

Desarrollo e implementación de nuevos métodos analíticos en el marco estratégico de la calidad analítica por diseño y la gestión del ciclo de vida

Development and implementation of novel analytical methods within the strategic framework of Analytical Quality by Design and Lifecycle Management

María Mercedes De Zan¹ 

Yamile Soledad Caro¹ 

¹Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

✉ **María Mercedes De Zan**
mmdezan@fcb.unl.edu.ar

Recibido: 5 de junio de 2024

Aprobado: 23 de octubre de 2024

Publicado: 11 de noviembre de 2024

RESUMEN

El marco estratégico de la calidad analítica por diseño (AQbD) provee de herramientas poderosas para el desarrollo y la implementación de métodos analíticos eficientes y robustos destinados al control de calidad de materias primas y productos farmacéuticos. Por otro lado, la gestión del ciclo de vida del método analítico asegura que los resultados obtenidos durante el uso rutinario del mismo cumplan con especificaciones de calidad en todo momento. Basado en la gestión del riesgo de la calidad, este nuevo paradigma propone el uso de diseños estadísticos de experimentos para generar un conocimiento profundo sobre el desempeño de las variables de un método analítico, con el objetivo de encontrar condiciones operativas óptimas. De esta manera, las características de rendimiento de un nuevo método analítico ya no solo se evalúan como una tarea final en la validación formal del método, sino que se establecen y optimizan durante el desarrollo del mismo. Para esto se siguen objetivos predefinidos, los cuales se proponen de acuerdo al alcance del método y al perfil de calidad del producto. Estos objetivos incluyen la definición de los errores máximos permitidos en el resultado informable. En esta revisión bibliográfica se describen y dan ejemplos de los conceptos y herramientas más importantes relacionados a la AQbD. Se presentan además algunos casos reales en los que se aprecia el beneficio de aplicar esta estrategia para resolver problemas analíticos complejos, optimizando el tiempo y recursos invertidos.

Palabras clave: control de calidad; métodos; preparaciones farmacéuticas.

ABSTRACT

The Analytical Quality by Design (AQbD) strategic framework offers powerful tools for the development and implementation of efficient and robust analytical methods for the quality control of raw materials and pharmaceutical products. Additionally, analytical method lifecycle management ensures that the results obtained during routine use meet quality specifications at all times. This new paradigm is based on quality risk management and proposes the use of statistical designs of experiments to generate in-depth knowledge about the performance of variables in an analytical method with the objective of finding optimal operating conditions. This approach allows the performance characteristics of a new analytical method to be established and optimized during method development, rather than being evaluated as a final task in the formal validation of the method. Predefined targets are followed for this purpose, which are proposed according to the scope of the method and the quality profile of the product. These targets include the definition of maximum permissible errors in the reportable result. This literature review outlines the key concepts and tools associated with AQbD, providing illustrative examples. It also presents real-world case studies demonstrating the value of this strategy in addressing complex analytical challenges while optimizing time and resources.

Keywords: quality control; methods; pharmaceutical preparations.



Esta obra está bajo una licencia [Creative Commons Atribución 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC BY 4.0).

Introducción

En 2004 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration) propuso por primera vez a la industria farmacéutica el abordaje de buenas prácticas de manufactura basadas en la gestión del riesgo^[1]. Este fue el puntapié inicial para que los principios de la calidad por diseño (QbD, Quality by Design), planteados anteriormente por el estadista Joseph Juran^[2,3], se volcaran al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos^[4]. Entre los años 2005 y 2019, a la propuesta de la FDA le siguió una serie de guías de calidad (Q8 a Q12) de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, International Conference on Harmonization) acerca de los requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano en las que se describen los principios de QbD y las herramientas de la gestión del riesgo de la calidad (QRM, Quality Risk Management)^[5-9].

En el nuevo paradigma, el tradicional cumplimiento de especificaciones de calidad basado solo en controles al final del proceso se sustituye por un enfoque basado en la gestión del riesgo durante todo el ciclo de vida del producto^[10,11]. Se entiende entonces ahora que la calidad es un requisito que debe diseñarse, construirse y controlarse atendiendo a todos los aspectos de los sistemas y procesos productivos^[12,13].

En este contexto, la Farmacopea Argentina, al igual que otras normas internacionales, se apropia también de estos principios y los incorpora en un nuevo Texto de Información General: <1028> “Calidad por diseño aplicado al desarrollo de productos farmacéuticos”, recientemente publicado en el Segundo Suplemento de la Séptima Edición^[14].

La nueva forma de abordar el manejo de la calidad de los productos farmacéuticos dada por la corriente de QbD pronto se extendió desde el área productiva al área de control de calidad, dando lugar a lo que hoy se conoce como calidad analítica por diseño (AQbD, Analytical Quality by Design)^[15,16]. Numerosos conceptos

y definiciones, denominadas generalmente con una sigla derivada del idioma inglés, surgieron en esta nueva concepción del desarrollo analítico. El objetivo de esta revisión bibliográfica es explorar los conceptos más relevantes relacionados con la estrategia AQbD, mostrando aplicaciones concretas en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el control de calidad de fármacos.

Calidad analítica por diseño

AQbD puede definirse como un marco sistemático utilizado para el desarrollo, la evaluación y la transferencia de métodos analíticos basado en QRM y gestión del ciclo de vida (LCM, Lifecycle Management)^[17-19]. Este enfoque comienza con la definición de objetivos predefinidos según el alcance del método a desarrollar y enfatiza la necesidad de generar un conocimiento profundo y completo del comportamiento de las variables del proceso, lo que a su vez permite optimizar su rendimiento y controlar su desempeño en el uso rutinario^[18,19]. En consonancia con los principios de QbD, en el desarrollo analítico por AQbD, las características de rendimiento de un método ya no solo se evalúan en la validación formal del mismo, sino que se establecen y optimizan durante el desarrollo ajustando las variables del sistema a niveles convenientes^[20-22]. Por su parte, la aplicación de los principios de LCM provee un marco para la verificación continua, de manera de garantizar que el funcionamiento del método validado siga siendo adecuado durante el uso rutinario proveyendo resultados confiables y de calidad.

Entre 2013 y 2016 la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) emitió cuatro artículos de estímulo para la industria en los que comienza a describir y proponer la aplicación de las herramientas de AQbD y LCM^[23-26]. Estos artículos sentaron las bases para el nuevo capítulo general de esta farmacopea: <1220> “El ciclo de vida de los procedimientos analíticos”, que entró en vigencia en mayo de 2022^[27].

En esta nueva ola de actualización, la USP publicó también otro esclarecedor artículo de estímulo en el que diferencia los conceptos de

método analítico y *procedimiento analítico* en el paradigma del ciclo de vida^[28]. En este artículo, la USP propone que el término *método analítico* se utilice para definir las condiciones operacionales definidas por la instrumentación, los reactivos, los estándares, la preparación de muestras, calibradores y controles y los parámetros de aptitud del sistema. En contraste, el término *procedimiento analítico* se propone para referir al uso del método analítico para generar información que permita tomar una decisión. El procedimiento analítico incluye, en este enfoque, la definición de un propósito (por ejemplo, verificar cumplimiento de una especificación), un plan de muestreo, una estrategia de replicación y el cálculo del resultado informable y su incertidumbre asociada. La realidad es que en la literatura científica estos términos se utilizan actualmente de manera indistinta^[29-32].

Por su parte, la Farmacopea Británica (BP) publicó en el 2022 un nuevo capítulo suplementario referido a la aplicación de AQBd para el desarrollo analítico^[33] y en su edición de 2023 incluye en la monografía de comprimidos de atorvastatina un método por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography) para el ensayo de valoración del producto que incorpora elementos de AQBd y LCM^[34,35].

Si bien los nuevos capítulos de USP y BP son de carácter informativo, los mismos demuestran el interés de las farmacopeas por promover la aplicación de este nuevo enfoque.

También ICH, luego de un minucioso proceso de revisión y consensos logrados por un grupo de expertos, publicó en noviembre de 2023 la nueva guía Q14: "Desarrollo de procedimientos analíticos"^[36] y la actualización de la guía "Validación de Procedimientos Analíticos", la Q2(R2)^[37], basadas ambas en los lineamientos de AQBd.

Estas guías describen una estrategia sistemática, basada en el conocimiento científico y QRM para desarrollar, evaluar, usar y controlar procedimientos analíticos apropiados para control de calidad de materias primas y productos farmacéuticos. Además, hacen

hincapié en la posibilidad que da este enfoque, de establecer condiciones robustas de desempeño para los procedimientos analíticos, lo que otorga la gran ventaja de posibilitar cambios o ajustes necesarios en algún parámetro sin que se afecte la calidad del resultado.

Gestión del ciclo de vida del método analítico

La adecuación al uso previsto es un concepto fundamental en el enfoque de LCM^[14,19,21,38]. El mismo puede variar por la etapa de vida del producto en la que se aplica el método (estudio pre-clínico, estudio clínico, producción, control de calidad final, estudio de estabilidad, etc.) o por la finalidad analítica (identificación, ensayo límite de impurezas, valoración, disolución, etc.). En todos los casos es vital dimensionar la importancia del impacto del resultado analítico en la toma de decisiones y las consecuencias que acarrea una decisión incorrecta, sea tanto sobre la salud de un paciente (liberar para su comercialización o dispensa un medicamento fuera de especificación) o sobre la economía de una empresa (descartar un medicamento apto para su consumo).

Bajo esta premisa, QRM acompaña la vida de un método (entendido como procedimiento) analítico a lo largo de tres etapas definidas^[19,22]: 1) diseño, 2) calificación del desempeño y 3) verificación continua (**Figura 1**). Estas tres etapas están sustentadas en el Perfil del Objetivo Analítico (ATP, Analytical Target Profile) del método, el cual a su vez debe alinearse rigurosamente con el Perfil de Calidad Objetivo del Producto (QTPP, Quality Target Product Profile).

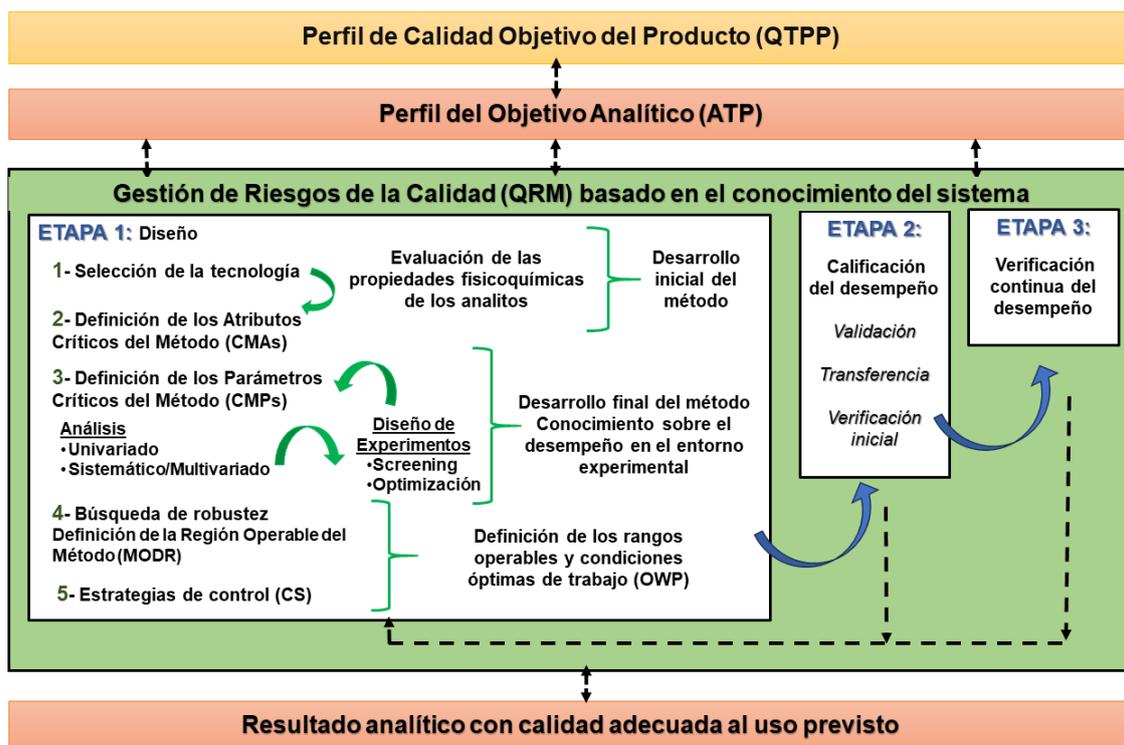


Figura 1: Ciclo de vida de un método analítico.

Perfil del objetivo analítico

El ATP es una prospectiva del desempeño deseado de un método analítico, y define la calidad requerida del resultado o valor informable^[15,20,31]. Generalmente, en su definición se establece el error analítico total máximo admisible teniendo en cuenta el nivel aceptable del riesgo de tomar una decisión incorrecta a partir del resultado informado. Se establecen, por lo tanto, requerimientos para el sesgo (como medida de la veracidad o error sistemático) y para la variabilidad analítica (como medida de precisión o error aleatorio) o directamente para la evaluación conjunta de estos parámetros como medida de la exactitud.

Al definir el ATP, se pueden incluir no solo el alcance del método, sino también otros aspectos de calidad analítica como el tiempo de ejecución, costo e impacto ambiental que genera su uso. Aunque idealmente esta definición es independiente de la tecnología, en ocasiones puede ser necesario vincularla a una técnica analítica específica.

Un ejemplo de definición para el ATP puede encontrarse en el trabajo publicado por Modroui

y col.^[39] en el que describen el desarrollo de un método por electroforesis capilar para el control de calidad de omeprazol en cápsulas gastrorresistentes, con el objetivo de cuantificar simultáneamente el ingrediente farmacéutico activo (IFA) y sus impurezas (IMPs). En este caso se estableció que el método debía ser capaz de separar completamente los picos de los analitos para alcanzar selectividad; que el límite de cuantificación de las IMPs debía ser $\leq 0.1\%$ en peso en relación al IFA y que el IFA debía cuantificarse en el rango de 80% a 120% de la concentración esperada. En cuanto a la exactitud se debían alcanzar recuperaciones entre 98% y 102% para el IFA y entre 95% y 105% para las IMPs; mientras que para la precisión el requerimiento era alcanzar coeficientes de variación (CV) $\leq 2\%$ para el IFA y $\leq 5\%$ para las IMPs, excepto en el límite de cuantificación en el que se permitían CV $\leq 15\%$.

Esta premisa definida en el ATP será la que conduzca las actividades a realizar y las decisiones a tomar durante el desarrollo, evaluación y utilización del método analítico mediante QRM.

Gestión del riesgo

La QRM está involucrada a lo largo de todo el ciclo de vida del método analítico y respalda la justificación científica para la toma de decisiones. Es un proceso sistemático para la evaluación, mitigación, control, comunicación y revisión del riesgo para la calidad del resultado informable en cualquier momento de la vida útil del método^[9,16,31]. Sus objetivos primordiales son:

- Identificar las principales fuentes de sesgo y variabilidad.
- Adquirir conocimientos para el diseño de controles apropiados sobre los parámetros del método con el objetivo de optimizar su desempeño, minimizando los riesgos de incumplimiento del ATP.
- Permitir la gestión continua del conocimiento garantizando que el procedimiento sea apto para su uso a lo largo de su ciclo de vida.
- Incrementar la confianza en la toma de decisiones en base al resultado informado.

Para lograr estos propósitos se puede aplicar una variedad de herramientas, ya sea individualmente o en combinación, a lo largo de las siguientes instancias^[31,40]:

a. Identificación del riesgo

Consiste en identificar sistemáticamente todas las variables asociadas al procedimiento analítico que pueden tener influencia en los atributos críticos del método (CMA, Critical Method Attribute). En esta tarea debe considerarse el procedimiento analítico completo: reactivos, preparación de la muestra y estándares de referencia, instalaciones y condiciones de operación de los equipos e instrumentos utilizados, estrategia de calibración y replicación, etc. Como herramientas para ordenar las variables se pueden utilizar mapas del procedimiento preliminar, listas, tablas o diagramas de Ishikawa (también conocido como diagrama de espina de pescado). Este esquema permite visualizar de manera ordenada y orgánica los numerosos factores que componen un proceso analítico. Para sistemas complejos puede resultar útil dividir el proceso en pasos o etapas.

En la **Tabla 1** pueden encontrarse referencias en las que se ve cómo se utiliza el diagrama de Ishikawa en las etapas iniciales del desarrollo analítico.

b. Análisis del riesgo

En base a fundamentos científicos, conocimientos previos y a una evaluación preliminar del procedimiento completo, se toman decisiones sobre cuáles de las variables identificadas previamente representan o no un riesgo real. Este paso del proceso tiene como objetivo seleccionar, de entre las muchas variables identificadas, aquellas cuyo impacto sobre los CMAs deberá evaluarse experimentalmente para poder conocer su efecto real^[36,41]. Para efectivizar este análisis se han utilizado diferentes instrumentos tales como: método CNX (Control, Noise and eXperimental); mapas de calor (o matriz de riesgo), análisis de modos y efectos de fallas (FMEA, Failure Mode and Effect Analysis) y número de prioridad de riesgo (RPN, Risk Priority Number). Para las variables, para las cuales se conoce de antemano su efecto importante sobre los CMA, pueden tomarse dos tipos de decisiones. La primera es fijarlas en un nivel conveniente, mientras que la segunda considera evaluarlas también experimentalmente para encontrar el nivel óptimo. En las referencias de la **Tabla 1** puede verse cómo, al finalizar este análisis, el número de variables consideradas para la evaluación experimental se reduce considerablemente en relación a la cantidad de variables identificadas.

c. Evaluación del riesgo

Esta es una instancia experimental que permite clasificar las variables en función de la magnitud de sus efectos sobre los CMAs. Esta nueva clasificación se logra generalmente mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, Response Surface Methodology), aplicando diseños estadísticos de experimentos (DOE, Design of Experiment). Las variables que ponen en riesgo el alcance del ATP se definen en esta etapa como parámetros críticos del método (CMP, Critical Method Parameter).

d. Control y revisión de riesgos

Estas tareas implican la toma de decisiones para eliminar, reducir o aceptar un determinado nivel de riesgo conocido. Esto se logra, por un lado, encontrando los niveles de las variables del método que posibiliten alcanzar los requerimientos establecidos para los CMAs y, por otro, estableciendo los controles apropiados para garantizar que estos se cumplan durante el uso rutinario del método. El proceso QRM es secuencial e iterativo; por consiguiente, si no es posible un control adecuado de los CMPs bajo ciertas condiciones propuestas, será necesario rediseñar el procedimiento analítico. Sin embargo, dado que el riesgo no puede eliminarse por completo, existirá siempre un cierto grado de riesgo residual que deberá ser aceptado. La estrategia de control del método, establecida como un proceso de monitoreo en el uso de rutina, tiene como objetivo reducir y mantener este riesgo residual en niveles aceptables^[31,32].

Diseño del método

Selección de tecnología a utilizar

En principio se puede seleccionar cualquier técnica analítica que sea capaz de cumplir los criterios del ATP del método^[42]. Una vez seleccionada la misma, el enfoque se dirige a comprender cómo las características físico-químicas del/los analito/s (polaridad, pKa, solubilidad, absorptividad, etc.) y las variables de entrada (factores) del proceso analítico pueden afectar o impactar sobre los atributos de calidad del resultado. Por ejemplo, en métodos cromatográficos, estas variables pueden ser el pH y la concentración de la solución reguladora de la fase móvil, la temperatura del horno de columna, la velocidad de flujo, etc. Inicialmente se realizan ensayos exploratorios para definir las condiciones iniciales del método y luego se avanza en la generación del conocimiento, siguiendo los pasos de QRM mencionados anteriormente.

Atributos críticos del método

Los CMAs son variables de salida del proceso analítico (respuestas) que reflejan la calidad del resultado. Están relacionados con la

selectividad, la precisión, la sensibilidad y la veracidad (recuperación y/o sesgo) del método. Por ejemplo, en los métodos cromatográficos, los requisitos de sensibilidad se pueden traducir a la magnitud de los parámetros relacionados con la señal analítica, como la altura, el área o la relación señal/ruido de los picos del analito. Las demandas de selectividad pueden monitorearse a través de variables que evalúan la separación adecuada entre picos adyacentes, como las resoluciones (R_s) o el factor de separación (α), mientras que el factor de cola (T), el factor de retención (k) y el número de platos teóricos (N) se pueden evaluar para garantizar una buena forma de pico (parámetros que afectan la precisión y la selectividad). Una vez que se identifican los CMAs, se deben establecer para ellos valores objetivo o rangos aceptables para que respalden las siguientes actividades de desarrollo del método. Por ejemplo, se pueden establecer como criterios de aceptación que las R_s entre picos cromatográficos sean ≥ 2.0 , que la relación señal/ruido sea ≥ 20 , que el coeficiente de variación (CV) de áreas en inyecciones repetidas sea ≤ 1.0 , etc.

Parámetros críticos del método

Los CMPs son los factores cuya variabilidad tienen un impacto real directo y significativo sobre los CMAs. Estos factores pueden ser clasificados como “controlables” o “no controlables” sin perder de vista que todos ellos pueden afectar la calidad del resultado analítico. A su vez los CMPs pueden ser:

- Relacionados con la preparación de la muestra (reactivos, solventes, tiempos o modos de extracción, etc.)
- Instrumentales (composición de la fase móvil, temperatura del horno, longitud de onda utilizada para la detección, etc.)
- Ambientales (luz, humedad, temperatura)

Los CMPs conviven además con otros factores de menor impacto o factores “no críticos”^[19]. Para poder llegar a esta clasificación de una manera consistente en AQbD se aplican las herramientas de gestión de riesgo vistas anteriormente.

TABLA 1: GESTIÓN DEL RIESGO EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROL DE CALIDAD DE FÁRMACOS.

Referencias: ¹HPLC: High-Performance Liquid Chromatography; ²IFA: ingrediente farmacéutico activo; ³UPLC: Ultra-Performance Liquid Chromatographic; ⁴UPLC-MS: Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; ⁵CNX: Control, Noise and eXperimental; ⁶FMEA: Failure Mode and Effect Analysis; ⁷RPN: Risk Priority Number.

Método	Identificación de Riesgo		Análisis de Riesgo	
	Herramienta	Número de variables identificadas	Herramienta	Número de variables seleccionadas
HPLC ¹ indicativo de estabilidad para ácido fusídico en IFA ² y gel de uso tópico ^[43]	Diagrama de Ishikawa	41	Conocimientos previos	7
UPLC ³ indicativo de estabilidad para hexoprenalina en inyectables ^[44]	Diagrama de Ishikawa	12	Conocimientos previos	4
HPLC ¹ para valoración de clorhidrato de terbinafina en cremas ^[45]	Diagrama de Ishikawa	18	Conocimientos previos	6
UPLC-MS ⁴ para determinar perfiles cuantitativos de un medicamento herbario en cápsulas ^[46]	Diagrama de Ishikawa	12	Conocimientos previos	4
HPLC ¹ indicativo de estabilidad para neratinib y naringenina en nanopartículas ^[47]	Diagrama de Ishikawa	17	CNX ⁵	3
UPLC ³ para determinación de impurezas de fumarato de tenofovir alafenamida en comprimidos ^[48]	Diagrama de Ishikawa	No informadas	Mapas de calor	6
HPLC ¹ por intercambio iónico para cuantificar ribitol fosfato de polirribosilo como antígeno de Haemophilus influenzae b en una vacuna hexavalente ^[31]	Mapa del proceso en etapas	11	FMEA ⁶ y RPN ⁷	7
HPLC ¹ indicativo de estabilidad para nintedanib en IFA ² ^[49]	Diagrama de Ishikawa	24	FMEA ⁶ y RPN ⁷	4
HPLC ¹ para determinar pureza enantiomérica de moxifloxacin en gotas oftálmicas ^[50]	Diagrama de Ishikawa	40	Combinación de CNX ⁵ , RPN ⁷ y FMEA ⁶	3

Diseños estadísticos de experimentos

En el marco del AQbD, la utilización de DOEs tiene como objetivos principales identificar los CMPs, evaluar la magnitud de sus efectos sobre los CMAs y seleccionar las condiciones operativas óptimas, es decir, definir el MODR (Method Operable Design Region).

El conocimiento experimental del sistema permite obtener modelos que describen el proceso en el que las respuestas (y) dependen de los niveles de los factores (x) (Figura 2).

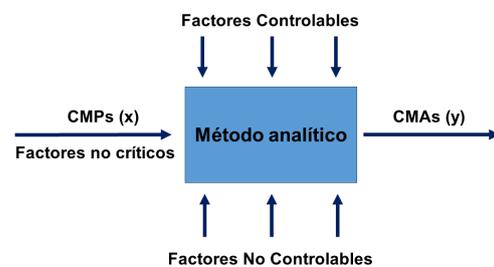


Figura 2: Factores y respuestas en un método analítico.

El DOE es una herramienta muy conocida en el ámbito de las ciencias experimentales y se define como la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso por medio de pruebas experimentales planteadas adecuadamente que permiten entender mejor situaciones complejas de relación causa-efecto^[51,52]. Mediante la elaboración de modelos matemáticos, logra extraer la máxima cantidad de información de los datos con un mínimo número de pruebas experimentales diseñadas adecuadamente^[53,54]. Estos experimentos deben realizarse en un orden aleatorio y no correlacionado, de manera de no sesgar las respuestas.

En los sistemas complejos cuyo funcionamiento depende de muchas variables, tales como suelen ser los métodos analíticos, los DOEs se aplican además de manera secuencial. En una primera etapa se aplican diseños de *screening* (de primer orden), destacándose entre ellos el diseño factorial en dos niveles y el diseño de Plackett y Burman por ser muy eficientes. Estos diseños permiten identificar, entre todos

los factores del sistema, aquellos que influyen más significativamente en las respuestas, calculando sus efectos e interacciones^[54-60].

El efecto principal de un factor es el cambio en la respuesta producido al variar su nivel, mientras que la interacción entre dos factores es el cambio en la respuesta cuando ambos varían simultáneamente. Esta interacción es nula si el cambio iguala la suma de los efectos principales, positiva si lo supera, y negativa si es menor. Se puede estudiar de esta manera, por ejemplo, qué efecto tiene la temperatura del horno de columna sobre la Rs de dos picos cromatográficos y también cómo es el efecto de la interacción entre los cambios de temperatura y de pH de la fase móvil.

Los factores con efectos y/o interacciones más significativos y que ponen en riesgo el cumplimiento de los criterios de aceptación de los CMAs se establecen como CMPs. Estos factores se someten a un estudio más detallado utilizando DOEs de segundo orden, mientras que los factores menos influyentes se fijan y controlan en niveles convenientes. Los DOEs de segundo orden, conocidos también como diseños de superficie de respuesta permiten encontrar condiciones operativas óptimas, en las que se cumplen simultáneamente todos los criterios establecidos para los CMAs. Entre los más utilizados se encuentran los diseños: factorial completo a tres niveles (3-DFC), el central compuesto (DCC) y el Box-Behnken (DBB)^[54-60] (Figura 3).

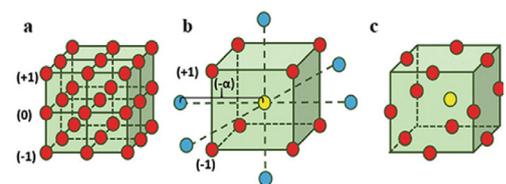


Figura 3: Representación esquemática para tres factores.
a. diseño factorial completo a tres niveles (3-DFC).
b. diseño central compuesto (DCC).
c. diseño Box-Behnken (DBB).
(Extraído de Goicoechea. 2018).

Otros diseños empleados frecuentemente son: Split-plot^[61] para aleatorizaciones complejas, D-Optimal^[51,56] para evaluar dominios experimentales asimétricos y los Diseños de Mezclas^[62] para optimizar la composición porcentual de una mezcla de solventes (una fase móvil por ejemplo).

La RSM permite la construcción de modelos polinomiales^[55] que describen estadísticamente el comportamiento de cada una de las respuestas del sistema en función de los niveles que pueden tomar los factores. El nombre de la metodología se debe a la perspectiva gráfica que puede generarse tridimensionalmente con el modelo ajustado (**Figura 4.a**). La gráfica de contornos se obtiene, a su vez, como la proyección en el plano de la superficie de respuesta (**Figura 4.b**).

Finalmente, la superposición de gráficas de contorno es una estrategia que permite encontrar fácilmente regiones operativas que satisfacen simultáneamente los requerimientos o criterios de aceptación de dos o más respuestas^[57], lo que en el entorno de la AQbD se conoce como MODR.

Región Operable del Método

El MODR es una combinación multidimensional de los niveles de los CMPs para la cual se ha demostrado que el método tendrá un desempeño y robustez adecuados. En otras palabras, cualquier combinación de los niveles de los CMPs dentro del MODR garantiza que se cumpla el ATP^[38,40]. Como se muestra en la **Figura 4.c** en la superposición de gráficas de contorno se pueden identificar distintas regiones. La región de desempeño no aceptable (en color naranja) indica las combinaciones de los niveles de los factores para los cuales los CMAs no cumplen con las especificaciones. La región de desempeño aceptable es el MODR (en color verde). Los límites de incertidumbre del MODR (en color amarillo) pueden representarse como intervalos de confianza, de predicción o de tolerancia para un determinado nivel de confianza (habitualmente $\alpha=0.05$). Estos límites proporcionan una evaluación de la robustez del método teniendo en cuenta la variabilidad

analítica^[38,40]. En la **Figura 4.d**, se observa además el espacio de control (CS, Control Space), que es un entorno experimental simétrico definido dentro del MODR, en el cual se conforma la estrategia de control para el uso rutinario. Finalmente, el punto de color rojo mostrado en la figura dentro del CS, es denominado punto óptimo de trabajo (OWP, Optimal Working Point) siendo este una combinación operativa de los CMPs seleccionada para el uso de rutina. Este punto puede elegirse en función de la conveniencia operativa o de criterios estadísticos, siempre que se encuentre en una zona robusta dentro del CS^[38,40].

En la **Tabla 2** pueden encontrarse algunas aplicaciones concretas de diseños experimentales utilizados para establecer los CMP y para definir MODR y CS en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el control de calidad de fármacos.

Estrategia de Control

La estrategia de control se establece entonces a partir del conocimiento ganado en la etapa anterior. Esta estrategia debe garantizar el correcto desempeño del método analítico y la calidad del resultado obtenido en el uso rutinario^[26,37]. Para esto se incluyen los controles necesarios sobre los CMPs, y/o se establece la prueba de idoneidad del sistema (SST, System Suitability Test), en la cual se verifica el desempeño de los CMAs. La comprensión de las principales fuentes de variabilidad del procedimiento analítico adquirida durante el desarrollo se puede utilizar, además, para generar la estrategia de replicación donde los factores del procedimiento que contribuyen a una gran parte de la variación general se pueden replicar para mejorar la precisión^[66,67]. En la **Tabla 2** pueden verse algunas estrategias de control establecidas tanto sobre CMPs, como sobre CMAs durante el desarrollo de nuevos métodos analíticos.

TABLA 2: USO DE DISEÑOS EXPERIMENTALES Y GENERACIÓN DE ESTRATEGIAS DE CONTROL EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Referencias: ¹HPLC: High-Performance Liquid Chromatography; ²3-DFC: diseño factorial completo a tres niveles; ³CMPs: Critical Method Parameter; ⁴DBB: diseño Box-Behnken; ⁵SST: System Suitability Test; ⁶CMAs: Critical Method Attribute; ⁷Rs: resoluciones; ⁸UV: ultravioleta; ⁹CV: coeficiente de variación; ¹⁰DCC: diseño central compuesto; ¹¹UPLC: Ultra-performance Liquid Chromatographic.

Método analítico	Diseño de screening	Diseño de optimización	Estrategia de control
HPLC ¹ para determinación de ramipril, telmisartán, atorvastatina y amlodipina en especialidades farmacéuticas ^[63]	Ninguno	3-DFC ²	Sobre los CMPs ³ : composición y pH de la fase móvil
HPLC ¹ indicativo de estabilidad para neratinib y naringenina en nanopartículas ^[47]	Ninguno	DBB ⁴	SST ⁵ para los CMAs ⁶ : tiempos de retención, Rs ⁷ , número de platos teóricos y coleo de picos de los analitos
UV ⁸ y HPLC ¹ para cuantificación de ketoconazol y beclometasona en especialidades farmacéuticas ^[64]	Ninguno	DCC ¹⁰	No establecida
HPLC ¹ para losartan, hidrocortizida y sus impurezas en comprimidos ^[30]	Plackett y Burman	DCC ¹⁰	SST ⁵ para los CMAs ⁶ : factor de capacidad, número de platos teóricos y tiempos de retención relativo para los picos de los analitos
HPLC ¹ para tartrato de rivastigmina en nanopartículas ^[29]	Factorial	DCC ¹⁰	SST ⁵ para los CMAs ⁶ : tiempos de retención, áreas de pico, factor de coleo, número de platos teóricos. CV ⁹ de los CMAs ⁶ en inyecciones repetidas
UPLC ¹¹ para determinación de impurezas de fumarato de tenofovir alafenamida en comprimidos ^[48]	Plackett y Burman	DBB ⁴	Marca y proveedor de insumos. Sobre los CMPs ³ : concentración y pH del buffer de la fase móvil, proporción de solvente orgánico, velocidad de flujo y temperatura de columna. SST ⁵ para los CMAs ⁶ : tiempos de retención y Rs ⁷ de los picos de los analitos
HPLC ¹ para cuantificación de lípidos en nanopartículas ^[65]	Plackett y Burman	DBB ⁴	Sobre los CMPs ³ : proporción de metanol en la fase móvil, velocidad de flujo y temperatura de columna

Calificación del desempeño

El objetivo de la validación, en el marco de la AQBd, es realizar una demostración final, formal y documentada de que el desempeño del método cumple con el ATP^[27,36,37,68]. Las actividades experimentales suelen ser menos en este enfoque que en una validación tradicional, puesto que se dispone de mucha información ganada durante el desarrollo del método.

Por otro lado, el riesgo de falla en alcanzar en esta etapa los atributos de calidad requeridos para el método, es prácticamente nulo, puesto que durante el desarrollo se trabajó para alcanzarlos de una manera segura y robusta.

Verificación continua

El monitoreo continuo es una actividad o un conjunto de actividades que permiten confirmar la idoneidad del método durante el uso rutinario y el cumplimiento de los criterios establecidos en el ATP a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo esta verificación continua es necesario contar con los procedimientos operativos estándar (POEs), documentos en los que se describen detalladamente las instrucciones para ejecutar el método analítico en las condiciones operativas óptimas y la estrategia de control del mismo, incluyendo los SSTs. Los parámetros de la estrategia de control del método deben evaluarse y registrarse en cada corrida analítica verificando el cumplimiento

de las especificaciones establecidas. Si las especificaciones no se cumplen, el análisis de la muestra no puede llevarse a cabo. Deberá trabajarse primero en corregir o ajustar los parámetros necesarios para lograr el desempeño adecuado del método. Una vez logrado esto se podrá analizar la muestra garantizando resultados confiables y de calidad.

Una herramienta valiosa que puede utilizarse en esta etapa es la carta de control, gráfico que proporciona un método sencillo para realizar el seguimiento estadístico del proceso analítico a lo largo del tiempo. Esta representación visual permite evaluar eficazmente la aparición de tendencias o eventos inesperados^[27,69,70].

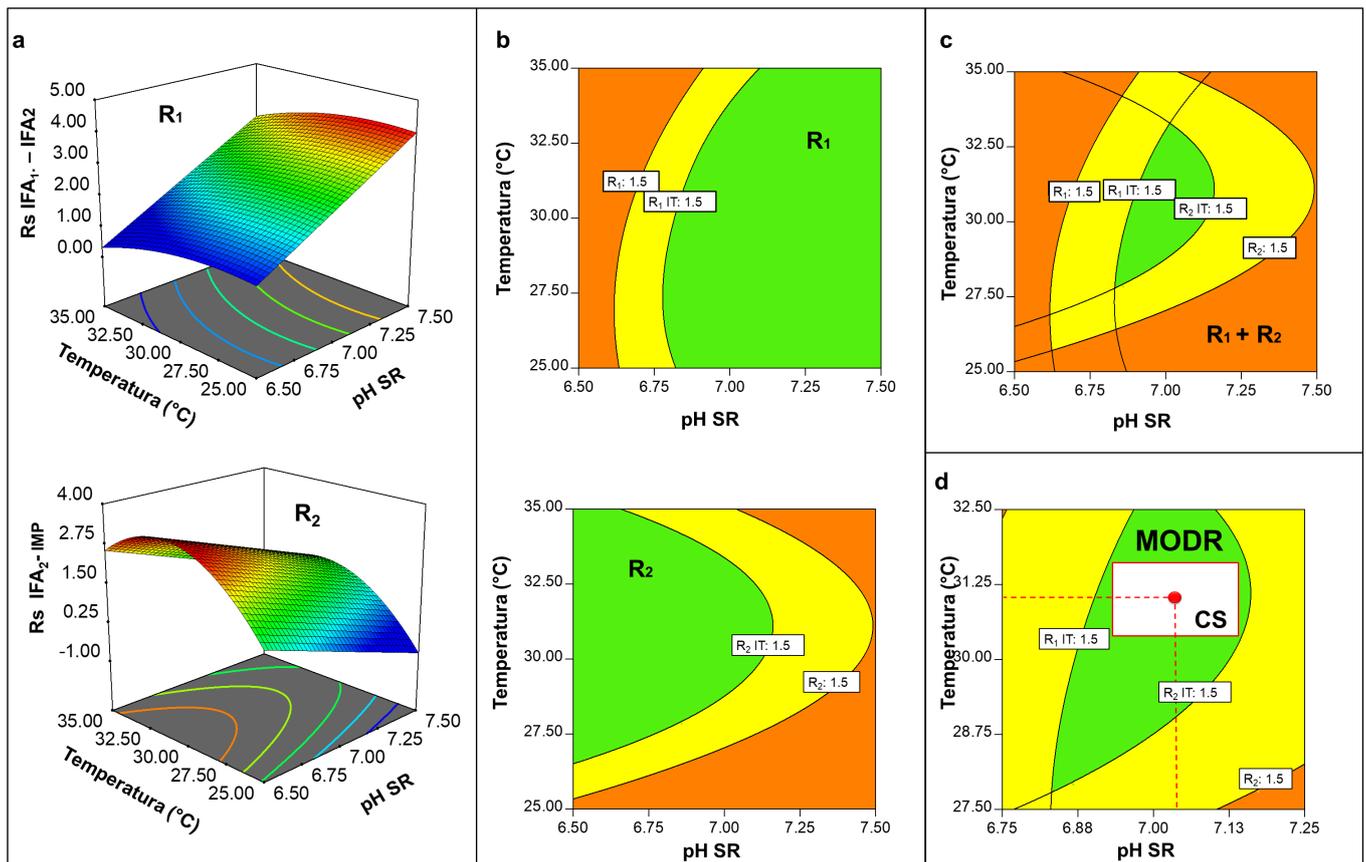


Figura 4: Gráficas obtenidas con Design-Expert 11.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) a. Superficies de respuesta para los modelos que describen el comportamiento de dos Rs cromatográficas en función de dos factores del sistema. b. Gráficas de contorno de los mismos modelos. c. Gráficas de contorno superpuestas. d. El CS indicado como rectángulo blanco y el OWP como un punto rojo dentro del MODR.

(Adaptado de Caro YS, Cámara MS, De Zan MM. 2023).

Conclusión

Esta revisión bibliográfica muestra una utilización incipiente pero creciente de las estrategias de AqBd para el desarrollo y la implementación de métodos analíticos eficientes y robustos destinados al control de calidad de materias primas y productos farmacéuticos, así como de productos intermedios o en proceso. Las herramientas utilizadas son diversas y particulares, adaptándose en cada caso a la disponibilidad y necesidades de los analistas. Su aplicación resultó particularmente provechosa en la optimización de sistemas complejos en los que debieron manejarse simultáneamente muchos factores para lograr la selectividad y el nivel de incertidumbre adecuado para los resultados analíticos. En este sentido, el desarrollo de métodos indicativos de estabilidad destinados al análisis de productos con matrices complejas o con más de un IFA, se vieron beneficiados por el uso de diversas herramientas de QRM. La utilización de diseños experimentales posibilitó en estos casos, encontrar condiciones de trabajo adecuadas mediante la ejecución de una cantidad razonable de pruebas experimentales, optimizando de esta manera el uso del tiempo y de los recursos.

En un ámbito de permanente innovación como es la industria farmacéutica actual, en la que se generan continuamente nuevas moléculas de uso terapéutico y novedosos productos en diversas formulaciones, la AqBd y el LCM se presentan como un marco seguro y eficiente para alcanzar las exigencias regulatorias en el control de calidad.

Conflicto de intereses

Las autoras declaran no poseer conflictos de interés.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional del Litoral a través del Proyecto CAI+D 2020: 50620190100051LI.

Bibliografía

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Pharmaceutical cGMPs for the 21st century – a risk-based approach. 2004 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/77391/download>
2. Juran JM. The quality trilogy, a universal approach to managing for quality. ASQC 40th Annual Quality Congress; 1986 May 20; Anaheim, California.
3. Juran JM. Juran on Quality by Design, the new steps for planning quality into goods and services. Nueva York: The Free Press; 1992.
4. Plumb K. Continuous processing in the Pharmaceutical Industry, changing the mindset. Chemical Engineering Research and Design. 2005;83(6):730-738. DOI: <https://doi.org/10.1205/cherd.04359>
5. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical development Q8(R2) [Internet]. 2009 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
6. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Quality risk management Q9(R1) [Internet]. 2023 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
7. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for

- Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Pharmaceutical quality system Q10 [Internet]. 2008 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
8. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) Q11 [Internet]. 2012 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
 9. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Guideline, Technical and regulatory considerations for pharmaceutical product lifecycle management Q12 [Internet]. 2019 [citado 29 abr 2024]. Disponible en: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
 10. Weitzel J, Pappa H, Banik GM, Barker AR, Bladen E, Chirmule N, et al. Understanding Quality Paradigm Shifts in the Evolving Pharmaceutical Landscape, Perspectives from the USP Quality Advisory Group. *AAPS J.* 2021;23(6):112. DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-021-00634-5>
 11. Zacché M, Andersson M. The advantages of a 'Quality by Design' approach in pharma drug development. *Pharma Manufacturing* [Internet]. 2020 [citado 3 abr 2024]. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.21090.04802>
 12. Beg S, Rahman M, Panda SS. Pharmaceutical QbD, Omnipresence in the product development lifecycle. *European Pharmaceutical Review.* 2017;22(1):58-64.
 13. Yu LX, Amidon G, Khan MA, Hoag SW, Polli J, Raju GK, et al. Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 2014;16(4):771-783. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9598-3>
 14. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. *Farmacopea Argentina. 7ª edición Segundo Suplemento.* Argentina: Ministerio de Salud. 2023. Capítulo <1028>, Calidad por diseño aplicado al desarrollo de productos farmacéuticos.
 15. Schweitzer M, Pohl M, Hanna-Brown M, Nethercote P, Borman P, Hansen G, et al. Implications and opportunities of applying QbD principles to analytical measurements. *Pharmaceutical Technology.* 2010;34(2):52–59.
 16. Borman P, Chatfield M, Nethercote P, Thompson D, Truman K. The application of quality by design to analytical methods. *Pharmaceutical Technology.* 2007;31(10):142–152.
 17. Parr MK, Schmidt AH. Life cycle management of analytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018;147:506–517. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.020>
 18. Jackson P, Borman P, Campa C, Chatfield M, Godfrey M, Hamilton P, et al. Using the Analytical Target Profile to Drive the Analytical Method Lifecycle. *Analytical Chemistry.* 2019;91(4):2577–2585. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04596>
 19. Deidda R, Orlandini S, Hubert P, Hubert C. Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context, A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2018;161:110–121. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.050>

20. Hubert C, Houari S, Rozet E, Lebrun P, Hubert P. Towards a full integration of optimization and validation phases, An analytical-quality-by-design approach. *Journal of Chromatography A*. 2015; 1395:88–98. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.059>
21. Guiraldelli A, Weitzel J. Evolution of analytical procedure validation concepts, Part I – Analytical procedure life cycle and compendial approaches [Internet]. PharmTech; 2022 [citado 3 may 2024]. Disponible en: <https://www.pharmtech.com/view/evolution-of-analytical-procedure-validation-concepts-part-i-analytical-procedure-life-cycle-and-compendial-approaches>
22. Guiraldelli A, Weitzel J. Evolution of analytical procedure validation concepts, Part II – Incorporation of science and risk-based principles in ICH Q14 and Q2(R2) guidelines [Internet]. PharmTech; 2022 [citado 3 may 2024]. Disponible en: <https://www.pharmtech.com/view/evolution-of-analytical-procedure-validation-concepts-part-ii-incorporation-of-science-and-risk-based-principles-in-ich-q14-and-q2-r2-guidelines>
23. Martin GP, Barnett KL, Burgess C, Curry PD, Ermer J, Gratzl GS, Hammond JP, et al. Lifecycle Management of Analytical Procedures, method development, procedure performance qualification, and procedure performance verification. *USP Stimuli Article. Pharmacopeial Forum*. 2013;39(5).
24. Burgess C, Curry P, LeBlond DJ, Gratzl GS, Kovacs E, Martin GP, et al. Fitness for use, decision rules and target measurement uncertainty. *USP Stimuli Article. Pharmacopeial Forum*. 2016;42(2).
25. Barnett K, McGregor PL, Martin GP, Blond DJ, Weitzel J, Ermer J, et al. Analytical target profile, structure and application throughout the analytical lifecycle. *USP Stimuli Article. Pharmacopeial Forum*. 2016;42(5).
26. Kovacs E, Ermer J, McGregor PL, Nethercote P, LoBrutto R, Martin GP, et al. Analytical control strategy. *USP Stimuli Article. Pharmacopeial Forum*. 2016;42(5).
27. United States Pharmacopeial Convention, USP General Chapter <1220>, Analytical Procedure Lifecycle. *Pharmacopeial Forum*. 2021;46(5).
28. Schofield T, et al. Distinguishing the analytical method from the analytical procedure to support the USP analytical procedure life cycle paradigm. *USP Stimuli Article. Pharmacopeial Forum*. 2019;45(6).
29. Salwa S, Lalit K. Quality-by-design driven analytical method (AQbD) development and validation of HPLC–UV technique to quantify rivastigmine hydrogen tartrate in lipidic nanocarriers, Forced degradation, and assessment of drug content and in vitro release studies *Microchemical Journal*. 2023;193:108944. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108944>
30. Rocha AL, Lourenço FR. Development and optimization of a LC-MS/MS compatible method for quantification of losartan, hydrochlorothiazide and their impurities using AQbD approach and measurement uncertainty evaluation. *Talanta* 2023;259:124481. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124481>
31. Moineau I, Chambon V, Perret C, Gouit L, Zamora I, Macumi M, et al. Using Analytical Quality by Design to improve analytical method development in vaccines quality control, Application to an optimized quantitative high-performance

- anion-exchange chromatographic method. *Journal of Chromatography B*. 2024;1233:123946. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123946>
32. Passarin PBS, Rebello Lourenço FR. Enhancing analytical development in the pharmaceutical industry, A DoE-QSRR model for virtual Method Operable Design Region assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2024;239:115907. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115907>
33. British Pharmacopoeia. Supplementary chapter on the use of Analytical Quality by Design concepts for analytical procedures [Internet]. 2022 [citado 12 abr 2024]. Disponível em: <https://www.pharmacopoeia.com/content/html/425>
34. British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia*. United Kingdom: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. 2023. Atorvastatin Tablets Monograph.
35. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Technical Review of MHRA Analytical Quality by Design Project; 2019 [citado 1 oct 2024]. Disponível em: https://assets.publishing.service.gov.uk/media/5cfa8205ed915d736df4cb98/AQbD_Technical_Document_-_Final_04_June_2019.pdf
36. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q14 Analytical Procedure Development 2023 [citado 29 abr 2024]. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
37. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Q2(R2) Validation of Analytical Procedures 2023 [citado 29 abr 2024]. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
38. Mahr AG, Lourenço FR, Borman P, Weitzel J, Roussel JM. Analytical Quality by Design Fundamentals and Compendial and Regulatory Perspectives. En Breikreitz MC, Goicoechea HC, editors. *Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development*, AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. Cham: Springer International Publishing; 2023. pp. 163–198.
39. Modroiu A, Marzullo L, Orlandini S, Gotti R, Hancu G, Furlanetto S. Analytical quality by design-based development of a capillary electrophoresis method for omeprazole impurity profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2024;248:16295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2024.116295>
40. Caro YS, Cámara MS, De Zan MM. Quality by Design Applications to Development of Analytical Methods for Quality Control of Pharmaceuticals. En Breikreitz MC, Goicoechea HC, editors. *Introduction to Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing and Analytical Development*, AAPS Introductions in the Pharmaceutical Sciences. Cham: Springer International Publishing; 2023. pp. 221–244.
41. Frank T, Brooks S, Murray K, Reich S, Sanchez E, Hasselbalch B, et al. Quality risk management principles and industry case studies. *Pharmaceutical Technology*. 2011;35(7):72–79. Disponível em: <https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/pharmtech/8b25c1fa532ee576f3a211b->

[b6306732e90829315.pdf/PharmTech_NA_July2011.pdf](https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109253)

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109253>

42. Borman P, Campa C, Delpierre G, Hook E, Jackson P, Kelley W, et al. Selection of analytical technology and development of analytical procedures using the analytical target profile. *Analytical Chemistry*. 2022;94(2):559–570. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03854>
43. Sharma G, Thakur K, Raza K, Katare OP. Stability kinetics of fusidic acid, Development and validation of stability indicating analytical method by employing Analytical Quality by Design approach in medicinal product(s). *Journal of Chromatography B*. 2019;1120:113–124 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.05.001>
44. Afonso Ulrich JA, Marko V, Boehm K, Lara García RA, Jeremic D, Paudel A. Development and validation of a stability-indicating UPLC method for the determination of hexoprenaline in injectable dosage form using AQbD principles. *Molecules*. 2021;26(21):6597. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26216597>
45. Separovic L, Lourenço FR. Measurement uncertainty evaluation of an analytical procedure for determination of terbinafine hydrochloride in creams by HPLC and optimization strategies using Analytical Quality by Design. *Microchemical Journal*. 2022;178:107386. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107386>
46. Ding F, Liu S, Wu G, Qu H, Gong P, Xie Y, et al. A novel process for developing a quantitative chromatographic fingerprint analysis method based on analytical quality by design, A case study of Xiaochaihu capsules. *Microchemical Journal*. 2023;194:109253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109253>
47. Panda SS, Afzal O, Altamini ASA, Beg S. Simultaneous estimation of neratinib and naringenin from pharmaceuticals using a stability-indicating liquid chromatographic method, Application to analytical quality by design concept and multi-tool method greenness assessment. *Microchemical Journal*. 2023;191:108848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108848>
48. Teng J, Zhu C, Lyu J, Pan L, Zhang M, Zhang F, et al. Analytical Lifecycle Management (ALM) and Analytical Quality by Design (AQbD) for analytical procedure development of related substances in tenofovir alafenamide fumarate tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;207:114417. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114417>
49. Jayagopal B, Muruges S. QbD-mediated RP-UPLC method development invoking an FMEA-based risk assessment to estimate nintedanib degradation products and their pathways. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(9):7087–7103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.07.014>
50. Rašević M, Malenović A, Protić A, Zečević M. Analytical method development supported by DoE-DS approach for enantioseparation of (S,S)- and (R,R)-moxifloxacin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;235:115645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115645>
51. Myers RH, Montgomery DC. *Response Surface Methodology, Product and Process Optimization Using Designed Experiments*. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons; 2002.
52. Gutiérrez Pulido H, de la Vara Salazar R. *Análisis y diseño de experimentos*.

- 2ª Edición. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2008.
53. Box GE, Hunter WE, Hunter JS. Statistics for Experimenters, Design, Innovation and Discovery. 2nd Edition. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005.
54. Goicoechea HC. Experimental Design. En Siddiqi KS, Nollet LML, editors. Fingerprinting Techniques in Food Authentication and Traceability. Boca Raton: Taylor and Francis; 2019. pp. 187–206.
55. Bruns RE, Scarminio IS, de Barros Neto B. Statistical design-Chemometrics. 1st Edition. Elsevier; 2006.
56. Ferreira SLC, Bruns RE, da Silva EGP, dos Santos WNL, Quintella CM, David JM, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158:2–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.051>
57. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008;76(5):965–977. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
58. Leardi R. Experimental design in chemistry, A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. 2009;652:161–172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.015>
59. Dejaegher B, Vander Heyden Y. The use of experimental design in separation science. *Acta Chromatographica*. 2009;21(2):161–201. DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/achrom.21.2009.2.1>
60. Vera Candiotti L, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization, Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014;124:123–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
61. Cortes LA, Simpson JR, Parker PA. Response surface split-plot designs, a literature review. *Quality and Reliability Engineering International*. 2018;34(7):1374–1389. DOI: <https://doi.org/10.1002/qre.2350>
62. Azcarate SM, Pinto L, Goicoechea HC. Applications of mixture experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *Journal of Chemometrics*. 2020;34(12):3246. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cem.3246>
63. Prajapati P, Patel A, Shah S. Application of DoE-based analytical QRM to development of the multipurpose RP-HPLC method for estimation of multiple FDC products of telmisartan using enhanced AQbD approach. *Journal of Chromatographic Science*. 2022;60(6):525–537. DOI: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab070>
64. Kannaiah KP, Sugumaran A. Environmental benign AQbD based estimation of ketoconazole and beclomethasone by RP-HPLC and multi-analytical UV spectrophotometric method. *Microchemical Journal*. 2022;172:106968. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106968>
65. Kim KH, Lee JE, Lee JC, Maharjan R, Oh H, Lee K, et al. Optimization of HPLC–CAD method for simultaneous analysis of different lipids in lipid nanoparticles with analytical QbD. *Journal of Chromatography A*. 2023;1709:464375. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464375>

66. Borman P, Schofield T, Lansky D. Reducing uncertainty of an analytical method through efficient use of replication. *Pharmaceutical Technology*. 2021;45(4):46–56.
67. Ermer J, Agut C. Precision of the reportable result. Simultaneous optimisation of number of preparations and injections for sample and reference standard in quantitative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014;1353:71–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.043>
68. United States Pharmacopeial Convention. US Pharmacopeial. USP41–NF26. 2017. General Chapter <1210>, Statistical Tools for procedure Validation.
69. Wheeler D, Chambers D. Understanding statistical process control. 3rd Edition. Knoxville: SPC Press; 2012.
70. Jambo H, Dispas A, Hubert C, Lecomte F, Ziemons E, Hubert P. Generic SFC-MS methodology for the quality control of vitamin D3 oily formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022;209:114492. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114492>