>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

TAKAKU, T. et al. Quantitative structure-activity relationship model for the fetal-maternal blood concentration ratio of chemicals in humans. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 6, p. 930–934, 1 jun. 2015.

TARAJI, M. et al. Rapid Method Development in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for Pharmaceutical Analysis Using a Combination of Quantitative Structure–Retention Relationships and Design of Experiments. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 1870–1878, 7 fev. 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b04282>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

TORRES-LAPASÍO, J. R. et al. Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute–mobile phase–stationary phase polarity parameters. **Journal of Chromatography A**, v. 955, n. 1, p. 19–34, abr. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302002054>>.

TUMPA, A. et al. Theoretical models and QSRR in retention modeling of eight aminopyridines. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 3, p. 436–444, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/chromsci/article/54/3/436/2754822>>.

VARMUZA, K.; FILZMOSER, P.; DEHMER, M. **Multivariate linear QSPR/QSAR models: Rigorous evaluation of variable selection for PLS** Computational and Structural Biotechnology Journal Research Network of Computational and Structural Biotechnology, , 2013. .

VIEIRA, S. Análise de Variância (ANOVA). In: **Análise de Variância (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. p. 38–67.

VISKY, D. Column characterization and selection. In: AHUJA, S.; RASMUSSEN, H. (Ed.). **Separation Science and Technology**. [s.l: s.n.]8p. 85–109.

WEN, Y. et al. Retention prediction in reversed phase high performance liquid chromatography using quantitative structure-retention relationships applied to the Hydrophobic Subtraction Model. **Journal of Chromatography A**, v. 1541, p. 1–11, 16 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967318301122>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

WHARTON, M. et al. A rapid High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) method for the simultaneous determination of seven UV filters found in sunscreen and cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 2, p. 164–170, 1 abr. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-2494.2010.00607.x>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

XU, L. et al. Determination of the lipophilicity (logPo/w) of organic compounds by microemulsion liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 102, p. 409–416, 5 jan. 2015. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.09.037>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

YAO, H. et al. An analytical quality by design (aQbD) approach for a l-asparaginase activity method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 232–239, 5 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708515301400>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

YU, L. X. et al. Understanding pharmaceutical quality by design. **The AAPS journal**, v. 16, n. 4, p. 771–783, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854893>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

ZAKERI-MILANI, P. et al. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3–4, p. 624–630, 15 set. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170850500258X?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

ZHANG, X.; HU, C. Application of quality by design concept to develop a dual gradient elution stability-indicating method for cloxacillin forced degradation studies using combined mixture-process variable models. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, p. 44–53, 8 set. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317310634?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 jan. 2019.