

Universidade Estadual de Campinas

Departamento de Estatística
ME623 - Planejamento e Pesquisa
Professor Aluísio de Souza Pinheiro

Aplicação de um Desenho Encaixado de Dois Estágios na Indústria Farmacêutica

Lucas Perondi Kist - 236202

Campinas - SP
2023

1 Introdução

A capacidade de manter a qualidade da produção independentemente de fornecedores é essencial para que uma empresa possa operar em larga escala. Em particular, isso deve ocorrer em empresas farmacêuticas, tendo em vista que deve ser mantido um padrão nas características dos medicamentos produzidos e que serão comercializados.

Nesse sentido, o proprietário de uma rede farmacêutica estava interessado em saber se as características de um medicamento eram, em média, constantes, independentemente de lotes de um mesmo fornecedor. Por isso, foi realizado um experimento utilizando um desenho encaixado balanceado de dois estágios, no qual foram utilizados como fatores os lotes e os contêineres que os compunham.

Dessa forma, foi possível verificar se existem evidências estatisticamente significativas de que os insumos eram suficientemente homogêneos, de forma que não afetassem as características do produto final. Para isso, foram conduzidas análises descritivas, exploratórias e inferenciais a respeito dos dados coletados, além de um diagnóstico a fim de garantir a validade das conclusões e uma análise crítica do experimento realizado.

2 Metodologia

2.1 Desenho encaixado balanceado de dois estágios

Segundo Peng (2004), o desenho encaixado (do inglês, *nested design*), é um tipo de delineamento de experimento cuja aplicação ocorre quando os níveis de um fator são hierarquicamente dependentes dos níveis de outro. Dessa forma, há uma restrição em relação a como ambos os fatores podem ser cruzados, o que impede, por exemplo, a realização de um desenho fatorial completo.

Nesse sentido, ele é aplicado em desenhos multifatores nos quais os níveis de um deles são similares, porém diferentes, para níveis distintos de outro fator de interesse. Dessa forma, ambos são “encaixados”, de modo que não haja todas as possíveis combinações dos fatores de interesse, geralmente por limitações físicas, e se crie uma hierarquia entre eles. Assim, após o ‘encaixe’ dos fatores, é realizada uma aleatorização da ordem de execução dos experimentos.

Apesar da semelhança com um desenho fatorial, de acordo com Montgomery (2017), esse desenho pode ser identificado quando é possível re-enumerar arbitrariamente os níveis de um fator, de forma a explicitar que não há relação entre duas coisas com o mesmo número originalmente. A partir dessa abordagem, se existir essa diferença entre características que, a princípio, eram consideradas idênticas, então o planejamento empregado é do tipo encaixado.

Ademais, considerando que será utilizado um desenho encaixado com dois fatores, apenas será apresentada essa versão do desenho. Contudo, há uma versão dele para três ou mais fatores, o qual é chamado de “desenho aninhado de m estágios”, que está descrita, por exemplo, em Montgomery (2017) e Ojima (1997).

2.1.1 Modelo

Montgomery (2017) apresenta o modelo para o planejamento com dois fatores fixos. Considerando que há apenas dois fatores A e B , com a níveis e b níveis para cada nível de A , respectivamente, além de n réplicas, e que ξ é o erro aleatório, tal que $\xi \sim N(0, \sigma^2)$, ele é dado por

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_{j(i)} + \xi_{(ij)k}$$

com $i = 1, 2, \dots, a$, $j = 1, 2, \dots, b$ e $k = 1, 2, \dots, n$.

Vale ressaltar que, como não é possível associar todos os níveis de A com os de B , não é possível incluir uma interação no modelo. Dessa forma, surge uma limitação deste tipo de experimento, a saber, a não possibilidade de incluir um termo de interação entre os fatores de interesse. Além disso, como b é constante para todos os possíveis valores de i , o desenho é considerado balanceado.

2.1.2 Análise de variância

A partir dessa abordagem, conforme apontado por Krzywinski et al. (2014), a variância introduzida em cada nível hierárquico é avaliada em relação ao nível abaixo dele. Isso é refletido na forma como é realizada a análise de variância, cuja representação está na Tabela 1, análoga à apresentada em Montgomery (2017). Nela, “SQ” indica a soma de quadrados, “gl”, os graus de liberdade e “MQ”, a média dos quadrados.

Tabela 1: Tabela ANOVA para desenhos encaixados com dois fatores

Fonte	SQ	gl	MQ	F	p-valor
A	SQ_A	a-1	$MQ_A = \frac{SQ_A}{a-1}$	$F_A = \frac{MQ_A}{MQ_B}$	p-valor
B (dado A)	SQ_B	a(b-1)	$MQ_B = \frac{SQ_B}{a(b-1)}$	$F_B = \frac{MQ_B}{MQ_E}$	p-valor
Erro	SQ_E	ab(n-1)	$MQ_E = \frac{SQ_E}{ab(n-1)}$	-	-
Total	SQ_T	abn-1	-	-	-

onde $SQ_A = bn \sum_{i=1}^a (\bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...})^2$, $SQ_B = n \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..})^2$, $SQ_E = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{ij.})^2$ e $SQ_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (y_{ijk} - \bar{y}_{...})^2$.

2.1.3 Diagnóstico

As suposições para a realização da análise de variância definida acima são de normalidade, homocedasticidade e independência. Dessa forma, é necessário fazer gráficos de normalidade dos resíduos, resíduos contra valores preditos e observações em diferentes níveis, conforme sugerido por Neter et al. (1996).

Caso haja suspeita da violação de alguma das suposições, pode-se realizar testes estatísticos. Nesse sentido, o Teste de Shapiro-Wilk pode ser empregado para verificar normalidade (Razali et al. (2011)), enquanto o Teste de Hartley pode ser utilizado para avaliar a existência de homocedasticidade (Ramachandran (1956)).

3 Descrição do problema

Manter a qualidade de um medicamento produzido é essencial para que ele possa ser comercializado e utilizado em larga escala. Dessa forma, é necessário que as características da produção sejam uniformes, independentemente de fornecedores, lotes, dentre outros fatores associados à matéria-prima utilizada.

Nesse sentido, o proprietário de uma rede farmacêutica em expansão está interessado na influência desses aspectos no produto final, o qual será comercializado e deve atender a determinadas especificações para seu bom funcionamento. No processo de aquisição de matéria-prima, há um fornecedor principal, do qual são comprados três lotes de insumos, sendo necessários quatro contêineres para a entrega de um lote.

A característica de interesse é medida a partir de um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, que é comparada com o valor de referência. Assim, o objetivo é analisar se existe influência de cada um desses dois fatores - lote ou contêiner - na resposta média, a qual é medida percentualmente em relação ao nível padrão.

3.1 Desenho do experimento

A partir do problema apresentado, inicialmente, nota-se que há um total de três lotes e doze contêineres que devem ser incluídos no desenho. Pode-se perceber que, apesar de serem semelhantes, contêineres de lotes diferentes são diferentes entre si, o que implica que não podem ser tratados como a mesma coisa.

Dessa forma, percebe-se a estrutura hierárquica do problema em questão: no primeiro nível, estão os lotes; no segundo, os contêineres. Assim, conclui-se que um desenho encaixado de dois níveis é uma boa abordagem, considerando as características mencionadas. Ademais, como o número de níveis dos fatores em cada combinação é sempre a mesma, pode-se utilizar um desenho balanceado.

Ademais, o proprietário afirmou que haviam recursos para realizar três medidas (réplicas) em cada contêiner. Assim, o experimento envolveu todos os níveis de todos os fatores - que foram numerados de um ao número total de níveis existentes -, além de três réplicas.

3.2 Dados coletados

Os dados coletados estão apresentados na Tabela 2. Eles foram obtidos por de la Parra e Rodriguez-Loaiza (2003), em um desenho bastante semelhante para o mesmo problema: as principais diferenças são que os dois fatores foram considerados aleatórios e serão considerados apenas os dados do primeiro fornecedor. A ordem das rodadas dos experimentos é completamente casual, de modo que se pode assumir independência das observações.

Tabela 2: Dados coletados				
Lote	Contêiner	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	1	100,3031	100,3839	99,8284
1	2	99,9092	99,9092	100,0506
1	3	100,0405	99,7880	100,1617
1	4	99,7577	99,7476	100,0203
2	5	100,4445	100,0304	100,3637
2	6	100,3637	100,2324	100,2829
2	7	100,4344	100,5960	100,4445
2	8	100,2223	100,0001	100,2223
3	9	100,1718	100,3738	100,3031
3	10	100,2021	100,4546	100,3738
3	11	100,2930	100,4647	100,1819
3	12	100,3233	100,1516	100,4748

Dessa forma, eles foram utilizados nas análises ao longo deste trabalho e as conclusões obtidas são diferentes do artigo original pela diferença de paradigmas acerca dos fatores, além de envolverem apenas um subconjunto dos dados.

4 Resultados

4.1 Análise descritiva

A Figura 1 apresenta o número de experimentos que retornaram cada medida, além de um boxplot delas. A partir dela, nota-se que não há valores discrepantes dos demais, além de existir uma concentração maior entre 100,15 e 100,5. Ademais, há uma aparente assimetria negativa nos dados, caracterizado pela maior frequência de valores menos elevados.

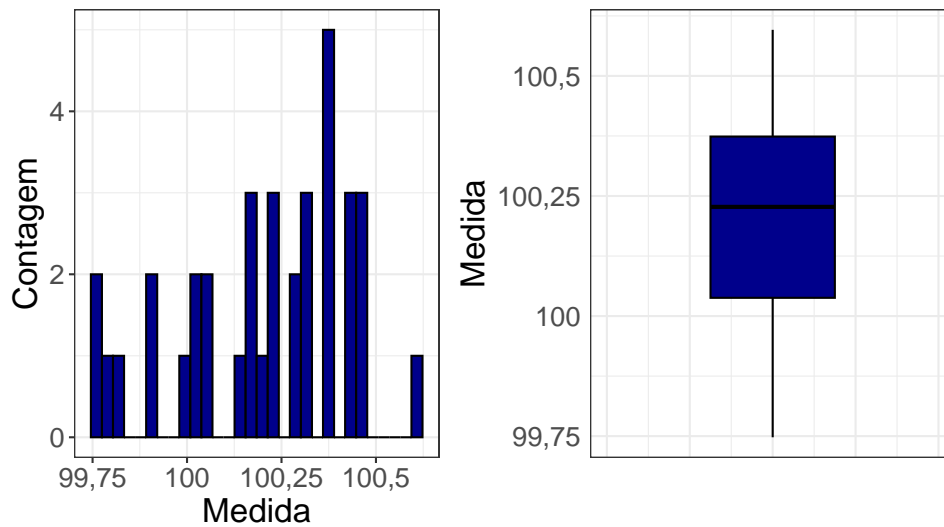


Figura 1: Distribuição das medidas

4.2 Análise exploratória

A Figura 2 mostra os boxplots das medidas para cada lote. Nota-se que eles apresentam variabilidades bastante próximas, mas as medidas do 1º lote aparentam ter uma média e quartis menores que as demais.

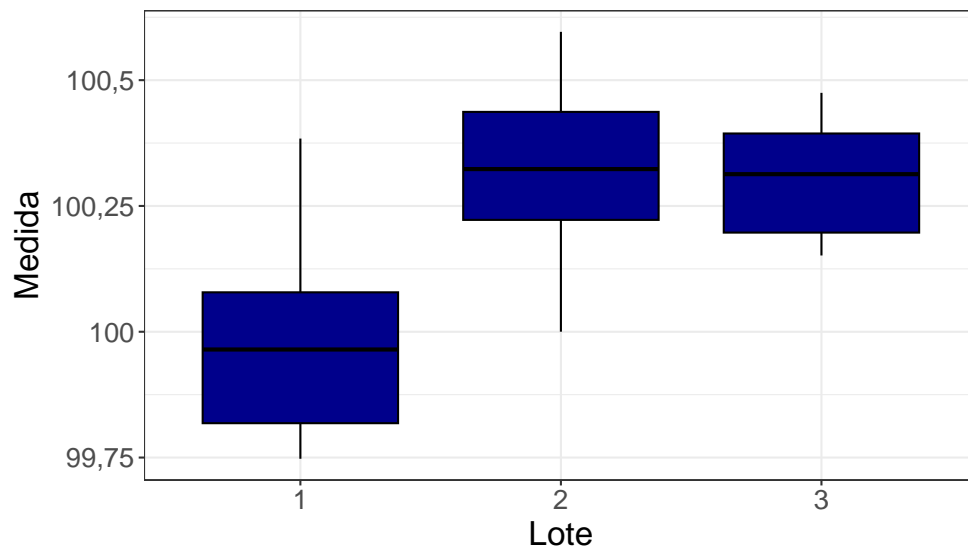


Figura 2: Medidas por lote

As medidas por contêiner estão apresentadas na Figura 3. A partir dela, nota-se que, no geral, as variâncias parecem iguais, enquanto as médias aparentam ser diferentes, sobretudo as dos contêineres 4 e 7.

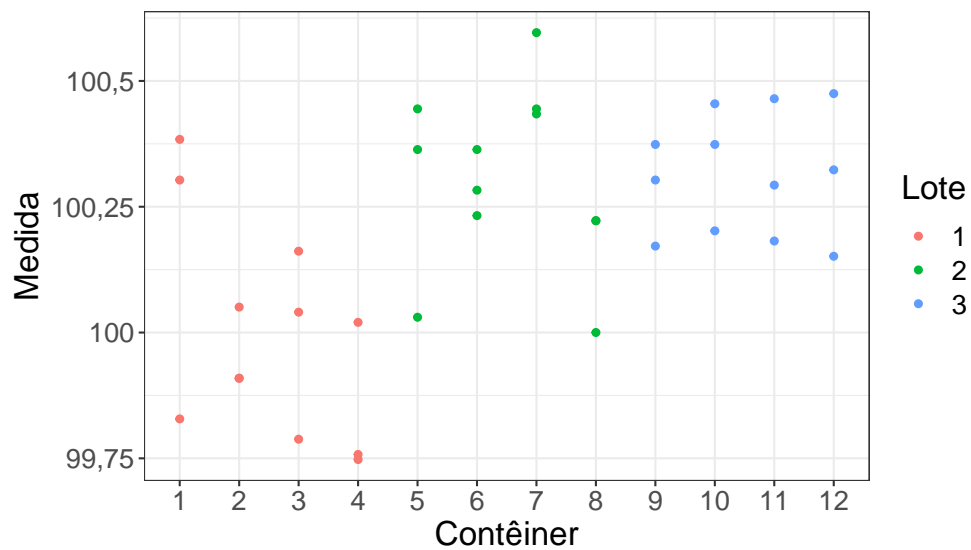


Figura 3: Medidas por contêiner

4.3 Análise inferencial

A fim de comparar as médias das medidas dos dois fatores, foi conduzida uma análise de variância. A Tabela 3 apresenta a ANOVA realizada, da qual se depreende que o único fator estatisticamente significativo é o lote, com um p-valor de 0,0049, bastante inferior ao do outro fator. Por isso, pode-se inferir, caso as suposições sejam válidas, que esse é o único dos fatores que explica bem a variabilidade dos dados e, portanto, influencia a média deles.

Tabela 3: Tabela ANOVA das medidas

Fonte	SQ	gl	MQ	F	p-valor
Lote	0,8	2	0,4	10,20	0,0049
Contêiner (dado lote)	0,35	9	0,04	1,54	0,1919
Erro	0,62	24	0,03	-	-
Total	1,77	35	-	-	-

4.3.1 Diagnóstico do modelo

O diagnóstico do modelo envolve verificar normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos. A Figura 4 apresenta o gráfico quantil-quantil dos resíduos contra os resíduos teóricos de uma distribuição normal. A partir dela, percebe-se um leve desvio nas caudas dos resíduos. Assim, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk, cujo p-valor foi de 0,3378 e, dessa forma, conclui-se que não há evidências para rejeitar a normalidade dos resíduos.

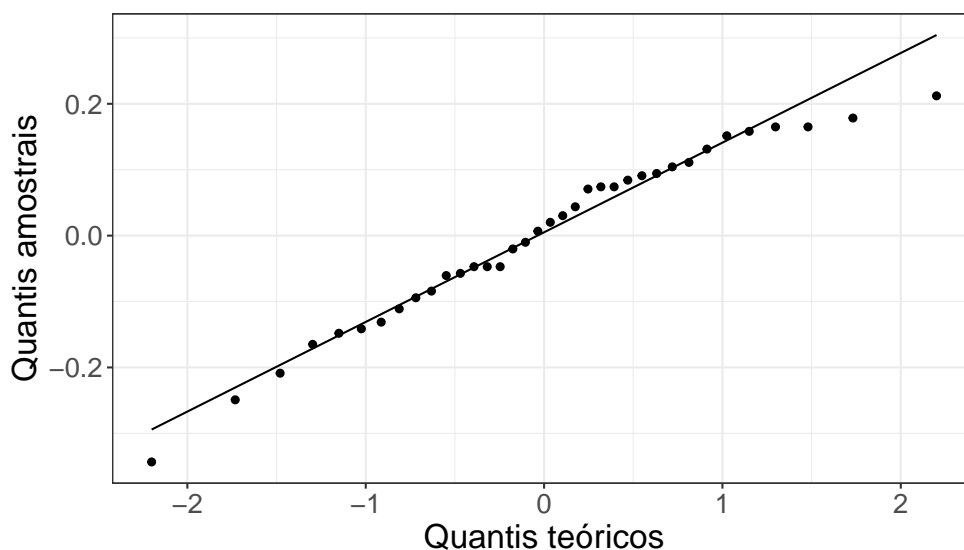


Figura 4: Gráfico quantil-quantil de normalidade dos resíduos

Já em relação à homoscedasticidade, a Figura 5 apresenta os resíduos por contêiner. A partir de sua análise, nota-se que a variância aparenta ser constante, apesar de que os do contêiner 1 pareçam ser mais dispersos. De fato, o teste de Hartley foi realizado e apontou um p-valor de 0,8035, logo, não há evidências para rejeitar a homoscedasticidade dos resíduos em relação aos diferentes contêineres.

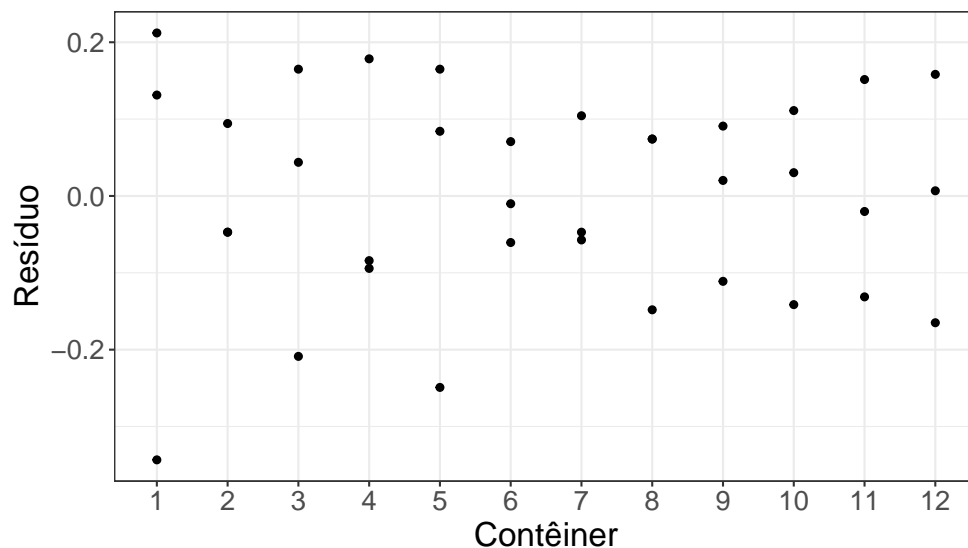


Figura 5: Medidas por contêiner

A Figura 6 apresenta os resíduos por lote. A partir de sua análise, nota-se que a variância é constante, sem nenhum grande desvio. De fato, o teste de Hartley foi realizado e apontou um p-valor de 0,441, logo, não há evidências para rejeitar a homoscedasticidade dos resíduos em relação aos diferentes lotes.

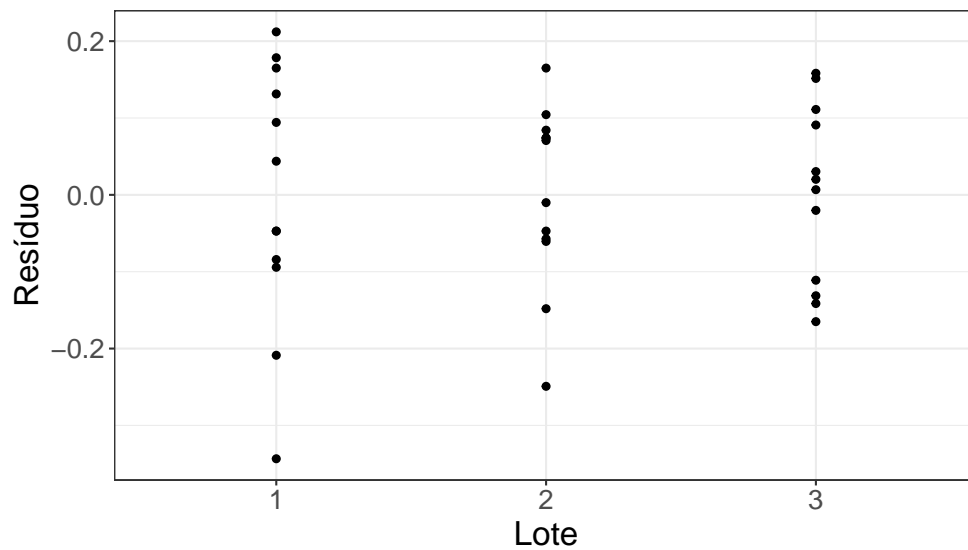


Figura 6: Medidas por lote

Por fim, é necessário analisar o gráfico de resíduos por valor ajustado, que está apresentado na Figura 7. A partir dela, nota-se que não há nenhuma tendência clara, de forma que a suposição de independência parece ser satisfeita. Dessa forma, como todas as suposições do modelo ANOVA são satisfeitas, suas conclusões podem ser consideradas válidas.

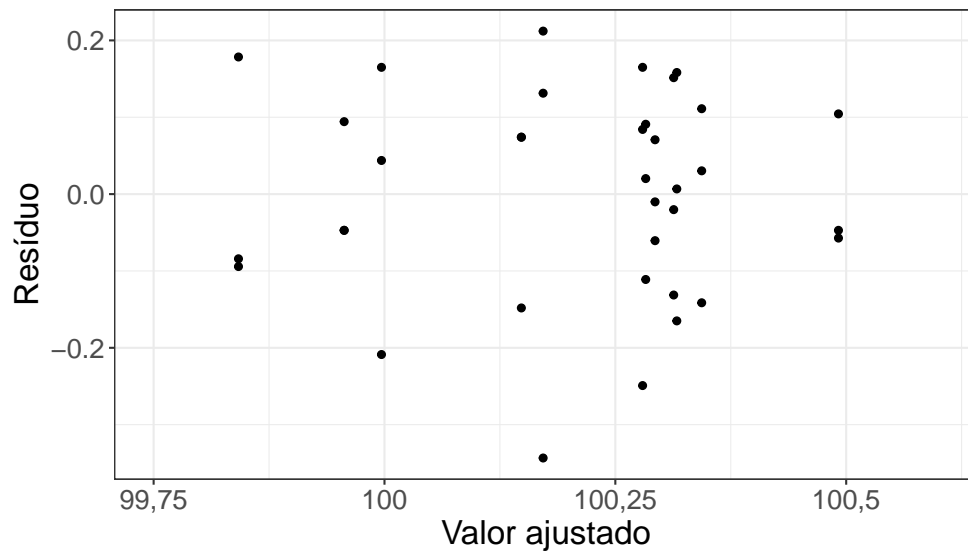


Figura 7: Medidas por contêiner

5 Limitações do experimento

A execução do experimento da maneira como foi planejado foi positiva no sentido de ter sido possível analisar a variabilidade proveniente de cada nível hierárquico separadamente. Dessa forma, foi possível identificar que não só há diferença relevante nas médias, mas também que a fonte dela são os lotes (e não contêineres). Assim, a abordagem utilizada torna mais assertiva a atuação dos especialistas a fim de corrigir esse problema.

Outra vantagem do experimento realizado foi o fato de terem sido realizadas três réplicas em cada contêiner, o que permitiu não só estimar o modelo completo, como estimar o erro com 24 graus de liberdade - o que, em tese, é uma boa aproximação para seu verdadeiro valor. Por isso, a ANOVA aplicada teve maior poder, o que torna mais confiáveis as conclusões obtidas.

Por outro lado, não foi utilizado nenhum fator que não possuísse relação hierárquica com os demais. Se isso tivesse sido realizado, seria executado um desenho encaixado-fatorial (Montgomery (2017)), o que possibilitaria o estudo de possíveis interações entre os fatores encaixados e os fatoriais. Consequentemente, poderiam ser detectadas novas componentes de variação que ajudariam a explicar a variabilidade dos dados.

Além disso, foram incluídos apenas dois fatores no desenho, o que pode ter significado a exclusão de outros componentes hierárquicos que poderiam ser relevantes, como fornecedores, filiais, dentre outros. Assim, é possível que a variabilidade que foi apontada como vinda dos lotes seja explicada por algo que não foi incluído no modelo, o que pode gerar conclusões equivocadas devidas ao mau planejamento do experimento.

A fim de melhorar o experimento, poderiam ser incluídos fatores relacionados à produção do medicamento, como temperatura, velocidade, entre outros, que potencialmente impactam na medida da característica de interesse. Ademais, caso hajam recursos disponíveis, seria interessante realizar réplicas - assim como foi feito neste experimento - de modo a melhorar as estimativas dos efeitos e dos erros.

6 Conclusão

Com base no exposto, nota-se que foi adotada uma abordagem condizente com o problema: como os contêineres de diferentes lotes não são idênticos entre si, era necessário utilizar um desenho hierárquico. Por isso, o uso de um desenho encaixado balanceado em dois estágios foi adequado, tendo em vista que possibilitou estudar adequadamente cada componente da variação.

As análises descritiva e exploratória apontavam que poderia existir uma diferença estatisticamente significativa da média das medidas entre os diferentes lotes, sobretudo pelo fato de a caixa do boxplot do primeiro deles não se sobrepor às dos demais. Ademais, foi possível observar que a variância entre lotes e entre os contêineres poderia ser assumida como constante, assim como a independência ser razoável, considerando o modo como o experimento foi planejado.

Em relação à análise de variância, ela evidenciou a falta de homogeneidade das médias das medidas com relação aos lotes, conforme havia sido evidenciado. Além disso, notou-se que não havia diferenças significativas entre os contêineres que não fossem explicadas pelo fator anterior. Assim, a conclusão de que há influência do lote na média das medidas pode ser considerada válida, dado que as suposições do modelo foram atendidas.

Referências

- de la Parra, M. G. e Rodriguez-Loaiza, P. (2003). Application of analysis of means (anom) to nested designs for improving the visualization and understanding of the sources of variation of chemical and pharmaceutical processes. *Quality Engineering*, 15(4):663–670.
- Krzywinski, M., Altman, N., e Blainey, P. (2014). Nested designs. *Nature Methods*, 11(10):977–979.
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John wiley & sons.
- Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Wasserman, W., et al. (1996). Applied linear statistical models.
- Ojima, Y. (1997). Control chart method for analyzing staggered nested data. In *Frontiers in Statistical Quality Control*, pages 241–252. Springer.
- Peng, J. (2004). *Nested Design*, pages 717–719.
- Ramachandran, K. V. (1956). On the tukey test for the equality of means and the hartley test for the equality of variances. *The Annals of Mathematical Statistics*, pages 825–831.
- Razali, N. M., Wah, Y. B., et al. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2(1):21–33.