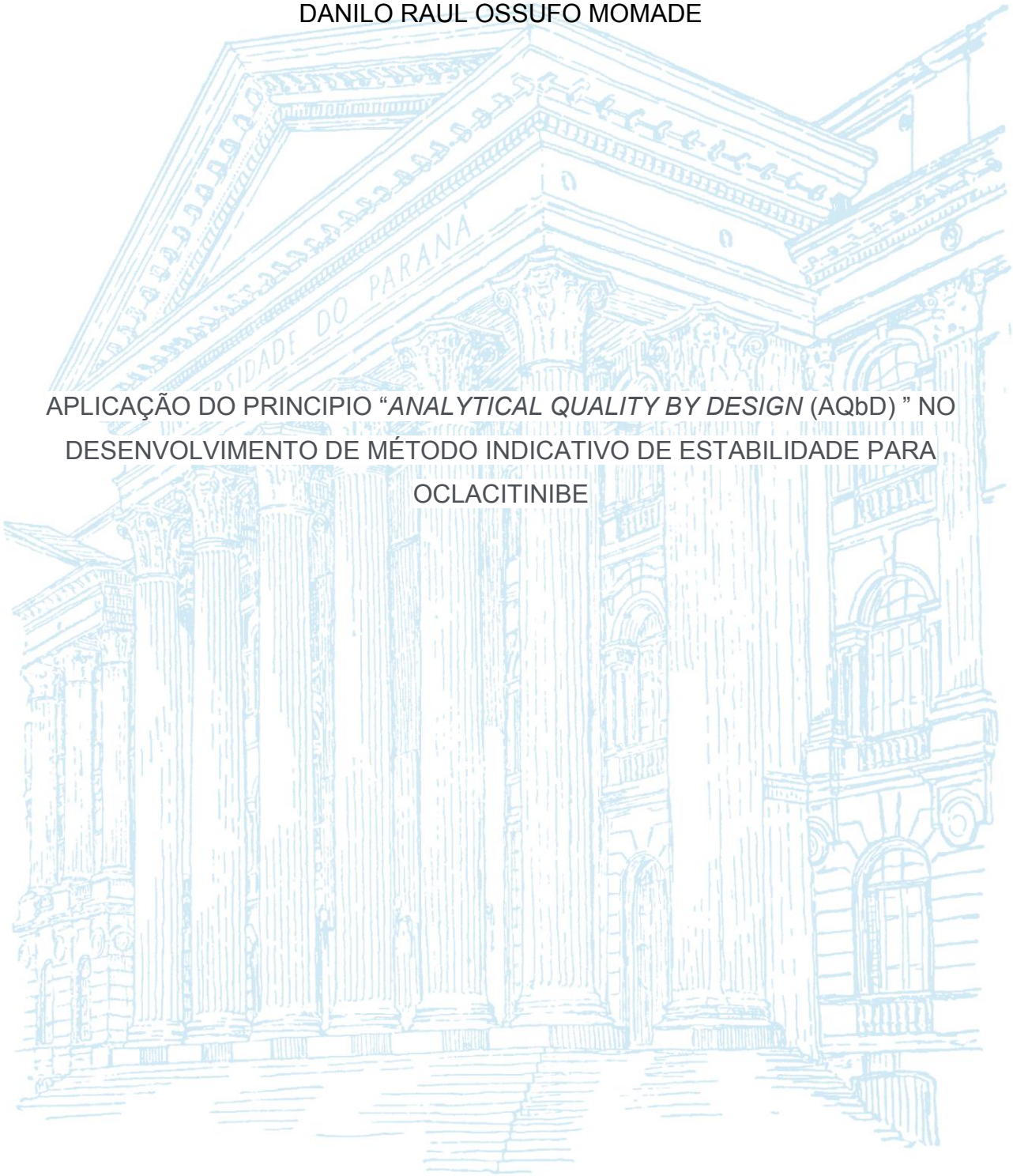
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANILO RAUL OSSUFO MOMADE



APLICAÇÃO DO PRINCIPIO "*ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN* (AQbD) " NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA OCLACITINIBE

CURITIBA

2021

DANILO RAUL OSSUFO MOMADE

APLICAÇÃO DO PRINCIPIO "*ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN* (AQbD) " NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA OCLACITINIBE

Dissertação ser apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de ciências da saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2021

Momade, Danilo Raul Ossufo
Aplicação do princípio "*Analytical Quality by Design* (AQbD)" no desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para Oclacitinibe [recurso eletrônico] / Danilo Raul Ossufo Momade – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná,2021

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

1. Dermatite atópica. 2. Cães. 3. Prurido. 4. Inflamação. 5. Cromatografialíquida. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1901

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DANILO RAÚL OSSUFO MOMADE** intitulada: **APLICAÇÃO DO PRINCIPIO ''ANALYTICAL QUALITY BY DESING (AQbD)" NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA OCLACITINIBE**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTAROLO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica 08/06/2021 17:46:56.0
ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 05/07/2021 09:02:56.0
RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 06/07/2021 12:30:53.0
MICHEL LEANDRO DE CAMPOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 96193
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 96193

Este trabalho dedico ao meu pequeno, querido e amado Daniel. Espero que um dia ele possa entender a minha ausência, nos momentos difíceis, quando mais precisou do meu apoio

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por guiar os meus passos no dia-a-dia, pela benção de colocar o professor Roberto Pontarolo no meu caminho, pela intermediação do Alexandre de Fatima Cobre, pessoas que contribuíram para que eu pudesse vir estudar em um país maravilhoso como Brasil e pela sua proteção nestes momentos difíceis de pandemia de Covid-19.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela orientação, aprendizado, paciência comigo e pela a oportunidade que me proporcionou de estudar em uma das melhores Universidades do Brasil, mesmo sem me conhecer, sem saber se eu tinha potencial para estudar nesta Universidade, se eu teria um bom desempenho, mesmo com todos esses riscos me ajudou. Desde que cheguei, sempre me apoiou, tanto financeiramente, como emocionalmente. Por isso, muito obrigado professor por tudo que fez e continua fazendo para mim.

Agradeço de forma especial ao amigo Alexandre de Fatima Cobre, irmão que não tive, mas que Deus me deu, muito obrigado mano, pelo apoio, força, incentivo, ensinamentos e pela amizade de longa data, sem restrição, mas sobretudo por me apresentar ao professor Roberto Pontarolo, pelo que falou de mim, porque foi por você que hoje estar aqui. Por isso, eu o considero irmão por tudo que fizeste por mim.

Agradeço aos meus colegas e amigos de pós-graduação do laboratório de centro de estudo em biofarmácia (CEB) e GEATS, Beatriz, Breno, Eric, Filipe, Gustavo, Josiane, Lívia, Rafaela, Raquel, Rebeca, Reginaldo, Vitor, Ana Maria pela amizade, apoio, partilha de informação e por tê-los conhecido, em especial o Allan Michael Junkert e a Mariana Fachi pelo empenho e por estarem sempre prontos a me ajudar, pela força nos momentos difíceis com palavras otimistas. O Allan Junkert foi o meu mentor cientifico, pois me auxiliou durante o desenvolvimento desse trabalho, mesmo em tempos da pandemia de Covid-19, sempre esteve pronto a ajudar. Por isso, sou muito grato ao Allan e Mariana.

Agradeço toda a família Universidade Federal do Paraná, em especial a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de estudar nesta conceituada Universidade, uma das melhores do Brasil.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

Agradeço aos meus queridos pais, senhora Saquina Abacar e Senhor Raul Momade, motivo da minha existência, por todas as batalhas que tiveram que ganhar para me ver estudando, sempre lembro o dia que venderam a única televisão que tinham, para conseguir pagar a matricula e as propinas de mensalidades no primeiro ano na Universidade Lúrio, tenho grande orgulho de vocês. Agradeço a vocês também pelas orações em meu favor, para que tudo desse certo na minha caminhada. Estar hoje aqui, também é graças a vocês por tudo que fizeram para mim, e continuam fazendo.

Agradeço a minha namorada Sara Bichote pelo companheirismo, amor, atenção, carinho, amizade e apoio emocional mesmo agente estando a uma distância de 10.909,1 Km um do outro. Agradeço também as minhas queridas irmãs Aida, Fadila e Gena pelo carinho, amizade, amor, apoio emocional e incentivos para continuar a estudar.

A Zilá e a sua família pelos momentos felizes que passamos juntos e também agradecer a família do Bernardo, pela hospedagem quando estivemos em sua casa em Santa Catarina (Balneário Camboriú) e pela atenção, carinho.

A todos, o meu muito obrigado!

Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.

Fernando Pessoa

RESUMO

A dermatite atópica canina é caracterizada pela exacerbação da inflamação e prurido e é comumente tratada com Oclacitinibe (OCLA), um inibidor seletivo das enzimas Janus quinases 1 e 2. Desenvolver o método indicativo de estabilidade é essencial para avaliar a estabilidade de OCLA. O objetivo com este trabalho foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade simples, rápido e sensível utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo diodo (CLAE-DAD) para determinação do OCLA, aplicando a abordagem Analytical quality by design (AQbD). Para isso, o OCLA foi exposto a diferentes condições de estresses (ácida, alcalina, neutra, fotolítica, oxidativa e térmica). O monitoramento dos produtos de degradação (PDs) foi feito por CLAE-DAD, avaliando o aparecimento de novos picos cromatográficos ou a modificação na intensidade do sinal cromatográfico do OCLA. Para desenvolver e otimizar o método foram conduzidas as seguintes etapas. Definição objetivos através de perfil do alvo analítico, identificação dos atributos e parâmetros críticos do método, análise de riscos foi feita através do digrama de Ishikawa e análise de modo e falha de efeitos, o desenho experimental foi realizado através do software Design Expert versão 11.1 e foi executado utilizando um cromatógrafo Agilent serie 1100. O método foi validado de conforme ANVISA e ICH. Apenas as condições de estresse ácida e fotolítica houve formação de PDs, sendo detectado oito PDs. Foram gerados três modelos sendo dois quadráticos e um cúbico com valores de ANOVA $p< 0,05$ e falta de ajuste $p> 0,05$, para pureza de OCLA, tempo de retenção do último pico e fator caudal de OCLA, respectivamente. Conforme o gráfico de overlay plot foram definidos os parâmetros cromatográficos como temperatura do forno de 41 ºC, taxa de fluxo de 1,2 $mL.min^{-1}$, a fase móvel constituída por água contendo 0,1% de ácido fórmico com pH de 2,5 (ajustado com 0,1% de ácido clorídrico), volume de injeção de 12 µL, utilizando eluição por gradiente (0.0 min 5% B; 0.0 - 6.7 min 27% B, 6.8 - 10 min 27%B, 10 min 5%B) de água contendo 0,1 % de ácido fórmico. Considerando fator caudal, resolução, eficiência cromatográfica. O método validado foi seletivo, sensível, linear ($r> 0,999$), preciso e exato ($DPR< 3$), com a recuperação encontrada entre 97,97 a 98,36%, respectivamente, e tendo como limite de detecção e de quantificação de 10,89 e 33,01 $µg.mL^{-1}$, respectivamente. A partir desses resultados, é possível afirmar que o método desenvolvido se mostrou adequado para a quantificação do OCLA na presença de seus excipientes e PDs.

Palavras-chave: Dermatite atópica. Cães. Prurido. Inflamação. Cromatografia líquida.

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is characterized by exacerbation of inflammation and pruritus and is commonly treated with Oclacitinib (OCLA), a selective inhibitor of the enzymes Janus kinases 1 and 2. Developing the stability-indicating method is essential to assess the stability of OCLA. The objective of this work was to develop and validate a simple, fast and sensitive indicative method of stability using high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) for the determination of OCLA, applying the Analytical quality by design (AQbD) approach. For this, OCLA was exposed to different stress conditions (acidic, alkaline, neutral, photolytic, oxidative and thermal). The monitoring of degradation products (DPs) was performed by HPLC-DAD, evaluating the appearance of new chromatographic peaks or the modification in the intensity of the OCLA chromatographic signal. To develop and optimize the method, the following steps were carried out. Objective definition through analytical target profile, identification of critical attributes and parameters of the method, risk analysis was performed using the Ishikawa diagram and mode and failure effects analysis, the experimental design was performed using Design Expert software version 11.1 and was performed using an Agilent 1100 series chromatograph. The method has been validated according to ANVISA and ICH. Only under acidic and photolytic stress conditions there was formation of PDs, being detected eight PDs. Three models were generated, two quadratic and one cubic with ANOVA values $p<0.05$ and lack of fit $p>0.05$, for OCLA purity, last peak retention time and OCLA flow rate, respectively. According to the overlay plot, the chromatographic parameters were defined as oven temperature of 41 ºC, flow rate of 1.2 $mL.min^{-1}$, the mobile phase consisting of water containing 0.1% formic acid with a pH of 2 .5 (adjusted with 0.1% hydrochloric acid), 12 µL injection volume, using gradient elution (0.0 min 5% B; 0.0 - 6.7 min 27% B, 6.8 - 10 min 27%B, 10 min 5%B) of water containing 0.1% formic acid. Considering flow rate, resolution, chromatographic efficiency. The validated method was selective, sensitive, linear ($r> 0.999$), precise and exact (RSD < 3), with recovery found between 97.97 to 98.36%, respectively, and having as detection and quantification limit of 10.89 and 33.01 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. From these results, it is possible to affirm that the developed method proved to be adequate for the quantification of OCLA in the presence of its excipients and DPs.

Keywords: Atopic dermatitis. Dogs. Pruritus. Inflammation. Liquid chromatography.

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – DESVIO PADRÃO RELATIVO.....48
EQUAÇÃO 2 – FORMULA DE EXATIDÃO.....49
EQUAÇÃO 3 – FORMULA DE LIMITE DE DETECÇÃO.....49
EQUAÇÃO 4 – FORMULA DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....50
EQUAÇÃO 5 – DETERMINAÇÃO DE LIMITE DE DETECÇÃO.....115
EQUAÇÃO 6 – DETERMINAÇÃO DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....115
EQUAÇÃO 7 – CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL DO LQ.....116
EQUAÇÃO 8 – PORCENTAGEM DO VALOR EXPERIMENTAL 116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA DERMATITE ATÓPICA CANINA.....27
FIGURA 2 – MECANISMO DE AÇÃO DE OCLACITINIBE.....33
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE OCLACITINIBE.....34
FIGURA 4 – ETAPAS DE ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN.....41
FIGURA 5 – ESTRUTURA DE OCLACITINIBE.....68
FIGURA 6 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE OCLACITINIBE OBTIDO POR VARREDURA NO UV-Vis NA FAIXA DE 200-400 nm.....69
FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DE OCLACITINIBE OBTIDO POR GRADIENTE EXPLORATÓRIO UTILIZANDO TAMPÃO FOSFATO E ACETONITRILA.....71
FIGURA 8 – SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS COM FASE MÓVEL DE ÁGUA CONTENDO ÁCIDO FÓRMICO E TAMPÃO FOSFATO.....72
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DE OCLA OBTIDO POR GRADIENTE UTILIZANDO ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FORMICO E ACETONITRILA.....72
FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DE OCLACITINIBE OBTIDO POR GRADIENTE UTILIZANDO ÁGUA E ACETONITRILA.....73
FIGURA 11 – SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS DE OCLACITINIBE EM 286 E 254 nm.....74
FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS DE OCLA OBTIDOS DOS ENSAIOS DEGRADAÇÃO DE FORÇADA.....75
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE ENSAIOS DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA, DURAÇÃO 36 HORAS.....76
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DE ENSAIOS DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA EM 42 HORAS.....77
FIGURA 15 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO FOTOLÍTICA.....78
FIGURA 16 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO FOTOLÍTICA ATÉ 24 HORAS.....79
FIGURA 17 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO DE ESTRESSE ÁCIDA.....80
FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS DE CONDIÇÕES DE RESISTENTES.....81

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS CONDIÇÕES ÁCIDA. FOTOLÍTICA E CONTROLE 83
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DA MISTURA DE ANMOSTRAS DE AMOSTRAS SUBMETIDAS CONDIÇÃO DE ESTRESSE ÁCIDA E FOTOLÍTICA 83
FIGURA 21 – APLICAÇÃO DO DIAGRAMA DE ISHIKAWA PARA DESCREVE A RELAÇÃO ENTRE CAUSA E EFEITO DOS CQAS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLACITINIBE 84
FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS DE OCLA E SEUS PDS OBTIDO POR ENSAIOS DE ESTRESSE 89
FIGURA 23 – GRÁFICO DE PARETO DAS VARIÁVEIS CONTINUAS 90
FIGURA 24 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO pH E TEMPERATURA DO FORNO 93
FIGURA 25 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO pH E TAXA DE FLUXO 94
FIGURA 26 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO TAXA DE FLUXO E TEMPERATURA DO FORNO 95
FIGURA 27 – GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL DE RESÍDUOS, DE VALORES PREVISTOS VERSUS ATUIAS 96
FIGURA 28 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 20 ºC 98
FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 32 ºC 99
FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 44 ºC 100
FIGURA 31 – DEFINIÇÃO DOS PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS OTIMOS ATRAVÉS DO GRAFICO DE OVERLAY PLOT 101
FIGURA 32 – CROMATOGRMA FINAL OTIMIZADO DE OCLACITINIBE E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO 102
FIGURA 33 – ESPECTRO DE UV DE ABSORBÂNCIA DE PADRÃO DE OCLACITINIBE PARA ENSAIO DE SELETIVIDADE 103
FIGURA 34 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE OCLACITINIBE E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO 104

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA CARACTERÍSTICO SOLUÇÃO PADÃO, PLACEBO E BRANCO.....105
FIGURA 36 – GRÁFICO DE TESTE DE NORMALIDADE DOS RESÍDUOS.....107
FIGURA 37 – GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL DOS RESÍDUOS 107
FIGURA 38 – RESÍDUOS PADRONIZADOS VERSUS VALOR AJUSTADO DA REGRESSÃO.....108
FIGURA 39 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OCLACITINIBE ENTRE 80–240 µg.mL-1 110
FIGURA 40 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A LINEARIDADE DO MÉTODO EM CINCOS PONTOS ENTRE 80–240 µg.mL^{-1} 111
FIGURA 41 – COMPARAÇÃO DA CURVA EM SOLUÇÃO E EM MATRIZ 80–240 µg.mL^{-1} 114

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE OCLACITINIBE.....33
QUADRO 2 – ELEMENTOS DE QUALITY BY DESIGN.....40
QUADRO 3 – ELEMETOS DO PERFIL DO ALVO ANALÍTICO.....42
QUADRO 4 – PERFIL DO ALVO ANALÍTICO PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-DAD.....59
QUADRO 5 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 60
QUADRO 6 – AVALIAÇÃO DE RISCO ATRAVES DA ANÁLISE DO MODO DE FALHA E EFEITO.....86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRADIENTE EXPLORATÓRIO PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE 55
TABELA 2 – GRADIENTE UTILIZADO PARA MONITORAR OS ENSAIOS DE DEGRADAÇOES 55
TABELA 3 – ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE OCLACITINIBE.....57
TABELA 4 – FATORIAL FRACIONÁRIO 61
TABELA 5 – FATORES CROMATOGRÁFICOS E VARIÁVEIS DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN.....62
TABELA 6 – PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCLACITINIBE 65
TABELA 7 – AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ.....67
TABELA 8 – ÁREA DE OCLACITINIBE ANTES E APÓS SER SUBMETIDO A CONDIÇÕES DE ESTRESSES FORÇADO 75
TABELA 9 – DEGRADAÇÃO DO OCLACITINIBE (%) NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....82
TABELA 10 – RESULTADOS DE VARIÁVEIS CATEGÓRICAS TESTADAS.....88
TABELA 11 – RESULTADOS DE p-VALOR DOS EFEITOS DE CADA COEFICIENTES.....90
TABELA 12 –RESULTADOS TESTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN.....92
TABELA 13 – EQUAÇÕES POLINOMINAIS PARA FATOR CAUDAL DE OCLA, PUREZA DE OCLA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO.....96
TABELA 14 – MODELO DE REGRESSÃO OBTIDO APLICANDO PROJETO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN.....97
TABELA 15 – CONFIRMAÇÃO DOS PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS PREVISTOS PELA REGIÃO OPERACIONAL DO DESENHO DO MÉTODO.....101
TABELA 16 – TESTE DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA 103
TABELA 17 – ÁREA PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OCLACITINIBE 106
TABELA 18 – ESTATÍSTICA UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DA REGRESSÃO LINEAR.....108
TABELA 19 – COEFICIENTES DE REGRESSÇAO LINEAR DE OCLACITINIBE .109

TABELA 20 – ANALISE DE VARIÂNCIA DE OCLACITINIBE.....109
TABELA 21 – RESUMO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO E REGRESSÃO LINEAR DE OCLACITINIBE 110
TABELA 22 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS DE PRECISÃO INTRA-DIA E INTERMEDIARIA DE OCLACITINIBE 113
TABELA 23 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS DE EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO DE OCLACITINIBE 113
TABELA 24 – RESULTADOS OBTIDOS PARA EFEITO MATRIZ 114
TABELA 25 – COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR DE OCLACITINIBE 115
TABELA 26 – CONFIRMAÇÃO DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO 116
TABELA 27 – RESULTADOS DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE-DAD 117

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS OU SIMBOLOS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de Variância (do inglês “Analysis of Variance”)

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AQbD – Qualidade analítica baseada por desenho (do inglês “ Analytical Quality by Design”)

AU – Unidade de absorbância (mAU para mil partes)

ATP – Perfil do alvo analítico (do inglês “Analytical Target Profile”)

CAS – Número de registro de identificação química (do inglês “Chemical Abstract Service”)

CI – Intervalo de confiança (do inglês “ Confidence Interval”)

CQA – Atributos críticos de qualidade (do inglês “Critical Quality Atributes”)

CV – Coeficiente de Variação

DoE – Desenho de experimentos (do inglês “Design Experiments”)

DAC – Dermatite atópica canina

DA – Dermatite atópica

DAD – Detector de arranjo de diodo

DP – Desvio padrão (do inglês “standard deviation”)

DPR – Desvio padrão relativo (do inglês “Relative standard deviation”)

DS – Espaço de desenho (do inglês “Design space”)

EMA – Agencia de Medicamentos Europeia (do inglês “European Medicines Agency”)

FDA – Agencia dos Estados Unidos de Administração de Medicamentos e Alimentícios (do inglês “Food and Drug Administration”)

FE – Fase Estacionária

FMEA – Análise de Modo e Efeito de Falha (do inglês “Failure Mode, Effects and Analysis”)

FM – Formula Molecular

FM* – Fase Móvel

JAKs – Enzima Janus Quinases

JAK – Janus Kinase

HPLC – Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (do inglês “Higt Performace Liquid Chromatography”)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização (do inglês “Internacional Conference on Harmonisation”)

IC – Inclinação da curva

IFA – Insumo farmacêutico ativo

IgE – Imunoglobina E

IL – Interleuciona

IL- 4 – Interleucina 4

IL-13 – Interleucina 13

INF – Interferon alfa

k’ – Fator de retenção

LD – Limite de detenção

LQ – Limite de quantificação

Log P – Coeficiente de partição óleo/água

MeOH – Metanol

MODR – Região do desenho operacional do método (do inglês “Method operacional design space”)

n – Número de Pratos Teóricos

OCLA – Oclacitinibe (do inglês “Oclacitinib”)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PD – Produto de degradação

PM – Peso Molecular

pH – Potencial Hidrogeniônico

PVDF – Membrana de fluoreto de polivinilideno (do inglês “polyvinylidene fluoride”)

QbD – Qualidade por Desenho (do inglês “Quality by Design”)

QToF – Detector do tipo quadrupolo acoplado há tempo de vôo (do inglês “quadrupole time of flight”)

R – Coeficiente de Correlação de Pearson

R^2 – Coeficiente de Determinação

R^* – Constante dos Gases

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

Rs – Resolução cromatográfica

SSTs – Teste de Adequação do sistema

T0 – Tempo morto

T^{*} – Temperatura

Tr – Tempo de retenção (do inglês “Retention time”)

TYK 2 – Tirosina kinase 2

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da América (do inglês “Unites states Pharmacpeia”)

UV – Ultravioleta

® – Marca Registrada

Vis – Visível

v/v – Volume/volume

RESUMO

1. INTRODUÇÃO 23
1.1. JUSTIFICATIVA 25
1.2. OBJETIVOS 25
1.2.1. Objetivo geral 25
1.2.2. Objetivos específicos.....25
2. REVISÃO DE LITERATURA 26
2.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....26
2.1.1. Patogênese da dermatite atópica canina 26
2.1.2. Manifestação clínica da dermatite atópica canina 27
2.1.3. Diagnóstico da dermatite atópica canina.....28
2.1.4. Opções terapêuticas da dermatite atópica canina.....28
2.1.4.1. Tratamentos básicos para dermatite atópica canina 28
2.1.4.1.1. Ciclosporina.....29
2.1.4.1.2. Glicocorticoides 29
2.1.4.1.3. Imunoterapia especifica para alergenos.....30
2.1.4.1. 4. Lokivetmabe 30
2.1.4.2. Terapias complementares para o tratamento da dermatite atópica canina ..30
2.1.4.2.1. Anti-histamínicos 30
2.1.4.2.2. Terapia tópica para dermatite atópica canina.....31
2.1.4.2.3. Ácidos graxos essenciais 31
2.1.4.3. Tratamento da dermatite atópica canina por Oclacitinibe.....32
2.1.3.4. Características físico-químicas de Oclacitinibe 33
2. ESTUDO DE ESTABILIDADE.....34
2.2.1. Tipos de estudos de estabilidade 35
2.2.1.1. Estudo de estabilidade acelerado 35
2.2.1.2. Estudo de estabilidade de longa duração.....35
2.2.1.3. Estudo de estabilidade de acompanhamento.....36
2.2.1.4. Estudo de degradação forçada 36
2.2.1.4.1. Tipos de estudo de degradação forçada 37
2.3. METODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE.....38
2.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN.....39

2.4.1. Descrição das ferramentas de Analytical quality by design 41
2.4.1.1. Perfil do alvo analítico 41
2.4.1.2. Atributos críticos de qualidade e parâmetros críticos do método 42
2.4.1.3. Análise de riscos 43
2.4.1.4. Planejamento experimental 43
2.4.1.5. Região operacional do desenho do método 44
2.4.1.6. Método tradicional versus Analytical quality by design 44
2.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 45
2.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 47
2.6.1. Seletividade e especificidade 47
2.6.2. Linearidade e faixa de trabalho 47
2.6.3. Precisão 48
2.6.4. Exatidão e recuperação 49
2.6.5. Limite de detecção 49
2.6.6. Limite de quantificação 50
2.6.7. Efeito matriz 50
2.6.8. Robustez 51
3. MATERIAL E MéTODOS 51
3.1. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA 51
3.2. EXCIPIENTES, REAGENTES, SOLVENTES E CONSUMÍVEIS 51
3.4. EQUIPAMENTOS E SOFTWARES 52
3.5. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE OCLACITINIBE e pH 53
3.6. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA DO OCLACITINIBE 53
3.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE 53
3.7.1. Preparo da fase móvel aquosa para método de partida 53
3.6.2. Preparação da solução estoque de Oclacitinibe 54
3.7.2. Solução de trabalho de Oclacitinibe 54
3.7.3. Matriz isenta de Oclacitinibe 54
3.7.4. Desenvolvimento do método de partida 54
3.8. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA 55
3.8.1. Degradação por Hidrólise 56
3.8.2. Degradação oxidativa 56
3.8.3. Degradação térmica seca 56
3.8.4. Degradação fotolítica 57

3.8. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN 58
3.8.1. Perfil do alvo analítico 58
3.8.2. Atributos críticos de qualidade e parâmetros críticos do método 59
3.8.3. Análise de riscos 59
3.8.4. Seleção das variáveis categóricas 60
3.8.5. Seleção das variáveis continuas 61
3.8.6. Planejamento experimental 62
3.8.7. Região operacional do desenho do método 63
3.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 64
3.9.1. Analise estatística 64
3.9.2. Teste de adequação do sistema 64
3.9.3. Seletividade 64
3.9.4. Linearidade e faixa de trabalho 65
3.9.5. Preparo da amostra para precisão, exatidão e efeito matriz 66
3.9.6. Precisão e exatidão 66
3.9.7. Efeito matriz 66
3.9.8. Limite de detecção e de quantificação 67
3.9.9. Robustez 67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
4.1. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE OCLA E DETERMINAÇÃO do pH 67
4.2. ANALISE DE OCLACITINIBE POR ESPECTROSCOPIA DE UV-Vis 68
4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE 69
4.3.1. Seleção da fase estacionária 69
4.3.2. Escolha da fase móvel 70
4.3.3. Desenvolvimento do método de partida por gradiente exploratório 70
4.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA 73
4.4.1. Estresse fotolítico 76
4.3.2. Estudo de degradação ácida 79
4.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DE OCLACITINIBE POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN 82
4.5.1. Perfil do alvo analítico e análise de riscos 84
4.5.2. Experimentos de triagem para seleção de variáveis categóricas 88
4.5.3. Experimentos para a seleção de variáveis continuas 89

4.5.4. Otimização do método aplicando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta 91
4.6.5. Região operacional do desenho do método 101
4.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 102
4.7.1. Teste de adequação do sistema cromatográfico 102
4.7.2. Seletividade 103
4.7.3. Linearidade e intervalo de trabalho 106
4.7.4: Precisão e exatidão 111
4.7.5. Efeito matriz 114
4.7.6. Limite de detecção e de quantificação 115
4.7.7. Robustez 116
5. CONCLUSÃO 118
REFERÊNCIAS 119

1. INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença crônica caracterizada pela exacerbação da inflamação e prurido na pele (CHERMPRAPAI et al., 2018; GUGLIANDOLO et al., 2020; LIPSCOMB; DE BELLIS, 2020; MARSELLA et al., 2020; TIMM et al., 2018). Existem diversos fatores que contribuem para o aparecimento da inflamação cutânea e o prurido, dentre estes, se destacam a predisposição genética, ectoparasitas, infecção bacteriana ou fúngica, hipersensibilidade alimentar e alérgenos ambientais que exacerbam esta doença (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

O objetivo principal no tratamento da DAC visa controlar e prevenir a inflamação e prurido recorrente (KIM H et al, 2015). O tratamento da DAC atualmente pode ser feito utilizando quatros opções terapêuticas licenciadas, glicocorticoides orais, ciclosporina oral, lokivetmabe injetável e OCLA oral (LIPSCOMB; DE BELLIS, 2020). O OCLA é um fármaco inibidor das enzimas Janus quinases. Este fármaco foi aprovado em 2013, pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a prevenir e tratar a inflamação e o prurido associado a dermatite alérgica (DA) e a DAC (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016). Este fármaco apresenta uma boa eficácia, tem ação rápida e apresenta um bom perfil de segurança no tratamento da DAC (LIPSCOMB; BELLIS, 2020; SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016). Os estudos de estabilidade visam fornecer evidências sobre a qualidade do fármaco, avaliando se há variação no teor e formação de PDs devido a influência de fatores externos, como a temperatura, humidade e das condições de armazenamento do fármaco (PATEL et al, 2013). Os ensaios de degradação forçada são fundamentais para desenvolver métodos indicativos de estabilidade, pois permitem compreender as características de estabilidade intrínseca de um fármaco. A realização desses ensaios em diferentes condições de estresses fornece uma visão sobre as vias de degradação e ajudam na identificação dos PDs. Estes estudos também mostram comportamento da estabilidade química da molécula. (KRISHNA et al., 2016 ; TATTERSALL et al., 2016). O desenvolvimento do método analítico conforme os princípios da *Analytical quality by design* – AQbD, é uma abordagem amplamente utilizada para desenvolver métodos analíticos de insumo farmacêutico ativo (IFA) para controle de qualidade dos fármacos (ZACHARIS; VASTARDI., 2018). AQbD baseia-se principalmente na identificação e minimização de fontes de maior variabilidade do sistema, através da triagem e

otimização do método, utilizando as variáveis de entrada de forma a garantir que o método a ser desenvolvido seja robusto (SYLVESTER et al., 2018; FUKUDA et al., 2018). O desempenho do método pode ser compreendido e melhorado, se necessário, uma estratégia de controle pode ser definida para gerenciar o risco e garantir que o método funcione conforme desejado quando validado e implantado.

1.1. JUSTIFICATIVA

Pelo fato do OCLA ser um fármaco recente, não encontramos na literatura método indicativo de estabilidade para o monitoramento do teor do fármaco na presença de seus PDs. Portanto, estudar o perfil de degradação de OCLA é relevante, uma vez que estes estudos visam garantir a segurança dos medicamentos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para o OCLA através da aplicação da Analytical quality by design.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a degradação do fármaco OCLA em diferentes condições (ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica e térmica);
- Desenvolver um método indicativo de estabilidade por CLAE–DAD utilizando o princípio da abordagem de qualidade analítica baseada no desenho;
- Validar o método analítico indicativo de estabilidade conforme a norma nacional (ANVISA) e internacional (ICH).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A dermatite atópica canina é uma doença crônica recorrente, inflamatória, pruriginosa com uma predisposição genética que acomete caninos e que apresenta características clinicas distintas (BHAGYA et al., 2021; CHERMPRAPAI; THENGCHAISRI, 2020; MARTINS et al., 2018). Em termos de origem, esta doença é complexa e multifatorial que envolve a uma desregulação imunológica que é mediada pela imunoglobina E (IgE) e células T. Estes fatores provocam o aparecimento da inflamação e prurido (EISENSCHENK, 2020). IgE é o principal mediador das reações de hipersensibilidade (CHERMPRAPAI; THENGCHAISRI, 2020). A DAC apresenta uma predisposição genética, defeitos da barreira cutânea, fatores ambientais e na sensibilização alérgica (KOURY et al., 2019; MARTINS et al., 2018). Esta doença por vezes pode aparecer espontaneamente e apresenta características imunológicas e clinicas parecidas com a dermatite atópica humana (BRADLEY et al., 2016; GUGLIANDOLO et al., 2020). Para além, de apresentar distribuição de estágios de vida do início da doença, com respostas imunitárias especificas para IgE e ter uma predisposição a dermatites bacterianas e folículos superficiais que aparecem com recorrência e de forma crônicas na pele (BRADLEY et al., 2016). A prevalência da DAC é estimada em 20-30% de toda população canina (BRÉMENT et al., 2019; ENCISO et al., 2019). Esta percentagem depende de fatores como, a raça, e a região geográfica.

2.1.1. Patogênese da dermatite atópica canina

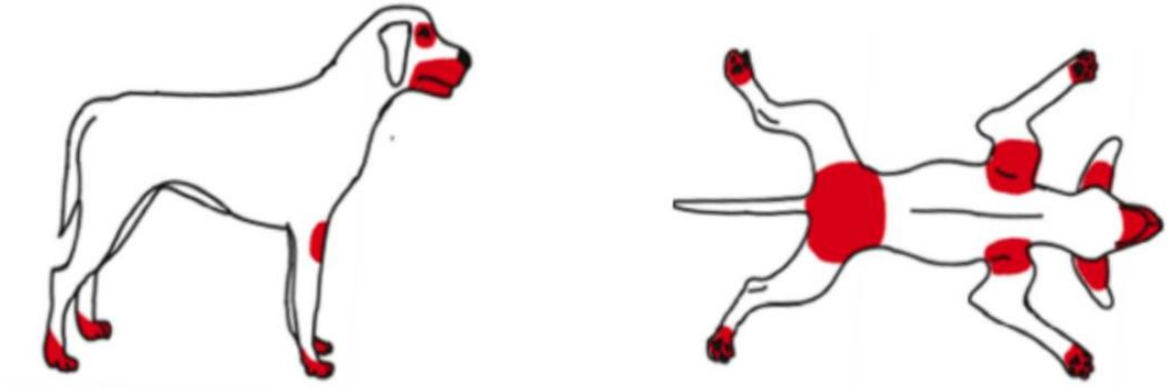
A patogênese da DAC é muito complexa e não é totalmente conhecida. Os estudos mostram que a predisposição genética e fatores ambientais, estejam envolvidos no desenvolvimento da doença (SANTORO, 2019). O que desencadeia uma susceptibilidade da disfunção epidérmica, aumenta a perda de água da pele, ocasionado um aumento potencial da penetração de alergenos como, ácaros do pó domésticos e patógenos ambientais (PATERSON, 2019b). Que são capazes levar ativação de células inflamatórias como, citocinas do tipo I, pro-inflamatória e quimiocinas que determinam o início da doença (BRADLEY et al., 2016; LIPSCOMB;

DE BELLIS, 2020; SANTORO, 2019; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Conforme as pesquisas atuais, dão conta que a presença de citocinas elevadas na pele como IL-4, IL-13 e IL-31 são responsáveis por provocarem a pruriginosidade em cães (A. J. GONZALES et al., 2014; SOUZA et al., 2018). As citocinas pró-inflamatórias são fatores que influenciam o prurido e os comportamentos pruriginosos do animal, provocando um ciclo vicioso de prurido que aumenta a potência das exacerbações das lesões e defeitos em função da barreira cutânea da pele (COSGROVE et al., 2013). A presença do prurido a alergia na pele do animal deixa o animal nervoso o que pode trazer consequências na qualidade de vida ao longo prazo (ANDREA J. GONZALES et al., 2016; COSGROVE et al., 2013).

2.1.2. Manifestação clínica da dermatite atópica canina

Clinicamente, a DAC é caracterizada por aparecimento de lesões crônicas e coceira intensa recorrente na pele, estas lesões afetam as regiões mas especificas como, a face, as axilas, as regiaos flexorais, pavilhão auricular, abdomem ventral, regiao inguinal e a parte interna das coxas FIGURA 1, (BÄUMER, 2020; FUKUYAMA et al., 2017; ROSKOSKI, 2016; SANTORO, 2019). Que afetam o bem-estar do animal, para além, de ser um problema financeiro recorrente para os proprietários em busca do tratamento do canino (CHERMPRAPAI, 2019). Portanto estudos mostram que mais de 70% dos caninos com DAC desenvolvem sinais clínicos da doença entre 1-3 anos de idade (CHERMPRAPAI, 2019; SANTORO, 2019).

FIGURA 1 – MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA DERMATITE ATÓPICA CANINA



FONTE: HENSEI et al, (2015).

2.1.3. Diagnóstico da dermatite atópica canina

O diagnóstico da dermatite atópica canina, baseia-se nas características clinicas comuns, que é feita através do histórico do canino (anamnese), que é direcionada ao proprietário do animal, e excluindo-se a possibilidade de outras doenças que apresentam características semelhantes que provocam prurigenicidade e inflamação (EISENSCHENK, 2020; KOURY et al., 2019). Em sequência faz-se o diagnóstico adicionais ao animal, submetendo - o a exames clínicos como, testes sorológicos com o objetivo de identificar a presença de IgE (EISENSCHENK, 2020; SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

2.1.4. Opções terapêuticas da dermatite atópica canina

O objetivo principal do tratamento da DAC é impedir a coceira e a inflamação de forma rápida, evitando as possíveis consequências que pode aparecer na pele do animal ocasionando bem-estar do canino (KIM H et al., 2015; NUTTALL, 2020). A seleção do tratamento é dependente da condição clínica do canino, o grau do prurido, a gravidade das lesões. (GEDON; MUELLER, 2018). O tratamento da DAC é classificado em dois grupos, tratamentos básicos que são essências em todos casos, com exceção, para que são considerados casos leves e complementares onde são incluídos medicamentos como, anti-histamínicos, tratamento tópico e ácidos graxos essências (PATERSON, 2019a). A literatura veterinária orienta a utilização de todos medicamentos básicos, para tratar a DAC como, ciclosporina, glicocorticoides, imunoterapia especifica para alergenos (ASIT), lokivetmabe injetável e OCLA. (GEDON; MUELLER, 2018; PATERSON, 2019a). A seleção da terapia depende muito da condição em que se encontra o canino, o grau do prurido e a gravidade das lesões, bem como evitar a presença de alérgenos ambientais (GEDON; MUELLER, 2018; KIM H et al., 2015; PATERSON, 2019a).

2.1.4.1. Tratamentos básicos para dermatite atópica canina

A terapia básica é essencial para tratar todos os casos de dermatite atópica canina, que incluem medicamentos como, ciclosporina, glicocorticoides, lokivetmabe,

imunoterapia especifica para alergenos e oclacitinibe (PATERSON, 2019a; PATERSON, 2019b).

2.1.4.1.1. Ciclosporina

A ciclosporina é um medicamento disponível e licenciado para tratar a DAC que está disponível na forma capsulas de gelatinas em 10, 25, 50 e 100 mg. É um polipeptídeo que é secretado e isolado a partir do fungo *Tolypocladium inflatum*, possui propriedades imunomoduladoras que previnem a rejeição do transplante do órgão em seres humanos e para tratar as doenças inflamatórias. (FORSYTHE; PATERSON, 2014; LICHTIGER et al, 1994). Sendo utilizado como um fármaco de amplo espectro para tratamentos de doenças dermatológicas, inflamatórias e autoimunes (PATERSON, 2019a). Apresenta uma eficácia comparada aos glicocorticoides, lokivetmabe (PATERSON, 2019a). Os efeitos adversos de ciclosporina são, diarreia e vômitos, hiperplasia nas gengivas e dermatite hiperplásica que aparecem durante o início do tratamento, onde estes efeitos adversos vão desaparecendo ao decorrer do tratamento (GEDON; MUELLER, 2018).

2.1.4.1.2. Glicocorticoides

Glicocorticoides são medicamentos que apresentam um efeito anti-inflamatório e anti-pruriginoso, são administrados por via sistêmica ou tópica é uma das terapias antigas, que ainda é utilizada para tratar a DAC (BÄUMER, 2020). A prednisona é o fármaco de escolha para terapia sistêmica a dosagem inicial é de 0,5-1 mg/kg. O tratamento com glicocorticoides está associado a efeitos adversos, que pode aparecer no decorrer do período de uso do fármaco como, pancreatite, a ulceração gastrintestinal, a perda de massa muscular, hiperadrenocorticismo iatrogênico, poliúria, polidipsia (CARVALHO et al., 2019; COSGROVE et al., 2013). Outro problema de utilizar os glicocorticoides para o tratar a DAC é a redução da sua eficácia com o decorrer do tempo provocando o aparecimento dos efeitos adversos (KIM H et al., 2015).

2.1.4.1.3. Imunoterapia especifica para alergenos

O tratamento com imunoterapia especifica para alergenos tem sido utilizado para tratar caninos e felinos com DAC há muitos anos. Esta terapia tem como característica o fato de ser a única que altera o mecanismos da patogênese da doença (DEBOER, 2017). No tratamento com imunoterapia especifica para alergenos a taxa e dose varia de conforme a via de administração (PATERSON, 2019a).

2.1.4.1. 4. Lokivetmabe

Com a descoberta da citocina interleuciona 31 (IL31), que é associada a sinalização do processo inflamatório e do prurido na dermatite atópica canina, nos últimos anos, foram lançadas novas opções terapêuticas para tratar DAC como, lokivetmabe e OCLA (PATERSON, 2019a). O lokivetmabe promove redução do prurido em comparação com ciclosporina, e é administrado com uma dosagem de 1 mg/kg injetável sendo bem tolerado. Podendo ocorrer reações de hipersensibilidade no local onde ocorreu a injeção (BÄUMER, 2020).

2.1.4.2. Terapias complementares para o tratamento da dermatite atópica canina

2.1.4.2.1. Anti-histamínicos

Medicamentos anti-histamínicos são classificados em duas classes de antagonistas de receptores de histamina (H1 e H2). Os antagonistas de receptores H1 são utilizados para tratar as doenças alérgicas mediadas por mastócitos e os antagonistas de receptores H2 são indicados para tratar de problemas gastrointestinais, provocada pelo o excesso do ácido gástrico (FARZAM K, 2021; PATERSON, 2019b). A sedação que é ocasionada por anti-histamínicos de primeira geração, pode ser benéfica em caninos com DAC, se o prurido aparecer no período de noite. Tanto clorfeniramina como cetirizina ambos farmacos antagonistas H1 ajudam a reduzir o prurido em canino alergicos. O tratamnto prescrito é de 4-8 mg por canino, no maximo deve ser administrada 0,5 mg/kg em um periodo entre 7-10 dias atraves da via oral (PATERSON, 2019b; SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016).

2.1.4.2.2. Terapia tópica para dermatite atópica canina

O tratamento tópico é utilizado como terapia isolada ou combinada com outras opções terapêuticas. Muitas terapias tópicas são seguras para a DAC com um mínimo de toxidade cutânea e sistêmica, a utilização deste tipo de terapia pode compensar a necessidade de utilizar fármacos sistêmicos, por vezes que são caros e com maior potencial de apresentar efeitos adversos (NUTTALL, 2020; PATERSON, 2019b). A terapia tópica pode ser utilizada em forma de shampoo, cremes, loções, géis, espumas com finalidade de hidratar, tratar, prevenir as infecções bacterianas e fúngicas secundarias na pele do canino (NUTTALL, 2020; PATERSON, 2019b).

2.1.4.2.3. Ácidos graxos essenciais

Os estudos publicados sobre o tratamento da DAC utilizando ácidos graxos essências mostraram que melhoram a coceira no canino, no entanto este tipo de tratamento é aconselhável ser utilizado em combinação com a terapia básica, para obter um efeito mais rápido e de maneira a restaurar a função da barreira cutânea da pele do canino, portanto utiliza-se ácido linoleico como ácido graxo (BÄUMER, 2020). Há ainda uma necessidade de se obter outros tratamentos alternativos para a DAC, que possa incluir estratégias de longo prazo para combater os fatores que podem agravar a doença como, infeções secundarias por bactérias e fungos (KIM H et al., 2015). Isto pelo fato de tratamentos como, ciclosporina, glicocorticoides, imunoterapia especifica para alergenos, apresentarem mais efeitos adversos, ao longo do tratamento e as terapias complementares ser utilizada para hidratar o canino. O OCLA é o fármaco que tem se mostrado mais eficaz para tratar a DAC, com uma ação rápida e com menos efeitos adversos, em comparação com outras opções terapêuticas essenciais (GEDON; MUELLER, 2018).

2.1.4.3. Tratamento da dermatite atópica canina por Oclacitinibe

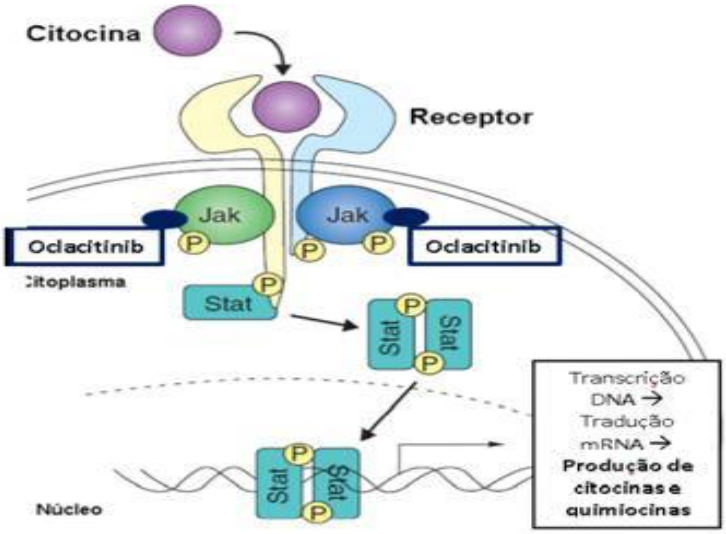
As citocinas são definidas como um conjunto de polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares de sinalização, que são secretados em duas fases como, a fase de ativação e fase efetora da imunidade, elas agem como, mensageiros, podendo afetar vários componentes celulares como desenvolvimento, diferenciação em células imunitárias, bem como em células não imunitárias. (JATIANI et al., 2010). A desregulação das citocinas pode levar a uma variedade muito grande de transformações celulares e moleculares, que podem mostrarem-se em sinais clínicos, como também em condições de doenças crônicas (GONZALES et al., 2014).

As enzimas Janus quinases (JAK) pertence a uma família de proteínas-tirosinas quinases, constituídas por quatros membros que são, JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina quinase 2 (TYK2), (JATIANI et al., 2010; HOWELL; KUO; SMITH, 2019; ROSKOSKI, 2016b). Estas enzimas se ligam de forma seletiva a diferentes cadeias de receptores no citoplasma. Depois de se ligar no receptor a citocina sofrem fosforilação em cada receptor, com a consequência disso é ativada a transcrição (STAT), depois de ocorrer a fosforilação, os STAT, se movem para o núcleo, onde ocorre a dimerização dos STAT. A ativação da via STAT é essencial para que ocorra a sinalização de citocinas inflamatórias como, interleucinais (ILs), interferons (IFNs) e fatores de crescimento (COLLARD et al., 2014; HAUGH; WATSON; ALAN MENTER, 2018; HOWELL; KUO; SMITH, 2019; ROSKOSKI, 2016b). Estas enzimas são principais alvos para tratar de doenças autoimunes, incluindo a DAC. A sinalização de receptores de citocinas como, as pró-inflamatórias (IL4, IL5, IL31), são associadas a patogênese da dermatite atópica canina (HAMAGUCHI et al., 2018; DAMSKY; KING, 2017).

O OCLA é um fármaco seletivo que bloqueia as enzimas Janus quinases 1 e 2 (HAUGH et al., 2018; ISABEL et al., 2021). Este fármaco foi aprovado em 2013 pela FDA para prevenir e tratar a inflamação e o prurido relacionado a dermatite alérgica e dermatite atópica canina (COLLARD et al., 2014). O OCLA é administrado em caninos em doses entre 0,4 a 0,6 mg/kg duas vezes ao dia durante duas semanas, em comparação com outas terapias como ciclosporina. O OCLA apresenta um efeito muito rápido e tem menos efeitos adversos (GEDON; MUELLER, 2018). Após a sua administração é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal, a meia vida no plasma estima-se ser inferior a 1 hora e sua biodisponibilidade é de 90% (AGÊNCIA

EUROPEIA DO MEDICAMENTO, 2013; PAPICH, 2016). A farmacocinética do fármaco não é interferida pela alimentação ou raça do canino, a forma de eliminação principal é a hepática, mas o fármaco pode também ser depurado em pequenas quantidades nos rins e vias biliares (PAPICH, 2016). Na FIGURA 2 é mostrado o mecanismo de ação de OCLA.

FIGURA 2 – MECANISMO DE AÇÃO DE OCLACITINIBE



FONTE: ADAPTADO DE YAMAOKA et al., (2004).

2.1.3.4. Características físico-químicas de Oclacitinibe

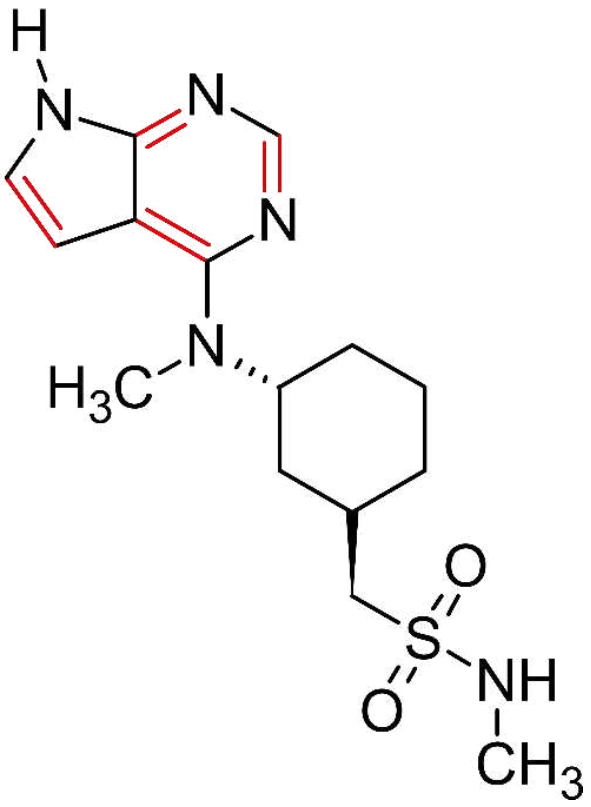
Quimicamente OCLA é um fármaco que pertence à classe dos compostos orgânicos aromáticos denominados como, Fenilnaftalenos e com o nome químico N–metil–1– [4–[metil (7H–pirrol [2,3–d] pirimidin–4–il) amino] ciclo–hexil] metanossulfonamida, sua propriedade físico-químicas principais estão resumidas no QUADRO 1. E na FIGURA 3 é mostrado a estrutura química de OCLA.

QUADRO 1 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE OCLACITINIBE

Peso molecular (PM)	337,4 $g.mol^{-1}$
Coeficiente de partição (Log P)	1,7
Formula molecular (FM)	$C_{15}H_{23}N_5O_2S$
Número de registro de identificação química (CAS)	1208319-26-9
Densidade	1,316 $g.cm^3$
Massa exata	337,157 Da
Massa monoisotópica	337,157 Da

NOTA: Da = Dalton; FONTE: NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2021).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE OCLACITINIBE



NOTA: EM VERMELHO FOI DESTACADO O CROMÓFORO. FONTE: O autor (2021).

2. ESTUDO DE ESTABILIDADE

A estabilidade de um insumo farmacêutico ativo (IFA) ou medicamento consiste na capacidade em manter as propriedades físico–químicas, microbiológicas, terapêuticas, dentro dos limites estabelecidos no prazo de validade do produto ou da substancia (WHO, 1996; KOMMANABOYINA, RHODES, 1999a; SILVA et al., 2009; JOSHI; NADRE, 2018). A estabilidade do IFA ou do medicamento é um atributo de qualidade importante e que deve ser assegurada de maneira a garantir a qualidade do produto para o paciente (JANZEN, 2016). A verificação da qualidade de um produto farmacêutico também se dá no monitoramento da formação de PDs, que podem indicar a redução do teor do IFA e podem ser responsáveis por ocorrência de efeitos adversos (SILVA et al., 2009). Os ensaios de estabilidade visam compreender os mecanismos envolvidos na formação de PDs do IFA ou do medicamento (SILVA et al., 2009). Por isso estudar a estabilidade dos fármacos é uma preocupação para os cientistas farmacêuticos e reguladores que gerenciam os IFA e medicamentos

(KOMMANABOYINA; RHODES, 1999b). A perda de estabilidade pode levar a diminuição da concentração, perda do efeito terapêutico e produção de impurezas no IFA ou no medicamento (ZHANG & HU, 2017). A resolução da diretoria colegiada (RDC) 318/2019 publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define os ensaios de estabilidade em quatro tipos: Ensaio de estabilidade acelerado, de longa duração, de acompanhamento e de degradação forçada (ANVISA, 2017 e 2019).

2.2.1. Tipos de estudos de estabilidade

2.2.1.1. Estudo de estabilidade acelerado

Estudo de estabilidade acelerado (EEA) aquele que é utilizado para avaliar as possíveis mudanças físico-químicas e microbiológicas de medicamentos e IFA, em condições adversas de temperatura e umidade, este tipo de estudo confirma a reprodutibilidade dos ensaios de degradação forçada (ANVISA, 2015 e 2017). EEA são estudos preditivos da vida útil de um fármaco, por isso, estudar o seu perfil de degradação é essencial para determinar o prazo de validade (ANVISA, 2015 e 2019; DATTA et al., 2014).

2.2.1.2. Estudo de estabilidade de longa duração

Ensaio de estabilidade de longa duração (EELD) também denominado de longo prazo são estudos realizados em tempo real utilizando temperatura ambiente entre 25-30 ºC e umidade relativa de 65 (HR) com objetivo de permitir a degradação significativa do IFA ou do medicamento nas condições de armazenamento recomendadas (DATTA et al., 2014). O objetivo do EELD é definir o prazo do reteste, confirmar os resultados do estudo do EEA, e recomendar as condições de armazenamento do IFA ou do medicamento (ANVISA, 2019; DATTA et al., 2014).

> Para desenvolver um método indicativo de estabilidade é necessário que o IFA ou medicamentos sejam expostos a condições de estresse extremas, mais enérgicas que aquelas realizadas no ensaio de estabilidade de longa duração, pois no EELD a degradação que é observada pode ser muito pequena o que possibilita identificar os seguintes problemas durante o monitoramento dos ensaios. Primeiro, se for observada uma redução leve no teor do fármaco, sem observar os PDs, é impossível saber se a leve redução

> foi provocada devido a uma variação intrínseca da análise ou se foi de fato degradação, ou o PD não é detectado. Segundo, se não for observada uma variação do teor do fármaco, é impossível afirmar se houve realmente uma degradação, pois pode ocorrer de não haver uma separação entre o pico cromatográfico do fármaco em análise e seus PDs (ANVISA, 2015).

Por isso, é importante realizar os ensaios de degradação, expondo IFA ou medicamento a condições de degradação forçada para gerar todos os PDs (ANVISA, 2015; JANZEN, 2016b). O perfil de degradação é um conjunto de PDs que são observados no IFA ou no medicamento quando estes são expostos a uma determinada condição de estresses como, temperatura, humidade, luz, calor, hidrolise ácida e alcalina (ANVISA, 2015).

2.2.1.3. Estudo de estabilidade de acompanhamento

O objetivo principal de ensaio de estabilidade de acompanhamento visa a confirmação e o monitoramento do prazo de validado de medicamentos ou do IFA, de conforme os resultados obtidos durante os EELD (ANVISA, 2019).

2.2.1.4. Estudo de degradação forçada

Para a condução dos ensaios de estabilidade, acelerado, de longa duração e de acompanhamento, necessário desenvolver um método analítico para quantificação do fármaco no produto farmacêutico que seja indicativo de estabilidade. E para prever os possíveis PDs, que possam ocorrer durante os ensaios de estabilidade, realiza-se o estudo de estresses (BLESSY et al., 2014). A degradação forçada consiste na exposição do IFA ou medicamento a diferentes condições de estresses, que possam permitir a formação de PDs, sendo o objetivo principal desse estudo obter o perfil de degradação do IFA ou medicamento, que pode ser utilizado para desenvolver o método indicativo de estabilidade (ANVISA, 2015, 2019; DA COSTA et al., 2018). Este tipo estudos são classificados em hidrolise (ácida, alcalina e neutra), estresse oxidativo, térmico e fotolítico, respectivamente (DA COSTA et al., 2018;JANZEN, 2016).

2.2.1.4.1. Tipos de estudo de degradação forçada

A reação de hidrolise é um processo que ocorre com muita frequência, em que envolve a decomposição de um determinado composto químico por uma reação em água . Estas reações ocorrem em um intervalo de pH, por meio de uma mudança de um grupo funcional que se transforma em íon (SHARMA, 2017). Esta reação ocorre quando após a protonação ou desprotonação, a molécula fornece um sítio de hidrólise. A hidrolise ácida e alcalina consiste num processo que envolve a exposição do IFA ou medicamento a agentes degradantes ácidos ou bases, que favoreçam a formação de PD (HUSAIN, 2016). A seleção do tipo e a concentração do agente degradante depende muito da estabilidade da substância em estudo, porém os agentes degradantes mais utilizados ácidos são ácidos clorídricos (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e básicos são hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH). Com uma concentração entre 0,1 a 1 M. Os estudos de estresses são iniciados utilizando temperatura ambiente, se não for observado o estresse da molécula, aumenta-se a temperatura na faixa entre 50 ºC a 70 ºC e o monitoramento dos ensaios de estresses não devem ultrapassar mais que sete dias (BLESSY et al., 2014; HUSAIN, 2016).

A degradação forçada oxidativa ocorre através do mecanismo de transferência de elétrons, formando cátions e aníons reativos. As substancias químicas como, aminas, fenóis e sulfetos são suscetíveis a sofrer a oxidação através de transferência de elétrons (BLESSY et al, 2014). Os agentes degradantes, mas utilizados para degradar os IFA ou medicamentos no estresse são: peroxido de hidrogênio (H_2O_2), íons metálicos como, Ferro III (Fe^{3+}) e Cobre II (Cu^{2+}), oxigênio e iniciadores do radical por azo compostos (azobisisobutironitrila - AIBN). A escolha da concentração e do agente oxidante, dependem muito da estrutura química do fármaco, as concentrações mais utilizadas para degradar o IFA variam na faixa de 0,1 a 3% que são adicionados a H_2O_2 em pH neutro, em temperatura ambiente ou na geladeira, durante um a até sete dias (BLESSY et al., 2014; HUSAIN, 2016; TATTERSALL et al., 2016).

O ensaio de estresse térmico é um processo que consiste na exposição do fármaco a temperaturas altas, O estresse térmico pode ser realizado por calor seco, as amostras solidas são expostas ao calor seco. Estes estudos são realizados em temperaturas entre 40 a 80 ºC por períodos de tempo curto. (BLESSY et al., 2014; HUSAIN, 2016).

O estudo de estabilidade fotolítico é realizada com objetivo de mostrar a extensão das reações quando se expõe o IFA ou medicamento a uma fonte de luz para observar se o fármaco sofre mudanças durante exposição à radiação ultravioleta-visível (UV-Vis), utilizando comprimento de onda no intervalo entre 300-800 nm (ROBERTO DE ALVARENGA JUNIOR; LAJARIM CARNEIRO, 2019). As amostras devem ser expostas a quantidade de luz para que possa ocorrer uma alteração da estrutura química da molécula de interesse, no mínimo 1,2 milhões de Klux de radiação visível e 200 W h/m^2 por radiação ultravioleta são utilizadas (BLESSY et al., 2014; HUSAIN, 2016).

2.3. METODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE

Os métodos indicativos de estabilidade (MIE) são procedimentos analíticos validados capazes de detectar ou quantificar todos os PDs que são importantes no perfil de degradação, quando o IFA ou medicamento são expostos a condições de estresses como, hidrolise (ácida, alcalina), oxidativo, térmico e fotolítico (ANVISA, 2015; JOSHI; NADRE, 2018; PATEL; JAIN; SHAH, 2013). Os MIE são utilizados para detectar ou quantificar a redução do teor do IFA ou do medicamento, que possa ocorre devido à degradação. Objetivo principal da MIE é monitorar os estudos de estabilidade, de forma a garantir a eficácia, segurança e qualidade do IFA ou medicamento (PAOLA et al., 2011). Os MIE deve ser capaz de medir com exatidão o teor do IFA ou o medicamento na presença dos PDs, dos excipientes e outras potenciais impurezas, sem nenhuma interferência (ANVISA, 2015; JOSHI; NADRE, 2018; MORAES DO CARMO et al, 2018). A tecnica analitica utilizada normalmente para determinação da estabilidade do farmaco é a CLAE ou cromatografia liquida de ultraperformaace (do ingles ultra-performace liquid chromatography – UPLC), a tecnica analitica utilizada deve ser capaz de , separar, detectar ou quantificar todos PD relacionados ao IFA ou medicamento em estudo (JOSHI; NADRE, 2018; TOME et al., 2019).

2.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN

A qualidade por desenho primeiramente foi idealizada nos anos 50 por Joseph Moses Juran, conhecido como pai da qualidade, Juran defendia que os processos de gestão giram à volta de três elementos: planejamento da qualidade, melhoria da qualidade e controle da qualidade (GUPTA, 2017; HAMID et al., 2019; KUMAR; RAJU; KUMAR, 2016). Em 2004 a Conferência Internacional de Harmonização (do inglês *International Conference on Harmonization*–ICH) e Agencia de Administração de Medicamentos e Alimentícios (do inglês *Food and Drug Administration*–FDA), aprendendo com outras indústrias introduziu qualidade por desenho (do inglês *Quality by Design*–QbD) através do programa piloto de revisão para o controle de fabricação em química, com objetivo de melhorar a qualidade e segurança dos medicamentos, de forma a garantir o estado desejado durante a fabricação farmacêutica, aplicando conhecimentos científicos e de engenharias (ZHANG; MAO, 2017).

A Conferência Internacional de Harmonização (ICH Q8) define QbD como um processo sistemático que inicia com a definição dos objetivos propostos e compreensão do produto em análise, com possibilidade de controlar o processo, utilizando uma ciência sólida e uma gestão de riscos de qualidade (JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, 2017; PERAMAN, 2015; RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015; TOME et al., 2019). As ferramentas de QbD são os seguintes: Perfil da qualidade do alvo do produto (do inglês *quality target product profile*–QTPP) que compreende as características de qualidade de um medicamento, atributos críticos de qualidade (do inglês *critical quality atributes*–CQAs), atributos de materiais críticos (do inglês *critical material atributes*–CMAs), parâmetros críticos do processo (do inglês *critical process parameters*–CPPs), avaliação de riscos, planejamento experimental (do inglês *design of experiment*–DoE), respectivamente. Os CPPs são parâmetros que são monitorados antes e durante o desenvolvimento da produção e que influenciam nas propriedades físico-químicas, microbiológicas, como aparência, impureza, rendimento do produto, aplicando a implementação do DoE (ZHANG; MAO, 2017; PATIL; DESHPANDE, 2019). Os objetivos de cada elemento de QbD, estão listadas no QUADRO 2.

QUADRO 2 – ELEMENTOS DE QUALITY BY DESIGN

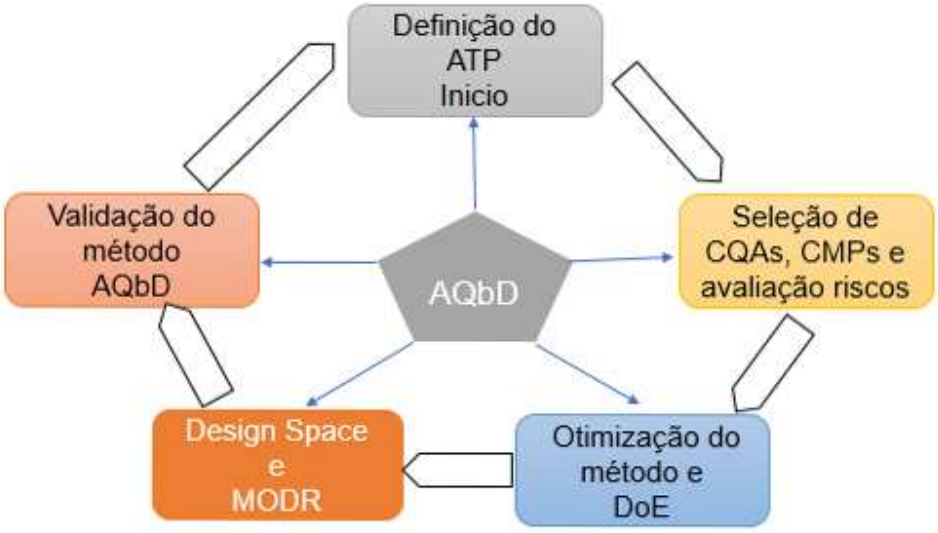
Elementos de QbD	Objetivos
QTPP	Forma farmacêutica, via de administração, dosagem, sistema de fechamento do recipiente.
CQAs	Propriedades físico-químicas, microbiológicas de um material de saída.
CMAs	Propriedades físico-químicas, microbiológicas de um material de entrada.
Avaliação de riscos	Serve para elencar as variáveis que influenciam nos CQAs, através dos CPPs, que por consequente melhoram o desempenho do proposito do estudo
DoE	Estudar a importância dos CQAs, CMAs, CPPs, e como afetam nos QTPP

NOTA: QTPP = PERFIL DA QUALIDADE DO PRODUTO DO ALVO, CQAs = ATRIBUTO CRÍTICOS DE QUALIDADE, CMAs = ATRIBUTOS DE MATERIAIS CRÍTICOS, CPPs = PARÂMETROS CRÍTICOS DO PROCESSO, DoE = PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL; FONTE: Adaptado de ZHANG; MAO, (2017).

Os princípios de QbD foram aplicados para desenvolver os métodos analíticos, originando termo denominado de QbD analítico – Qualidade analítica baseada no desenho (do inglês *Analytical Quality by Design* - AQbD), que compartilha alguns elementos de QbD como avaliação de riscos e planejamento experimental com objetivos semelhantes (CHAVES, 2017; GUPTA, 2017). Aplicação de AQbD ganhou força quando FDA e ICH implementaram QbD para controle da qualidade de fármacos (ZACHARIS; VASTARDI, 2018). Analytical quality by design baseia-se principalmente em uma pesquisa sistemática, para identificação e minimização de fontes de maior variabilidade do sistema, através da triagem e otimização do método, utilizando fatores de entrada, maneira a garantir que o método a ser desenvolvido seja robusto ao longo do ciclo de vida do produto (FUKUDA et al., 2018; SYLVESTER et al., 2018; RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015).

O desenvolvimento do método analítico conforme as estratégias de AQbD obedece às seguintes etapas: Definição do perfil do alvo analítico (do inglês *Analytical Target Profile*–ATP), identificação dos CQAs, identificação de parâmetros críticos do método (do inglês *critical parameters methods*–CMPs), avaliação de riscos do método, triagem, otimização do método através do planejamento experimental, criação da região do desenho operacional do método (do inglês *method operable design region*–MODR), a fase de validação do método, monitoramento do método e ATP (RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015; ZACHARIS; VASTARDI, 2018). Na FIGURA 4 é apresentado os elementos fundamentais da AQbD.

FIGURA 4 – ETAPAS DE ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN



NOTA: ATP = PERFIL DO ALVO ANALÍTICO, CQAs = ATRIBUTOS CRÍTICOS DE QUALIDADE, CMPS = PARÂMETROS CRÍTICOS DO MÉTODO, DoE = PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL, MODR = REGIÃO OPERACIONAL DO DESENHO DO MÉTODO; FONTE: ADAPTADO DE RAMAN; MALLU; BAPATU, (2015).

2.4.1. Descrição das ferramentas de Analytical quality by design

2.4.1.1. Perfil do alvo analítico

A primeira etapa para desenvolver o método analítico utilizando abordagens de AQbD, consiste na definição da finalidade do método pretendido (OTAŠEVIĆ et al., 2019; THANKOR; AMRUTKAR, 2017) Definindo o que o método deve medir, como medir e alcançar uma separação adequada dos analitos em estudo (GUPTA, 2017; LLOYD; BERGUM; WANG, 2020). Como a identificação dos analitos alvos (fármacos, IFA ou PDs), as suas propriedades físico-químicas, interação com excipientes, as suas especificações, a técnica de análise a ser aplicada para separação dos fármacos, IFA ou impurezas, quantificação ou identificação dos analitos da amostra, identificação dos requisitos do método por meio de ensaio ou perfil de impurezas (RAMAN et al., 2015). No QUADRO 3 estão listados os elementos de perfil do alvo analítico.

QUADRO 3 – ELEMETOS DO PERFIL DO ALVO ANALÍTICO

Elemento do ATP	Alvo	Justificativa
Alvo da amostra	IFA ou medicamento	Desenvolvimento de um método para um determinado IFA ou medicamento a ser estudo
Tipo de método	Fase normal ou fase reversa	De acordo com polaridade do IFA ou medicamento que influencia no método a ser estudo
Técnica de analise	CLAE, cromatografia gasosa, potenciômetro, UV – Vis	De acordo com a existência de um cromóforo, volatilidade, outras características estruturas e moleculares do método devem ser definidas
Características da amostra	Solida, liquida, suspensão, supositórios	Técnica de preparo da amostra, a necessidade de homogeneizar e utilizar sonicador, agitador mecânico, centrifuga, filtros, elementos que devem ser definidos
Padrão e preparação da amostra	Diluente	De acordo com a solubilidade, pKa do IFA ou medicamento
Aplicação do método	Doseamento, quantificação, desenvolvimento e separação de impurezas do IFA ou medicamento	Desenvolvimento de um método para doseamento, quantificação, métodos indicativos de estabilidade, separação de impurezas a partir de um IFA ou medicamento

NOTA: ATP = PERFIL DO ALVO ANALÍTICO, IFA = INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO, UV–VIS = ULTRAVIOLETA VISÍVEL, pKa = LOGARITMO NEGATIVO DO ÁCIDO.
FONTE: Adaptado de JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, (2017).

2.4.1.2. Atributos críticos de qualidade e parâmetros críticos do método

Os CQAs consistem na mensuração da qualidade as respostas analíticas a serem utilizadas. Pois, os CQAs são os parâmetros que indicam se o objetivo proposto foi contemplado (THANKOR; AMRUTKAR, 2017). Os CQAs podem ser definidos de acordo a técnica e objetivo proposto, alguns exemplos para técnica cromatográfica são os seguintes: tempo de corrida, fator caudal, resolução (Rs), tempo de retenção (tR), número de pratos teóricos (n), razão sinal ruído (S/R), fator de simetria, pureza do pico cromatográfico. Os CQAs não se limitam apenas aos propostos, podem existir mais, dependendo do que é definido como qualidade e da técnica analítica a ser utilizada (THANKOR; AMRUTKAR, 2017).

Os CMPs são variáveis de entradas que quando são submetidas no método, tem a capacidade de produzir alterações nos CQAs. Estes são divididos em: parâmetros de amostra em estudo, parâmetros de instrumentação e parâmetros de operação, em CLAE, são considerados como CMPs, preparação da amostra (pH da fase móvel aquosa, diluentes, composição da fase móvel), estrutura química da coluna, temperatura do forno, taxa de fluxo, modificadores orgânicos, a técnica de

análise (modo de eluição), detectores e volume de injeção (THANKOR; AMRUTKAR, 2017; RAMAN; MALLU; BAPATU, 2015). A definição dos CMPs e CQAs representam uma etapa fundamental, para desenvolver o método analítico através de abordagens de AQbD (OTAŠEVIĆ et al., 2019).

2.4.1.3. Análise de riscos

A avaliação de riscos é utilizada para identificar ou classificar as variáveis que sejam críticas para o método, pois, permitem identificar os CMPs que influenciam nos CQAs, uma vez, que a técnica de análise é selecionada (PERAMAN; BHADRAYA; REDDY, 2015; SAHU et al., 2018). Para desenvolver o método é importante avaliar os riscos que são associados a variabilidade da técnica de análise, como por exemplo durante a separação cromatografica a variação que pode ser observda na configuração do instrumento CLAE, na escolha da coluna cromatografica, na taxa de fluxo, no volume de injeção, manter controlado as condições ambientais, as características da amostra, o preparação da amostra, variações que possam ocorrer durante o desenvolvimento do método (PERAMAN; BHADRAYA; REDDY, 2015). Existem diferentes ferramentas de qualidade que são utilizadas para classificar ou definir o risco entre elas o diagrama de causa e efeito, analise de modo e efeito de falha (JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, 2017). Para definir os riscos em AQbD comumente é utilizado diagrama de causa e efeito conhecido como diagrama de Ishikawa (JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, 2017). A análise de modo e efeito de falha (do inglês *failure mode and effents analysis*–FMEA) uma ferramenta que é utilizada para classificar ou definir se um determinado produto pode falhar no resultado de um defeito, através de um instrumento especifico ou por erro do operador. O próprio pesquisador é que elenca os possíveis fatores que podem afetar o resultado final do desempenho de um determinado processo em análise ou estudo (PASSARELLA, 2018).

2.4.1.4. Planejamento experimental

Planejamento experimental é uma ferramenta que utiliza a estatística para projetar experimentos e fazer modelagem matemática com o intuito de avaliar os efeitos e as interações de variáveis de entrada e de respostas, de forma simultâneo,

com menor número de experimentos (TOME et al., 2019; FUKUDA et al., 2018; VEERUBHOTLA; WALKER, 2019). A seleção do melhor desenho experimental depende de fatores como: os objetivos definidos, número de variáveis independentes, a escolha da interação a ser estudada e a forma como validar os dados a serem estudados, aplicando a estatística. Os projetos experimentais são classificados em: projetos de triagem onde são estudadas uma grande variabilidade de variáveis categóricas como, fator de entrada, utilizando fatorial completo, fatorial fraccionário e projetos de otimização do método analítico onde são estudadas as variáveis continuas aplicando Box Behnken, central composto e fatorial de três níveis (FUKUDA et al., 2018; PERAMAN; BHADRAYA; REDDY, 2015).

2.4.1.5. Região operacional do desenho do método

Segundo a ICH Q8 R2 (04/08/2007) define a região operacional do desenho do método como a combinação de variáveis do processo que garantem a qualidade do método (FDA, 2009). O MODR é uma região multidimensional estabelecido dentro do espaço do desenho, através dos resultados obtidos no DoE através da computação estatística (JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, 2017). Onde o MODR utilizado para determinar a região mais robusta do método analítico e robustez do método deve ser avaliada dentro de MODR (TOL et al., 2020). E também selecionar os parâmetros de instrumentação do método e cromatográficos finais.

2.4.1.6. Método tradicional versus Analytical quality by design

O desenvolvimento do método por técnica tradicional baseia-se no método empírico, na qual envolve alteração dos parâmetro cromatográfico por vez, ocasionando gasto de tempo na tentativa e erro, enquanto outros parâmetros são fixados, para além, das variáveis em estudo não serem exploradas a sua interação na sua totalidade (CHAVES, 2017). Este tipo de abordagem está sujeito a um risco de erros, quando o método analítico for transferido para outro laboratório, podendo necessitar desenvolver um novo método analítico alternativo ou fazer a revalidação do método, o que aumenta o tempo e os custos (GUPTA, 2017). Em contrapartida atualmente para desenvolver e otimizar o método analítico, utiliza-se abordagens de AQbD, porque ajuda a compreender as variáveis que impactam para o desenvolver

de um método analítico, utilizando poucos experimentos, o que permite o método a ser desenvolvido seja rápido, robusto possibilitando de alterar as variáveis de qualidade dentro do MODR (JAYAGOPAL; SHIVASHANKAR, 2017).

2.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Atualmente a cromatografia liquida de alta eficiência do (*inglês high performance liquid chromatography* – HPLC) é uma das principais técnicas analíticas mais utilizadas em diversos laboratórios, para separação, identificação e para a quantificação de compostos no estado liquido ou gasoso, em um período de tempo curto, com uma alta eficiência e com maior detecção, através dela mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; ROUESSAC, 2015; SABIR et al., 2016).

A cromatografia é definida como uma técnica físico – química de separação dos componentes de uma mistura entre uma fase móvel e uma fase estacionaria (KUPIEC, 2004; ROUESSAC, 2015; WOLF, 2017; SATALOFF; JOHNS; KOST, 2011). A CLAE pode ser classificada em CLAE de fase reversa e CLAE de fase normal. A CLAE de fase reversa é composta por uma fase estacionaria não polar (hidrofóbica), e uma fase móvel de maior polaridade. A maior vantagem da CLAE de fase reversa é ter uma capacidade de retenção da maior parte dos compostos orgânicos apolares, considerando que grande parte dos fármacos são apolares, possibilitando a CLAE de fase reversa ser uma das técnicas analíticas mais aplicada para separação desses fármacos, devido à grande afinidade destes com a fase estacionaria (SABIR; MOLOY; BHASIN, 2016). Para além disso, a CLAE de fase reversa utiliza solventes menos tóxicos na fase móvel como, água, metanol, acetonitrila (AGRAHARI; BAJPAI; NANDA, 2013). O que não é observada na CLAE de fase normal que apresenta uma fase estacionaria polar e fase móvel apolar, possibilitando ter uma retenção inferior para a maior parte dos fármacos, mesmo estes fármacos tendo alguns grupos funcionais polares na sua estrutura química (THYE et al., 2011; SABIR; MOLOY; BHASIN, 2016).

O princípio básico que está envolvido na separação dos analitos de uma amostra ocorre devido a interação existente entre duas fases imiscível, na qual uma é denominada de fase estacionaria que é fixada dentro de uma coluna cromatográfica e a outra fase chamada fase móvel que se move através da fase estacionaria, a

separação ocorre devido a migração diferencial dos analitos da amostra que são distribuídos nas duas fases, onde os compostos que tem mais interação com fase a estacionaria se movimentam de forma lenta dentro da coluna cromatográfica, em relação aos componentes que tem menos interação com a fase estacionaria, ocorrendo a separação dos analitos da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; ROUESSAC, 2015).

O principal objtivo da analise cromatografica é a separação dos anlitos de interesse (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Em caso de uma separação ineficiente, durante o desenvolvimento do método analítico por CLAE, os parâmetros que são alterados são a concentração dos aditivos da fase móvel aquosa, a composição da fase móvel, pH, taxa de fluxo, coluna cromatográfica (fase estacionaria, tamanho de partícula, diâmetro, comprimento), temperatura do forno (ROUESSAC, 2015). A separacao dos analitos da amostra em CLAE é realizada atraves da eluição, por modo isocratico ou gradiente. A separação isocratica a força cromatografica (fase movel) permanece constante, durante analise dos analitos da amostra, em contrapartida a eluição por gradiente a fase movel é alterada ao decorrer da analise dos analitos da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). As amostras complexas como, vegetais, bionaliticos, amostras com muitos analitos que são eluidas por modo gradiente e a separação por modo isocratico é utilizado em amostras de analitos simples (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os detectores são responsáveis em detectar a presença de um composto e gerar o sinal eletrônico a um dispositivo de armazenamento de dados em forma de cromatogramas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; KUPIEC, 2004; ROUESSAC, 2015). Em CLAE existem vários tipos de detectores que são utilizados para gerar o sinal, podendo ser detectores espectrofotométricos que operam no comprimento de onda variável, que são arranjo de diodo (DAD), ultravioleta (UV–Vis) outros como, fluorescência, índice de refração (KUPIEC, 2004). A seleção do detector depende da estrutura química do analito em estudo. A fase móvel deve ser compatível com o detector a ser utilizado durante analise e não pode para absorver no comprimento de onda em estudo. A viscosidade da fase móvel impacta no efeito de transferência de massas dos analitos entre a fase estacionaria e a fase móvel, quanto menos viscosidade a fase móvel possuir, melhor o desempenho na separação, o que garante o aumento da velocidade de transferência de massa, da permeabilidade da fase estacionária e o que diminui a pressão, evitando o vazamento e o desgaste da fase

estacionária (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; ROUESSAC, 2015). O cromatograma é uma representação gráfica da quantidade de amostra que chega no detector (após ter saído da fase estacionária), conforme o tempo (ROUESSAC, 2015).

2.6. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação analítica é um procedimento continuo que permite comprovar a confiabilidade dos resultados do desenvolvimento do método, de maneira a confirmar e fornecer evidencias objetivas, se um procedimento analítico é adequado para o propósito pretendido (ANVISA, 2017b: SERVICES, 2015). A validação analitica deve garantir que os resultados experimentais do método atendam às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2017b). Os parâmetros que são avaliados na validação de um método analítico conforme as diretrizes da ANVISA e ICH são: Seletividade (especificidade), linearidade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (ANVISA 2017b; TAMBE; MANKAR; DIGHE, 2020; SERVICES, 2015).

2.6.1. Seletividade e especificidade

A seletividade é o primeiro passo para desenvolver e validar um método analítico. A seletividade consiste na capacidade de diferenciar o analito de interesse, de forma inequívoca na presença de impurezas, degradantes, matriz, diluentes da fase móvel (TAMBE et al., 2020). Dessa forma no método analítico, caso a seletividade não seja atendida, pode comprometer os outros parâmetros de validação. Em contrapartida a especificidade consiste na capacidade de medir apenas o analito de interesse na presença de outros componentes (RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020).

2.6.2. Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade consiste na capacidade de um método analítico, em obter resultados que sejam diretamente proporcionais a concentração do analito da amostra em estudo, em um intervalo estabelecido (ANVISA 2017b; RAO; GOYAL, 2016). Os parâmetros que são utilizados para avaliação da curva de calibração são: normalidade dos resíduos, independência residual, homocedasticidade dos resíduos, coeficiente

de correlação de Pearson, coeficiente de determinação, significância dos coeficientes (angular e linear), avaliação visual do gráfico que mostra os sinais, conforme a concentração do analito. Para avaliar a linearidade de um método analito, no mínimo devem ser avaliados cinco pontos em diferentes concentração em triplicatas (ANVISA 2017b; RAPOSO; IBELLI-BIANCO, 2020; TAMBE; MANKAR; DIGHE, 2020).

2.6.3. Precisão

A precisão consiste na capacidade de um método analítico em reproduzir resultados próximos, conforme no grau de dispersão entre uma serie de medições. (ANVISA, 2017b) A precisão é determinada através da avaliação de números de amostras repetidamente, e a pois isso avalia-se estatisticamente os resultados obtidos (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004).

A precisão de um método analítico é demostrada através da dispersão dos resultados obtidos, onde se calcula o coeficiente de variação (CV) ou o desvio padrão relativo (DPR) das medições é calculado através da equação (1), (ANVISA, 2017b).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \qquad (1)$$

Onde: DPR = Desvio padrão relativo; DP = Desvio padrão; CMD = Concentração média determinada.

A precisão de um método analítico é demostrada através de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, 2017b; RAO; GOYAL, 2016). A repetibilidade (precisão intra-dia) é avaliada nas mesmas condições de operações e em menor tempo de espaço. Em contrapartida a precisão intermediaria (precisão inter-dia) é avaliada em diferentes dias, por diferentes analistas e/ou, diferentes equipamentos e a reprodutibilidade é avaliada através da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes, e é utilizado para a padronização do método analítico. (ANVISA, 2017b; RAO; GOYAL, 2016).

2.6.4. Exatidão e recuperação

Exatidão consiste na capacidade de um procedimento analítico em expressar o grau de proximidade ou concordância entre os resultados experimentais em estudo em relação ao valor que se considera aceito como verdadeiro (ANVISA 2017b; METHODS, 1994; ICH 2005). A exatidão normalmente é verificada através da determinação da concentração em três níveis, baixa (80%), média (100%) e alta (120%), devem ser realizadas no mínimo triplicatas para cada ponto (TAMBE; MANKAR; DIGHE, 2020).

A recuperação é definida como a eficiência do um processo extrativo e que é calculado em porcentagem do analito de uma amostra (PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015). A recuperação esperada de um método analítico, é dependente da concentração do analito e da matriz da amostra em estudo (ANVISA 2017b). E a recuperação desejável deve estar próximo de 100% (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004; RAPOSO FRANCISCO, BIANCO CAROLINA, 2020; PERIS-VICENTE; ESTEVE-ROMERO; CARDA-BROCH, 2015). A exatidão é calculada através da equação (2) que mostra a relação entre a porcentagem de recuperação e a concentração média determinada experimentalmente e concentração teórica correspondente (ANVISA, 2017b).

$$Exatidão = \frac{CME}{CT} \times 100 \qquad (2)$$

CME = Concentração média experimental; CT = Concentração teórica.

2.6.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) consiste na menor concentração de uma amostra, que é detectada, mas que não precisa ser necessariamente quantificada, como um valor verdadeiro (ANVISA 2017b; SHABIR, 2003). O LD equação (3), normalmente que é avaliado pelo aspecto visual, utilizando a relação sinal-ruído da linha de base de um sinal cromatográfico, onde a partir dessa equação faz-se o cálculo teórico e o resultado é testado na realidade de forma a confirmar a reprodutividade do sinal ruído se é desejado para estimar LD (TAMBE; MANKAR; DIGNE, 2020).

$$LD = \frac{3{,}3 \times DP\ (Intercepto)}{IC} \qquad (3)$$

Onde: DP corresponde a desvio padrão da resposta analítica, IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6.6. Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) consiste na menor quantidade de concentração de um analito, em uma amostra que é quantificada, com precisão e exatidão em condições operacionais aceitável do método analítico desenvolvido (ANIVISA 166/17; SHABIR, 2003). O LQ é um parâmetro utilizados em ensaios quantitativos com baixos níveis de compostos em matrizes de amostra, normalmente aplicado para a quantificação de impurezas ou PDs. Também o LQ pode ser avaliado pela relação sinal ruído, desvio padrão da resposta e inclinação da curva.

Uma relação de sinal-ruído entre 10 normalmente é considerada aceitável para estimar o LQ (ANVISA 2017b; METHODS, 1994; TAMBE; MANKAR; DIGHE, 2020). A expressão matemática para calcular o LQ é apresentada na equação (4).

$$LQ = \frac{10 \times DP\ (Intercepto)}{IC} \qquad (4)$$

Onde, DP corresponde a desvio padrão da resposta analítica, IC é a inclinação da curva de calibração.

A confirmação do nível LQ normalmente é realizado através da injeção de padrões e os valores de DPR percentuais aceitável, não deve ser mais que 10% (TAMBE et al., 2020).

2.6.7. Efeito matriz

O efeito matriz é demostrado através da comparação existente entre os coeficientes angulares das curvas de calibração de amostra em solução e amostra fortificada com excipientes. As retas paralelas das duas curvas de calibração indicam a ausência de interferentes dos componentes da matriz. Os resultados de efeito matriz devem ser comprovados através de um teste estatístico com valor p> 0,05 (ANVISA, 2017b).

2.6.8. Robustez

A robustez consiste na capacidade do método analítico de se manter intacto (não sofrer alterações) quando são feitas pequenas variações, que são introduzidas de forma deliberada nas variáveis de entrada do método. Variáveis de adequação de sistema cromatográfico são estudadas para avaliar a robustez do método analítico (TECH; SAHU, 2017). As diretrizes da ANVISA e da ICH recomendam que a robustez de um método analítico deva ser avaliada no desenvolvimento ou durante o início da validação (ANVISA 2017b; TECH; SAHU, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA

Neste trabalho utilizou-se como substância química de referência (padrão) o fármaco OCLA, que foi adquirido (Nanjing Kaimubo, China) com número de lote COM-20190131; com pureza de 99,06%, Validade 30/01/2021, com aspecto de pó branco ou quase branco.

3.2. EXCIPIENTES, REAGENTES, SOLVENTES E CONSUMÍVEIS

Excipientes: Estearato de magnésio da Valdequímica (São Paulo, SP); dióxido de silício coloidal (Aerosil) da Genix (Anápolis, Brasil); Lauril sulfato de sódio da Via Farma (São Paulo, Brasil), Talco da Pharma Nostra (Rio de Janeiro, Brasil).

Reagentes e solventes: acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau CLAE (J.T.Baker®, New Jersey, EUA), ácido fórmico e formiato de amônio (Aldrich, Missouri, EUA), peróxido de hidrogênio 30% (Labsynth, São Paulo, Brasil), água ultra purificada obtida através do sistema de purificação Milli-Q® Gradient A10-Millipore (Milford, EUA).

Consumíveis: colunas cromatográficas tipo: XBridge™ C8 (4.6 mm × 150 mm, 5.0 µm) com o número de lote 0104 e ZORBAX Eclipse XDB - C18 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm) com o número de lote B121555.

Filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,22 µm e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA), vial, tubos falcon, Seringa descartável de 3 a 5 mL.

3.4. EQUIPAMENTOS E SOFTWARES

Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA);

Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);

Espectrofotômetro UV–Vis (Agilent 8453, Santa Clara, EUA) com cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm;

Cromatógrafo Agilent, modelo 1100, com detector de arranjo diodo (DAD), equipado com degaseificador G1316A, bomba quaternária (modelo G1379A), amostrador automático (modelo G1329A), um aquecedor termostato (modelo G1316A), um detector de comprimento de onda variável (modelo G1315B) e software Agilent ChemStation (Califórnia, EUA);

Purificador de água Milli–Q–Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);

Vortex, Genie 2 (Bohemia, EUA);

pH–metro Mettler Toledo, Sever Easy AG 8603 (Schwerzenbain, Suíça);

Micropipetas calibradas de 200 µL, 1000 µL e 5000 µL, respectivamente;

Prisma versão 9.01, Copyright© GraphPad Software, Inc. (Califórnia, EUA) 1992-2012;

Minitab versão 17.1.0, Copyright© LEAD Technologies, Inc. (Carolina do Norte, EUA), 1991-2004;

Chemsketch versão C50E41, Copyright© ACD/Labs, Inc. (Toronto, Canada), 1994-2018;

Marvin sketch versão 18.25.0, Copyright© ChemAxon, Inc. (Budapeste, Hungria), 1998-2018;

Inkscape versão 0.97.4, Copyright© Free Software Foundation, Inc (Massachussets, EUA) 2007-2019;

Design Expert version 11.1.1.2 modelling software (Stat-Ease, Inc Minneapolis, MN).

3.5. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE OCLACITINIBE E pH

Para a avaliar a solubilidade do OCLA levou-se em consideração o seu coeficiente de partição óleo/água (Log P = 1,7). A solubilidade foi testada em diferentes solventes: ACN, MeOH, dimetilsulfoxido (DMSO), água (H_2O), solução tampão fosfato e também combinações de solventes de diferentes polaridades (água –ACN, água–MeOH, ACN – MeOH).

Os testes da avaliação de solubilidade foram realizados, em diferentes eppendorfs contendo 1 mL dos diferentes solventes e das combinações de solventes foi adicionado 0,5 mg de padrão OCLA, obtendo-se uma concentração de 500 $\mu g.mL^{-1}$. As misturas foram sonicadas em banho ultrassom por 10 min a 25°C e mantidas em repouso durante 20 min. A solubilidade foi avaliada através da presença ou ausência de precipitado.

Com o auxílio do software Marvin Sketch foram obtidos os diferentes valores de pKa, para diferentes grupos funcionais da molécula de OCLA estes valores de pKa foram utilizados para definir os valores de pH a serem considerados na análise cromatográfica.

3.6. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA DO OCLACITINIBE

Nesta análise uma solução de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ em MeOH foi submetida a varredura no espectrômetro de ultravioleta na região de 200 a 400 nm, com objetivo de se obter o perfil espectral do fármaco no UV-Vis, e também definir a região do espectro onde o fármaco OCLA apresenta maior absorção. A solução branca foi MeOH.

3.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE

3.7.1. Preparo da fase móvel aquosa para método de partida

Como fase móvel inicial utilizou-se uma solução tampão de fosfato de potássio pH 7,72. Esta solução foi preparada misturando-se 0,2706 g de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e 0,1764 g de fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), dissolvidos

em água ultra purificada em balão volumétrico de 250 mL, originando uma solução de concentração de 10 mM, o pH foi ajustado com NaOH 0,1 M, e o volume completado com água ultra purificada e filtrada.

3.6.2. Preparação da solução estoque de Oclacitinibe

Para a obtenção da solução estoque, pesou-se 2 mg da substância química de referência (padrão de OCLA) em balança analítica e dissolveu-se em MeOH grau CLAE originando uma concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Esta solução foi sonicada por 10 min e armazenada a -40 ºC.

3.7.2. Solução de trabalho de Oclacitinibe

As soluções de trabalho para o método de partida, foram obtidas a partir da solução estoque de OCLA de 1000 $\mu g.mL^{-1}$, a qual foi diluída com a mistura de água ultra purificada e ACN (95:5) v/v, obtendo uma concentração de 200 $\mu g.mL^{-1}$. Esta solução de trabalho foi utilizada para desenvolver o método de partida por CLAE-DAD, e gradiente exploratório.

3.7.3. Matriz isenta de Oclacitinibe

Uma matriz isenta de OCLA (placebo) foi formulada tendo como base a composição qualitativa de excipientes do produto comercial (Apoquel comprimido). Composta de Estearato de magnésio (0,5%), Aerosil (1%), Lauril sulfato de sódio (1%), Talco (30%) e Amido de milho (QSP).

A solução estoque de placebo foi preparada em uma quantidade equivalente de 16 mg do placebo (mistura de excipientes) em MeOH, originando uma concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Após isso, a solução foi armazenada a -40 ºC.

3.7.4. Desenvolvimento do método de partida

Para desenvolver o método de partida foi utilizada uma fase estacionária do tipo ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm), detecção em 286 nm. A fase móvel utilizada foi constituída por mistura de uma solução de tampão fosfato com

de pH 7,72 (Fase A) e ACN (Fase B) no modo gradiente. O gradiente utilizado na fase exploratória está mostrado na TABELA 1 e na TABELA 2 foi apresentado o gradiente utilizado após a diminuição do tempo de corrida de OCLA, utilizando fase móvel composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico.

TABELA 1 – GRADIENTE EXPLORATÓRIO PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE

Tempo (min)	% A	% B	Fluxo ($mL.min^{-1}$)
0,00	95	5	1
23,00	5	95	1
23,01	5	95	1
25,00	95	5	1
30,00	95	5	1

NOTA: A = TAMPÃO FOSFATO (pH 7,72); B = ACETONITRILA. FONTE: O autor (2021).

TABELA 2 – GRADIENTE UTILIZADO PARA MONITORAR OS ENSAIOS DE DEGRADAÇOES

Tempo (min)	% A	% B	Fluxo ($mL.min^{-1}$)
0,00	95	5	1
8,8	73	27	1
10,0	73	27	1
12,00	95	5	1
17,00	95	5	1

NOTA: A = ÁGUA CONTENDO ÁCIDO FÓRMICO (pH 2,6); B = ACETONITRILA. FONTE: O autor (2021).

3.8. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

As condições de estresses foram realizadas conforme as diretrizes da ANVISA) nº 04/2015 e nº 216, de 7 de novembro de 2019 “Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e quantificação de PDs em medicamentos, os critérios para a realizar os ensaios de estabilidade IFA e de medicamentos” e guia da conferência internacional de harmonização (ICH) internacional da ICH Q1A - “*Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products*”, (ANVISA, 2015, 2019; ICH, 2003). O fármaco OCLA foi submetido a diferentes condições de estresse (neutra, oxidativa, térmica seca, ácido, alcalino e fotolítica, sendo monitorado com objetivo de verificar o aparecimento de possíveis PDs.

3.8.1. Degradação por Hidrólise

Para avaliar o estresse por hidrolise foi preparado solução de OCLA em MeOH, na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Para cada condição de hidrólise: alcalina ácida e neutra, uma alíquota de solução de OCLA de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ foi adicionado 1 mL de solução de HCl 1M, de NaOH 1 M e H_2O, respectivamente. As soluções ácidas, alcalinas e neutras foram monitoradas a cada 24 horas durante 7 dias, a uma temperatura de 25 ºC. Após alcançar o tempo especificado, as soluções ácidas e alcalina foram neutralizadas. As soluções antes da análise foram filtradas com filtro seringa de 0,22 µm e diluídas com uma mistura de água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN na proporção de (95:5, v/v), obtendo-se a concentração de trabalho de 200 $\mu g.mL^{-1}$, para então ser analisadas por CLAE-DAD, para verificar o aparecimento de possíveis PDs.

3.8.2. Degradação oxidativa

A condição de estresse oxidativa foi realizada expondo OCLA a uma solução de peroxido de hidrogênio (H_2O_2), a 3 %, a 25 °C, por 7 dias. Para este ensaio, a solução de OCLA em MeOH, na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ foi adicionado 1000 µL da solução de H_2O_2 a 3%, obtendo uma concentração de 500 $\mu g.mL^{-1}$ de OCLA. A solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm e diluída com água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN (95:5, v/v), originando a concentração de 200 $\mu g.mL^{-1}$, e a pois isso, a solução foi analisadas por CLAE-DAD, para verificar a formação de PDs.

3.8.3. Degradação térmica seca

Para realizar estresse pelo calor seco uma mostra de 5 mg de OCLA (sólido), foi exposta à temperatura de 60°C, por 24h, em seguida solubilizada em MeOH, e foi ajustada para concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. Em seguida foi analisado por CLAE-DAD, os ensaios foram monitorados em cada 24 horas durante 4 dias consecutivos.

3.8.4. Degradação fotolítica

Para realizar o estresse fotolítico, uma solução de OCLA em MeOH na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ foi exposta a luz fluorescente branca fria, semelhante ao especificado na ISO 10977 (ISSO, 1993) e a uma lâmpada fluorescente UV com comprimento de onda espectral entre 320-400 nm, que estão em concordância com as orientações da ANVISA (ANVISA, 2015, 2019; ICH, 1998;.JANGA et al., 2018).

Os ensaios de monitoramento foram realizados a cada 6 horas. Antes da análise a solução foi filtrada com filtro de 0,22 µm, diluída com uma mistura de água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN na proporção de (95:5, v/v), obtendo uma concentração de 200 $\mu g.mL^{-1}$, e analisada por CLAE-DAD para verificar aparecimento dos PDs. A TABELA 3 mostra o resumo das condições de estresse testadas.

TABELA 3 – ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO DE OCLACITINIBE

Condição	Sol de OCLA (1000 $\mu g.mL^{-1}$)	Aditivo	Volume de aditivo	Período de coleta em dias
Ácida	1 mL	HCl 1 M	1 mL	7
Alcalina	1 mL	NaOH 1 M	1 mL	7
Neutra	1 mL	H_2O	1 mL	7
Fotolitica	1 mL	-	-	7
Oxidativa	1 mL	H_2O_2 3 %	1 mL	7
	(OCLA sólido)			
Térmica	5 mg	Calor (60°C)	-	4

NOTA: A COLETA FOI REALIZADA A CADA 24 HORAS PARA CONDIÇÃO ÁCIDA, ALCALINA, NEUTRA E OXIDATIVA, RESPECTIVAMENTE E A CONDIÇÃO FOTOLITICA A COLETA FOI REALIZADA A CADA 6 HORAS O autor: (2021).

O monitoramento do teor de OCLA e presença dos PDs foram avaliados por CLAE-DAD entre o tempo zero e 168 horas. A degradação fotolítica foi monitorada a cada 6 horas e as degradações neutra alcalino, ácido, oxidativa o teor de OCLA foi monitorado a cada 24h, durante 7 dias. O estresse térmico foi monitorado a cada 24 horas durante 4 dias. Os cromatogramas, 0 obtidos durante o monitoramento dos ensaios de degradação, foram comparados com o controle para ver se houve diminuição da área do sinal de OCLA ou aparecimento de novo sinal cromatográfico. Nos casos em que o OCLA se mostrou sensível à uma certa condição de estresse testada, os ensaios de degradação foram repetidos, para confirmar a confiabilidade do resultado. Para desenvolver o método analítico foram utilizadas amostras de

estudo de degradação, em que houve a formação de PDs, para avaliar se o método é indicativo de estabilidade.

3.8. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN

Atualmente para desenvolver e otimizar metodos analíticos aplica-se os conceitos de quality by design para metodos analíticos (AQbD) (BHASKARAN, N. A. et al., 2021; ZHANG; HU 2017), os conceitos de AQbD tem sido utilizados com sucesso para desenvolver e otimizar metodos (ZHANG; HU 2017) a AQbD é uma abordagem sistemática que inicia com a definição de objetivos pretendidos, através de perfil do alvo analítico (FUKUDA et al., 2018), além, de ser uma abordagem essencial para separação de compostos distintos em simultâneo ou PDs da composição de uma amostra (FEREY et al., 2018). Comumente no desenvolvimento do método analítico por HPLC utiliza-se abordagem por meio de tentativas (método tradicional), em que um parâmetro cromatográfico é alterado a cada experimento até que a resolução dos picos seja alcançada, aumentando o número de experimentos realizados (TOME et al., 2019; ZACHARIS, C. K.; VASTARDI, E, 2017; ERUBHOTLA, K.; WALKER, R. B, 2019; FUKUDA et al., 2018; SYLVESTER et al., 2019). Visando a minimizar o número de experimentos, foi desenvolvido um método analítico indicativo de estabilidade aplicando AQbD. Foi aplicada AQbD com objetivo de otimizar as condições cromatográficas, assim, para desenvolver e o otimizar o método as seguintes etapas foram realizadas: definição dos objetivos pretendidos por meio de do perfil do alvo analítico, identificação dos atributos críticos de qualidade, parâmetros críticos do método, avaliação de riscos por meio de diagrama de espinha de peixe, otimização do método (seleção das variáveis categóricas, continuas e a seleção dos gráficos de contorno 2D, de superfície de resposta das variáveis testadas), definição da região operacional do desenho do método..

3.8.1. Perfil do alvo analítico

A primeira etapa para o desenvolver o método analítico consistiu na definição da finalidade do método pretendido e propor elementos fundamentais de ATP. Para isso, foram identificados os parâmetros que são essenciais para alcançar a qualidade desejada, sendo estes apresentados no (QUADRO 4).

QUADRO 4 – PERFIL DO ALVO ANALÍTICO PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-DAD

Elemento de ATP	Alvo	Justificativa
Amostra	OCLA (IFA)	Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para o OCLA por CLAE-DAD.
Tipo do método	CLAE de fase reversa	OCLA é um fármaco de baixa polaridade, apesar de possuir alguns grupos funcionais polares podendo ocorrer retenção em fase normal, porém, a retenção da molécula é fraca. Portanto selecionamos fase reversa, na qual deve ter boa retenção.
Instrumento	CLAE-DAD, com bomba quaternária	CLAE com a bomba quaternária permite utilização de gradiente na eluição. O OCLA tem cromóforo, por isso foi utilizado detector DAD.
Características da amostra	Sólido, solubilidade	CLAE de fase reversa, o analito deve estar em fase líquida para ser compatível com a técnica de análise e ter boa miscibilidade com a fase móvel
Preparação de padrão e amostras	Solvente e diluente	O OCLA é bem solúvel em metanol, por isso, o metanol foi utilizado como solvente no preparo da amostra. E como diluente acetonitrila e água.
Aplicação do método	Estudo de estabilidade	O método será aplicado para quantificação do OCLA e seus PDs em ensaios de estabilidade.

NOTA: ATP = PERFIL DO ALVO ANALÍTICO; IFA = INSUMO FARMACEUTICO ATIVO; DAD POR DETECTOR DE ARRANJO DE DIODO; RP = FASE REVERSA; PDs = PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO. FONTE: O autor (2021).

3.8.2. Atributos críticos de qualidade e parâmetros críticos do método

Para alcançar os resultados de ATP propostos, diferentes CQAs foram definidos como: fator caudal do OCLA, tR do último pico que mostram a separação dos analitos da amostra, ausência de interferência que indica a pureza do OCLA. Os CQAs foram definidos de forma a contemplar os ATP. Os CMPs foram divididos em: parâmetros de amostra como: tampão da fase móvel e solvente orgânico, da técnica de instrumentação como: taxa de fluxo, temperatura do forno e condições de operação em análises cromatográficas como, volume de injeção.

3.8.3. Análise de riscos

No desenvolvimento do método analítico por AQbD, é importante fazer a avaliação dos riscos, para compreender e identificar CMPs, conforme a sua criticidade e na forma como impactam nos CQAs. Neste estudo a avaliação de riscos foi realizada em duas etapas, através do diagrama de Ishikawa e análise de modo e falha de efeitos do inglês failure mode and effents analysis (FMEA). O diagrama de Ishikawa foi

aplicado para selecionar, classificar ou definir os prováveis fatores que impactam para o desempenho do método, após selecionado os fatores prováveis de riscos, foi utilizado a matriz de estimativa para classificar variáveis em níveis alto, médio e baixo risco, respectivamente.

3.8.4. Seleção das variáveis categóricas

As variáveis categóricas como solventes modificador orgânico (ACN e MeOH), colunas cromatográficas com fase estacionária distintas, sendo uma ZORBAX Eclipse C18 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 µm), XBridge C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) e aditivo da fase móvel composto por 0,1% de ácido fórmico (AFO) e formiato de amónio 10 mM, foram selecionados aplicando planejamento fatorial completo com 8 experimentos, para tR do pico, eficiência cromatográfica, resolução de OCLA, seletividade de OCLA, e fator caudal de OCLA, respectivamente. Foi incluído formiato de amônio com objetivo de verificar o solvente da fase móvel, que fornecia melhor perfil cromatográfico comparando com ácido fórmico. Estas variáveis foram selecionadas conforme a avaliação do perfil cromatográfico dos picos. Os experimentos foram obtidos utilizando CLAE-DAD, com modo de eluição gradiente na proporção de 73-95% de água contendo 0,1% de ácido fórmico definido na (TABELA 2), taxa de fluxo foi de 1 $mL.min^{-1}$, temperatura do forno de 25 ºC, volume de injeção foi de 12 µL, detecção em 254 nm. No QUADRO 5 é apresentado o planejamento fatorial completo aplicado para a seleção da fase estacionária e solvente orgânico.

QUADRO 5 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Fator independente		
Aditivo	Coluna cromatográfica	Solvente
Ácido fórmico pH 2,6	C8	ACN
Formiato de amônio pH 4	C18	MeOH
Fatorial completo: combinações dos fatores independentes		
Aditivo	Coluna	Solvente
Formiato de amônio	C 8	MeOH
Formiato de amônio	C 8	ACN
Ácido fórmico	C 18	ACN
Formiato de amônio	C 18	MeOH
Formiato de amônio	C 18	ACN
Ácido fórmico	C 8	ACN
Ácido fórmico	C 8	MeOH
Ácido fórmico	C 18	MeOH
Fator dependente: parâmetros cromatográficos		

Tempo de retenção do pico cromatográfico; Número de pratos teóricos do pico cromatográfico; Resolução de OCLA; Seletividade de OCLA; Fator caudal de OCLA;

NOTA: C = COLUNA CROMATOGRÁFICA. FONTE: O autor (2021).

3.8.5. Seleção das variáveis continuas

Após definir a fase estacionária e fase móvel, em seguida foi construído um desenho experimental aplicando planejamento fracionário de três níveis com 3 réplicas do ponto central, para avaliar o efeito de cada coeficiente das variáveis continuas testadas. A TABELA 4 mostra a forma como foram conduzidos os experimentos para escolher coeficientes de cada fator testado. As variáveis de entradas (CMPs) testados foram temperatura do forno variado entre 20–46 ºC, volume de injeção variado entre 5–20 µL e taxa de fluxo variado entre 0,5–1,5 $mL.min^{-1}$. As variáveis continuas foram selecionadas conforme a significância ($p< 0,05$) do gráfico de Pareto e dos coeficientes das variáveis continuas. As variáveis continuas significativas foram incluídos para o desenho experimental de Box-Behnken para determinar o ponto ótimo experimental, a partir do gráfico de superfície de resposta.

TABELA 4 – FATORIAL FRACIONÁRIO

Fator independente	Nível		
	Baixo (-)	Médio (0)	Alto (+)
Temperatura do forno (ºC)	20	33	46
Taxa de fluxo ($mL.min^{-1}$)	0,5	1	1,5
Volume de injeção	5	12,5	20

Fatores dependentes (respostas)
Tempo de retenção de OCLA
Resolução de produto de degradação 2 e OCLA
Resolução de OCLA e produto de degradação 3
Pureza de OCLA
Número de pratos teóricos de OCLA
Fator caudal de OCLA

Planejamento fatorial Fracionário			
Nº de corrida	Volume de injeção	Taxa de fluxo	Temperatura de forno
1	+1	+1	-1
2	**0**	**0**	**0**
3	**0**	**0**	**0**
4	-1	+1	-1
5	+1	-1	-1
6	-1	-1	+1
7	**0**	**0**	**0**
8	+1	+1	+1
9	+1	-1	+1
10	-1	+1	-1

11	-1	-1	-1

NOTA: EM VERMELHO, O PONTO CENTRAL EM TRIPLICATA;(0) = NÍVEL MÉDIO; (-1) = NÍVEL BAIXO E (+1) = NÍVEL ALTO. FONTE: O autor (2021).

3.8.6. Planejamento experimental

Para a otimizar o método, foram utilizadas três variáveis continuas e três níveis, foram definidos como CMPs a temperatura do forno de coluna (20–44 ºC), taxa de fluxo (0,5–1,5 mL.min^{-1}) e pH (2,5–3,8) que foi ajustado com a solução de HCl 0,1 M, estes foram aplicados para determinar o efeito de cada variável dependente (resposta) e otimizar o método analítico para fator caudal do OCLA, pureza OCLA e tR do último pico. Um total de 17 experimentos foram gerados a partir do Software Design Expert versão 11.1.1.2 *modelling (Stat-Ease, Inc Minneapolis, MN*) que foram aplicados para otimização do método. Os CMPs foram aplicados para avaliar os CQAs, cada fator foi investigado em três níveis: baixo, médio e alto (TABELA 5). Durante a criação do desenho experimental, os experimentos foram randomizados. Para isso, foi utilizada a concentração 200 µg.mL^{-1} da mistura da condição ácida e fotolítica que foi analisada no CLAE-DAD, e os resultados obtidos foram extraídos e a parte numérica dos CQAs foram adicionados no Software Design Expert 11, para determinar o ponto ótimo experimental, foram utilizados os gráficos de contorno 2D e gráficos de superfície de resposta 3D para determinar o ponto óptimo experimental dos CQAs selecionados.

A qualidade dos modelos de regressão múltipla foi avaliada utilizando ANOVA de falta de ajuste, coeficiente de determinação (R^2) ajustado, análise de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos avaliados utilizando os gráficos P-P e fator de inflação de variância (VIF), para seleção do modelo foram considerados dois critérios, a maior capacidade preditiva (R^2) e o da falta de ajuste. Para expressar a predição dos dados foram aplicadas as equações matemáticas polinomiais que foram geradas a partir do modelo de regressão, para cada umas das respostas investigadas.

TABELA 5 – FATORES CROMATOGRÁFICOS E VARIÁVEIS DE RESPOSTA PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN

Fator independente	**Nível**		
	Baixo (-)	Médio (0)	Alto (+)
pH da fase móvel	2,5	3,15	3,8
Taxa de fluxo (mL.min^{-1})	0,5	1	1,5
Temperatura do forno da coluna (ºC)	20	32	44
Fatores dependentes (respostas)			

Fator caudal do pico cromatográfico			
Pureza do pico cromatográfico			
Tempo de retenção do último pico cromatográfico			
Planejamento experimental de Box – Behnken			
Nº de corrida	pH (X_1)	Taxa de fluxo (X_2)	Temperatura da coluna (X_3)
1	**0**	**0**	**0**
2	**0**	**0**	**0**
3	0	-1	-1
4	0	0	0
5	+1	+1	0
6	+1	0	+1
7	-1	+1	0
8	+1	-1	0
9	-1	0	-1
10	**0**	**0**	**0**
11	-1	0	+1
12	0	-1	+1
13	+1	0	-1
14	0	+1	+1
15	0	+1	-1
16	**0**	**0**	**0**
17	-1	-1	0

NOTA: EM VERMELHO, O PONTO CENTRAL EM QUINTUPLICATA; X = FATOR INDEPENDENTE. FONTE: O autor (2021).

3.8.7. Região operacional do desenho do método

A região operacional do desenho do método foi definida através da união de todas as superfícies de respostas que foram obtidas através do desenho experimental por Box-Behnken, a união das superfícies de respostas são apresentadas em forma de Overlay plot e as linhas do MODR correspondem aos limites de qualidade (CMPs) que foram estabelecidas durante a criação do desenho experimental de Box-Behnken. A região que foi considerada adequada para separar OCLA e seus PDs com Rs> 2 entre os picos cromatográficos, fator caudal dos picos< 1.5, pureza dos picos cromatográficos≥ 99, tR do último pico< 12 foi destacado em bandeira.

Após estabelecer as condições previstas pelo MODR foram realizados experimentos adicionais da mistura de amostras das condições ácidos e fotolítico em triplicata, para a confirmação do ponto ótimo experimental sugerido pelo MODR.

3.9. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Para assegurar a confiabilidade do método, este foi validado de conforme a RDC 166, de 25 de julho de 2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e também conforme a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) de 2005. Os parâmetros que foram avaliados na validação do método foram os seguintes: teste de adequação do sistema, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, LD, LQ e robustez (ANVISA, 2017b; ICH, 2005).

3.9.1. Analise estatística

Os resultados da validação foram apresentados na forma de média, desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) e análise estatística foi realizada aplicando Prisma versão 9.01, Copyright© GraphPad Software, Inc. (Califórnia, EUA) e Minitab versão 17.1.0, Copyright© LEAD Technologies, Inc. (Carolina do Norte, EUA). Os valores de $p< 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para coeficiente angular, ANOVA, coeficiente de correlação de Pearson, respectivamente.

3.9.2. Teste de adequação do sistema

O teste de adequação do sistema (do inglês system suitability test - SST) foi avaliado antes de iniciar a validação do método para cada parâmetro, onde foi injetada uma solução em triplicata contendo os PDs, da mistura da condição ácida, fotolítica e padrão de OCLA. O SST foi realizado para avaliar se o CLAE-DAD e a fase estacionária forneciam a reprodutibilidade dos CQAs como: tR, eficiência cromatográfica, resolução dos picos cromatográficos e fator caudal, com uma repetibilidade adequada. O SST não é parâmetro de validação de método, mas sim, um conjunto de parâmetros que indicam se o sistema está adequado para uso e foi avaliado através do DPR.

3.9.3. Seletividade

A seletividade do método foi determinada através da demonstração da falta de resposta na matriz em estudo ou em branco ou por demonstração de grau de pureza

do composto de interesse aplicando o software ChemStation. O método foi considerado seletivo para OCLA se houver ausência de interferente no tR do OCLA e seus PDs, em amostra de branco e no placebo, ou se o perfil espectral obtido do composto de interesse (OCLA) na condição de estresse fosse similar aos dados da solução padrão pura.

3.9.4. Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade do método foi demostrada aplicando a regressão linear, que foi avaliada em cinco níveis de concentração da solução padrão entre 80–240 $\mu g.mL^{-1}$. A curva de calibração de OCLA foi obtida através da área do pico versus concentração de OCLA, a análise foi realizada em triplicata em cada concentração. A curva de calibração linear foi construída através da representação gráfica da resposta (y) em função da concentração do analito (x). A validação do modelo de regressão linear foi realizada através dos seguintes parâmetros e testes estatísticos: coeficiente de correlação de Pearson (R), coeficiente de determinação (R^2), a normalidade dos resíduos foi avaliada através do teste de Ryan-Joiner similar (Shapiro–Wilk), a homocedasticidade dos resíduos (avaliado por teste de igualdade de variância de Levene), avaliação da autocorrelação dos resíduos por meio do teste de Durbin-Watson, o teste t *Student* foi estudado para avaliar a importância dos coeficientes (angular e linear) e ajuste do modelo foi avaliado através de (ANOVA).

O preparo da amostra para a curva de calibração é apresentado na TABELA 6. Onde foram utilizadas três réplicas diferentes com a concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$.

TABELA 6 – PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OCLACITINIBE

Nível	[ ] final ($\mu g.mL^{-1}$)	Volume da SI (µL)	Volume de FM (µL)	Volume final (µL)
1	80	40	460	500
2	120	60	440	
3	160	80	420	
4	200	100	400	
5	240	120	380	

NOTA: [ ] = CONCENTRAÇÃO; SI = SOLUÇÃO INTERMEDIARIA; FM = FASE MÓVEL: FONTE: O autor (2021).

3.9.5. Preparo da amostra para precisão, exatidão e efeito matriz

Uma alíquota 2000 µL de concentração de 1000 µg.mL^{-1} de OCLA foi fortificada com 1000 µL de concentração de 1000 µg.mL^{-1} de excipientes como descrito no tópico 3.7.3, obtendo-se uma concentração de 1000 µg.mL^{-1}. A pois isso a solução foi sonicada em um ultrassom por 15 minutos, e filtrada com filtro seringa de 0,22 µm de membrana de difluoreto de polivinilideno, respectivamente, e diluída com uma mistura de água contendo 0,1% de ácido fórmico e ACN na proporção de (95:5) v/v, obtendo uma concentração de trabalho de 200 µg.mL^{-1}.

3.9.6. Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediaria (inter–dia). A precisão intra-dia foi avaliada por o mesmo analista em um intervalo de tempo de 5 horas, no mesmo dia e precisão intermediaria (inter–dia) que foi avaliada por analistas diferentes em diferentes dias. Para realizar ambas precisões foram preparadas três concentrações diferentes (80, 160 e 240) µg.mL^{-1} de OCLA a solução foi fortificada por excipientes. Os resultados foram apresentados através do DPR, além disso, a precisão intermediaria foi avaliada também através do teste t *Student* e o teste F de comparação de variância.

A exatidão foi estudada em três diferentes níveis de concentração (80, 160 e 240 µg.mL^{-1}). A porcentagem de recuperação do analito em matriz, foi preparada utilizando amostras em matriz fortificada, quanto em solução. A porcentagem de recuperação da amostra foi determinada considerando a amostra de solução como 100%.

3.9.7. Efeito matriz

O efeito matriz do método foi avaliado através da comparação do coeficiente angular da curva de calibração em solução e a curva de calibração da solução fortificada com placebo (excipientes) como descrito no tópico 3.9.5. Ambas foram determinadas com concentração de (80–240 µg.mL^{-1}). As comparações de ambas curvas foram avaliadas através do teste t *Student*, teste F e os coeficientes angulares

das duas curvas de calibração foram comparados utilizando a regressão linear e foi considerado similar o valor de p> 0,05.

3.9.8. Limite de detecção e de quantificação

O LD e LQ do método desenvolvido de OCLA foram calculados através da relação do DP do intercepto (eixo y) e a inclinação da curva de calibração, a partir de dados obtidos da curva de calibração em solução. Em seguida, foi preparada as concentrações obtidas pelos cálculos visando confirmar se o LQ era reprodutível e a exatidão do LQ foi demostrada através do cálculo da equação da reta da curva de calibração de OCLA, utilizando as áreas experimental se estava de conforme o esperado (comparando a concentração teórica e experimental do LQ).

3.9.9. Robustez

A robustez do método foi estudada variando-se os seguintes parâmetros cromatográficos: taxa de fluxo, pH da fase aquosa e temperatura do forno, utilizando de três níveis, como foi mostrado na TABELA 7. Os resultados da robustez foram avaliados através de DPR, teste t *Student* e teste F de comparação de variância.

TABELA 7 – AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ

Parâmetro cromatográfico	Nível		
	Baixo (-)	Condição de trabalho	Alto (+)
pH da fase móvel aquosa	2,45	2,5	2,55
Temperatura do forno (ºC)	40	41	42
Taxa de luxo (mL/min)	1,15	1,2	1,25

FONTE: O autor (2021).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

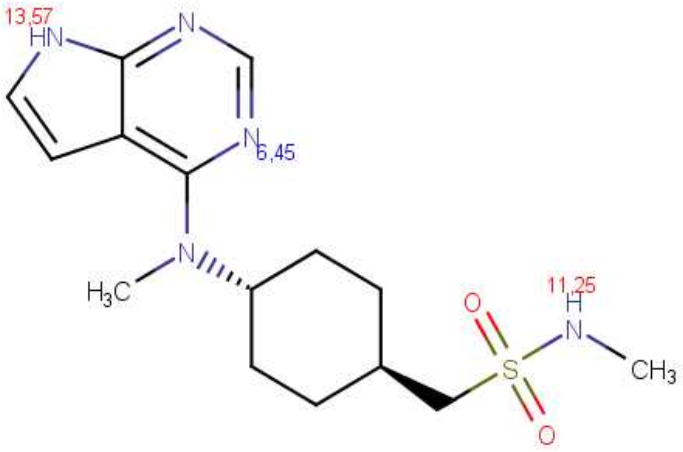
4.1. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE OCLA E DETERMINAÇÃO DO pH

Para o desenvolver o método de partida, foi avaliada a solubilidade e o pKa do OCLA. Considerou-se como solubilidade adequada (solúvel) a ausência de precipitado nas soluções teste. Nas soluções de OCLA (500 $\mu g.mL^{-1}$) em MeOH, DMSO, e as combinações ACN e MeOH, e água e MeOH, não se observou a presença

de precipitado após sonicação, porém em ACN e água foi constatada a presença de precipitado, mesmo após sonicação. Considerando estes resultados concluiu-se que o OCLA é solúvel em MeOH, DMSO, nas combinações de ACN + MeOH e H_2O + MeOH. O MeOH foi considerado o solvente de escolha pela disponibilidade.

O pKa da molécula de OCLA foi obtido com o auxílio do software Marvin Sketch, que mostrou três valores de pKa diferentes (FIGURA 5), possivelmente de ácidos conjugados dos grupos funcionais contendo amina secundária (11,25 e 13,57) e do grupo funcional imina. (6,45).

FIGURA 5 – ESTRUTURA DE OCLACITINIBE



NOTA pKa FORTE BÁSICO EM VERMELHO COM GRUPO SULFÓNICO E AMINA SECUNDÁRIA; EM AZUL pKa ÁCIDO FRACO COM IMINA. FONTE: O autor (2021).

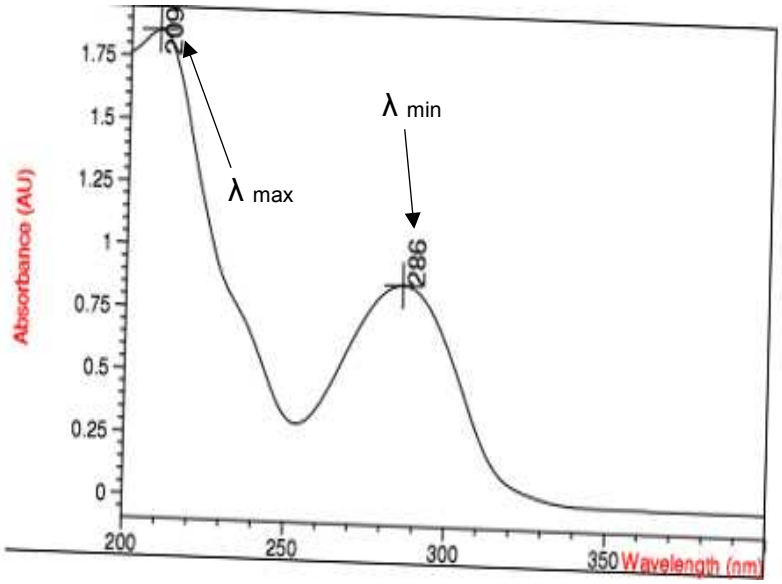
Para fármacos com grupos funcionais que podem ser protonados, o pH da fase móvel é extremamente relevante. Neste caso o pH da fase aquosa deve estar a uma distância mínima de 2 unidades do pKa da molécula de interesse. Compostos que apresentam valores de pKa entre 4 e 5, o método analítico pode ser desenvolvido utilizando fase móvel com pH na faixa de (2 e 3), mas também podem ser utilizados pH > 7 com precaução, devido às limitações da coluna. Por isso, para definir o pH da fase móvel considerou-se o pKa de 6,45.

4.2. ANALISE DE OCLACITINIBE POR ESPECTROSCOPIA DE UV-Vis

Uma vez definidos possíveis solventes, adequados para dissolver o OCLA e o pH que possam permitir maior controle da retenção de OCLA, o próximo passo foi

realizar uma análise no espectrômetro UV–Vis na região de 190–400 nm, com objetivo de determinar a faixa de comprimento de onda de absorção mais intensa do OCLA. O espectro de absorção de OCLA, em solução de 1000 µg.mL^{-1} em MeOH é mostrado na FIGURA 6. Observando o espectro UV–Vis, conclui–se que OCLA tem duas bandas de absorção, sendo um entre 200 e 220 nm, região que é considerada de baixa seletividade, tendo em vista o grande número de compostos que absorvem nesta região, e outra entre 280–300 nm com boa intensidade de absorção, onde se tem boa seletividade. Por isso, foi escolhido comprimento de onda de λ = 286 nm para desenvolver o método de partida.

FIGURA 6 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE OCLACITINIBE OBTIDO POR VARREDURA NO UV-VIS NA FAIXA DE 200-400 nm



NOTA: λ min = COMPRIMENTO DE ONDA MENINO; λ max = COMPRIMENTO DE ONDA MÁXIMO: SOLUÇÃO DE OCLA 1000 µg.mL^{-1}, EM METANOL. FONTE: O autor (2021).

4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PARTIDA DE OCLACITINIBE

4.3.1. Seleção da fase estacionária

A escolha de fase estacionaria do tipo fase reversa é ideal para começar desenvolver o método analítico visando alcançar uma separação adequada dos analitos da amostra com fator de retenção (k´) entre 1 a 10 (AISHBAGH, 2017; COLLINS, BRAGA; BONATO, 2006). Por isso, iniciou-se o desenvolvimento do método com uma coluna cromatográfica de fase estacionaria hidrofóbica, visto que, o

OCLA é uma molécula hidrofóbica, que possibilita uma maior interação com a fase estacionária e maior retenção, garantindo uma separação adequada dos analitos. O tipo de coluna cromatográfica selecionada para iniciar desenvolver o método foi ZORBAX Explise XDB C18 (150 mm x 4.6 mm, 3.5 µm) Agilent Technologies®. Que é uma coluna recomendada para separação compostos que são altamente apolares, pois apresenta um grupo silanol não livre a interações secundarias, que permite ter uma separação satisfatória dos compostos orgânicos apolares. Depois de ser definida a fase estacionária ser utilizada, a próxima fase foi selecionar o tipo de fase móvel para desenvolver o método de partida, aplicando gradiente exploratório.

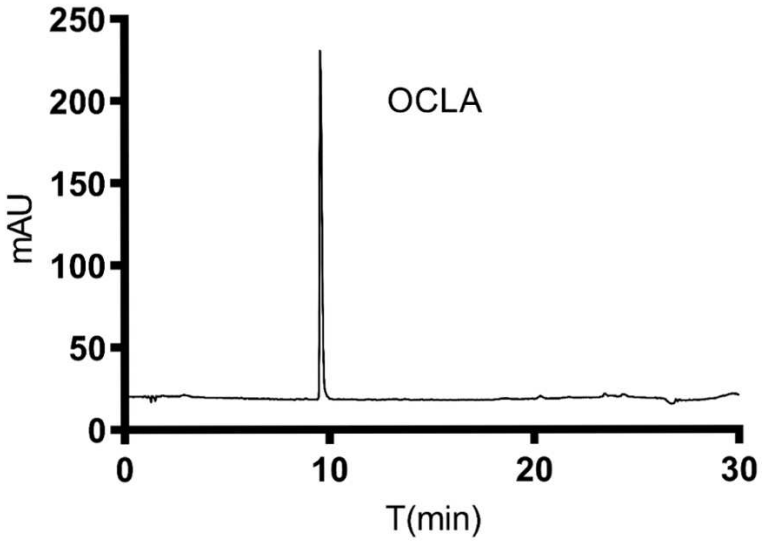
4.3.2. Escolha da fase móvel

A fase móvel escolhida para iniciar desenvolver o método de partida foi tampão fosfato com pH de 7,7 e ACN. A escolha do pH alcalino, foi por estar a uma distância mínima de 2, em relação ao pKa 6,45 que permite a protonação da molécula de OCLA, de maneira garantir obter único pico cromatográfico, para além, de permitir maior controle do tR do analito durante a eluição. O ACN possui menor viscosidade, o possibilita ser mais miscíveis em água que o MeOH. ACN possui uma viscosidade de 0,35 e MeOH de 0,55 (AGRAHARI; BAJPAI; NANDA, 2013; COLLINS, BRAGA; BONATO, 2006), a viscosidade da fase móvel influencia na separação dos analitos, por esse motivo foi escolhido ACN para iniciar desenvolver o método de partida. O diluente utilizado foi constituído por tampão fosfato e ACN na proporção de 95:5 v/v. depois de selecionar a fase estacionária e a fase móvel para eluição do analitos, a próxima fase foi desenvolver o método de partida aplicando gradiente exploratório.

4.3.3. Desenvolvimento do método de partida por gradiente exploratório

O método de partida de OCLA utilizou modo de eluição gradiente, com fase estacionaria composta por uma coluna cromatográfica hidrofóbica do tipo ZORBAX – C18 (150 mm x 4.6 mm, 3.5 µm), e uma a fase móvel constituída por tampão fosfato e ACN (A = tampão fosfato pH 7,72 e B = ACN), como mostrado na (TABELA 1). O método foi desenvolvido por CLAE DAD, o cromatograma obtido nestas condições está mostrado na FIGURA 7.

FIGURA 7 – CROMATOGRAMA DE OCLACITINIBE OBTIDO POR GRADIENTE EXPLORATÓRIO UTILIZANDO TAMPÃO FOSFATO E ACETONITRILA

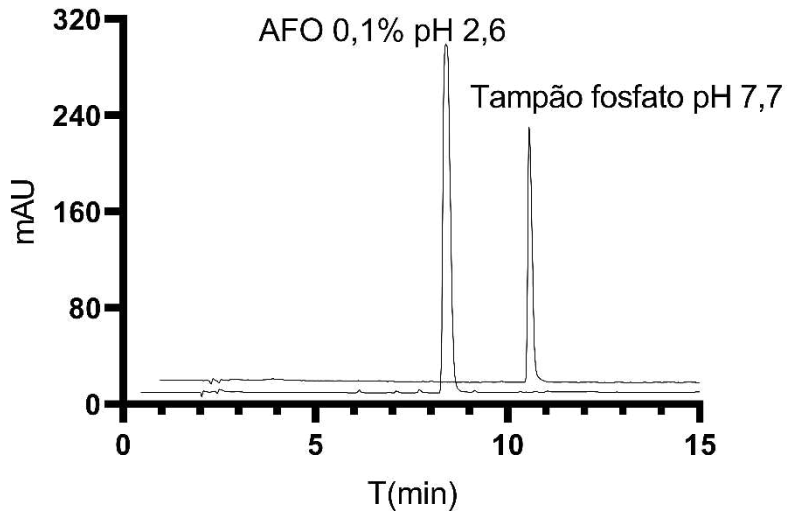


NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA CONTENDO 10 mM de (KH_2PO_4 E K_2HPO_4 10 mm pH 7.7), TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO 25°C E DETECÇÃO EM λ=286 nm, PRESSÃO DO SISTEMA 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (t0.0-0.0 min; 5%B; t0.0-23 min: 95%B; t23.01-25 min: 95%B; t25.01-30 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

O método cromatográfico de partida, desenvolvido utilizando 10 mM de tampão fosfato, seria adequado para monitorar o OCLA e seus possíveis PDs, porém é muito longo e consome muito solvente. Considerando esses aspectos o método foi modificado para reduzir pela metade o tempo de corrida (de 30 para 17 min), também se modificou a fase móvel, substituindo-se o tampão fosfato com pH de 7,7 por água contendo 0,1% de ácido fórmico (pH de 2,6 ± 56). Cabe destacar que, utilizar ácido fórmico como fase móvel, é mais vantajoso em comparação com tampão fosfato com pH 7,7, pois, a fase móvel aquosa constituída por água contendo ácido fórmico é volátil, o que diminui o risco de entupir as tubulações do CLAE durante análise, o que pode acontecer quando se utiliza fase móvel não volátil, como tampão fosfato, embora toda fase móvel deva ser filtrada e sonicada antes de ser utilizada. Outra vantagem da fase móvel aquosa contendo ácido fórmico é a facilidade de preparo. Na FIGURA 8 foi mostrado a sobreposição dos cromatogramas utilizando a fase móvel contendo 0,1% de ácido fórmico e tampão fosfato. E o cromatograma obtido utilizando fase móvel contendo 0,1% de ácido fórmico foi apresentado na FIGURA 9, onde o OCLA foi retido no tR de 8,34 min, com espaço suficiente antes e após o seu sinal para

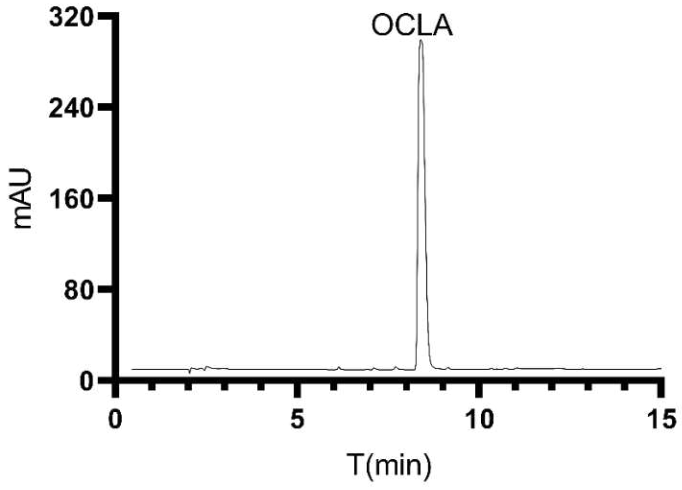
observar os possíveis PDs. Também foi testada fase móvel aquosa sem aditivo e o resultado mostrou que OCLA foi retido no tempo de 13,45 min, com fator caudal de 2,3, para além da largura do pico cromatográfico, o resultado foi apresentado no cromatograma da FIGURA 10.

FIGURA 8 – SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS COM FASE MÓVEL DE ÁGUA CONTENDO ÁCIDO FÓRMICO E TAMPÃO FOSFATO



NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA COM ADITIVO (0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) COM pH DE 2,6±56, ACETONITRILA E TAMPÃO FOSFATO COM pH 7,7, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM λ=286 nm, PRESSÃO DO SISTEMA 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

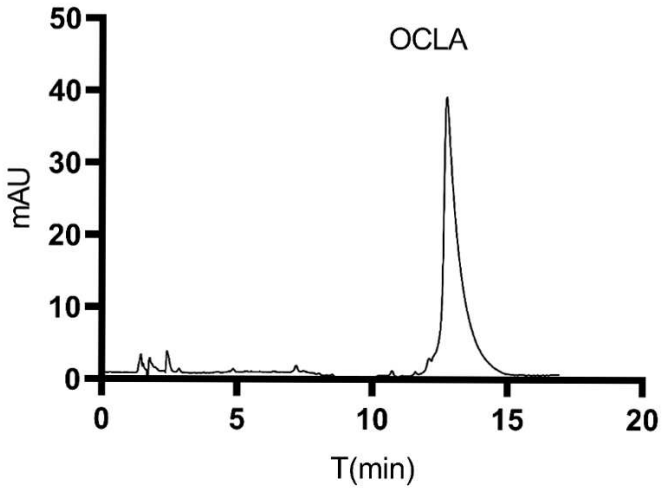
FIGURA 9 – CROMATOGRAMA DE OCLA OBTIDO POR GRADIENTE UTILIZANDO ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FORMICO E ACETONITRILA



NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA COM ADITIVO (0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) COM pH DE 2,6±56, ACETONITRILA,

TAXA DEFLUXO DE 1 mL.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM λ=286 nm, PRESSÃO DO SISTEMA 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 – 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

FIGURA 10 – CROMATOGRAMA DE OCLACITINIBE OBTIDO POR GRADIENTE UTILIZANDO ÁGUA E ACETONITRILA



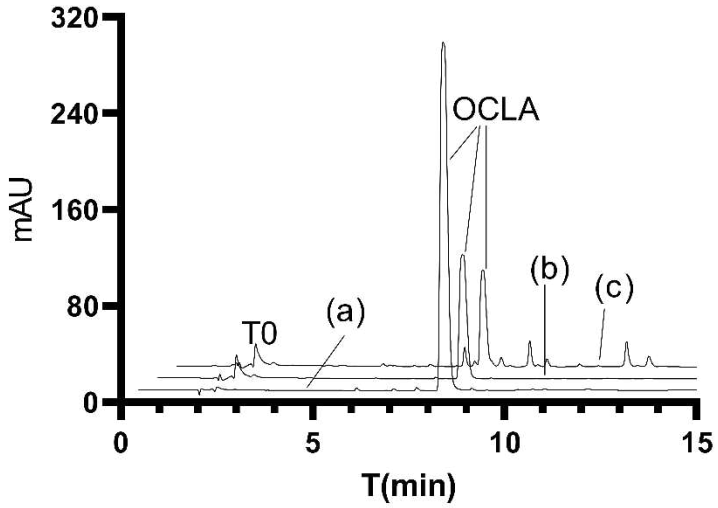
NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA SEM ADITIVO, TAXA DE FLUXO DE 1 mL.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM λ=286 nm, PRESSÃO DO SISTEMA 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (T0.0-0.0: 5%B; T0.0-8,8: 27%B; T8.9 10: 27%B; T10.01-12: 5%B; T12.01-20: 5%B). FONTE: O autor (2021).

4.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Após desenvolver o método de partida de OCLA, a pois isso, foram realizados os ensaios de estresses preliminares. Todos os ensaios de estresses foram monitorados em dois comprimentos de ondas diferentes, sendo (a) o comprimento de onda de maior absorção (286 nm) e (b e c) comprimento de onda de menor absorção (254 nm). Na FIGURA 11 foi apresentado a sobreposição dos cromatogramas obtidos nos dois comprimentos de onda. O resultado dos ensaios de degradação mostra que não foi observado aparecimento de PDs com detecção em 286 nm, após a exposição a condição de estresse. Em contrapartida no λ=254 nm houve a formação de PDs, este resultado foi confirmado através da comparação entre controle e amostra degradada, também de salientar que os ensaios preliminares foram repetidos, com objetivo eliminar os artefatos provenientes da fase móvel. Por isso, os ensaios de

estresses subsequentes foram realizados utilizando o comprimento onda de 254 nm, para monitorar os ensaios de degradação.

FIGURA 11 – SOBREPOSIÇÃO DE CROMATOGRAMAS DE OCLACITINIBE EM 286 E 254 nm



NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM (a) AMOSTRA DEGRADADA DE OCLA COM λ=286 nm E b = CONTROLE DE OCLA COM λ=254 nm, c = AMOSTRA DEGRADADA DE OCLA COM λ=254 nm; T0 = TEMPO MORTO; PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$; MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B E 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

Conforme a TABELA 8, é possível observar uma diminuição estatisticamente significativa do teor de OCLA nas condições de estresse ácida e fotolítica (p-valor< 0,0022; p-valor< 0,0001), tanto para teste t *Student* e teste F de comparação de variâncias, respectivamente. A média da área para ensaio ácido no tempo final (950,1 ± 6,1) é menor do que área no tempo zero (1155,3 ± 50,2), com uma variação de 205,2 unidades de área, o que sugere degradação do fármaco. Em relação a condição fotolítica, também pode-se dizer que, à média da área no tempo T1 (901,3 ± 1,3) é menor do que a média da área no tempo T0 (1362,8 ± 16,7), com uma variação da área de 461,1 unidades de área o que também sugere degradação do fármaco OCLA.

Nas condições de estresse alcalina, oxidativa, neutra e térmica não houve uma variação estatisticamente significativa das áreas observadas entre o tempo zero e T1, também não houve aparecimento de novos picos cromatográficos durante o monitoramento. Todos os ensaios de degradação foram repetidos, com intuito de confirmar se os resultados realmente eram reprodutíveis a cada dia.

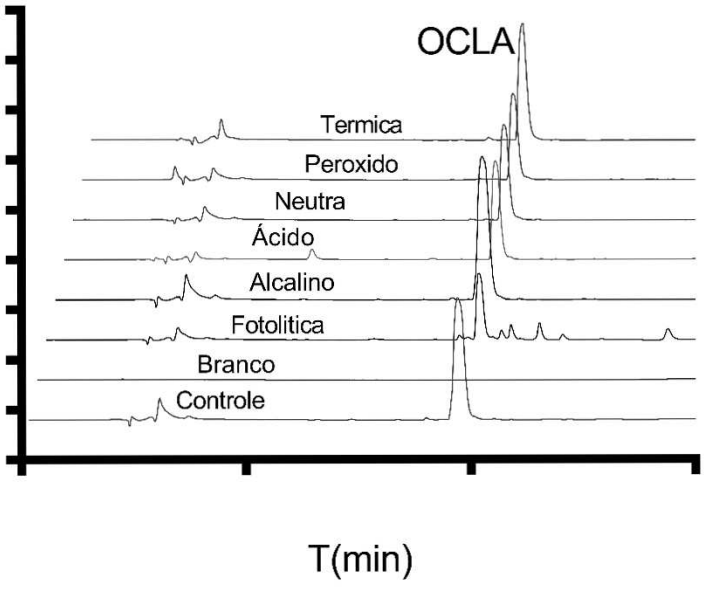
TABELA 8 – ÁREA DE OCLACITINIBE ANTES E APÓS SER SUBMETIDO AS CONDIÇÕES DE ESTRESSES

Ensaios	T0	T1	Variação	Teste estatístico			
	Média + DP	Média + DP		t	p	F	p
Ácido	1155,3 ± 50	950,1 ± 6,1	205,2	7,029	0,0022	67,84	0,0291
Alcalina	954,7 ± 1,6	949,4 ± 3,4	5,3	2,429	0,0721	6,617	0,3560
Neutra	916,7 ± 6,2	904,1 ± 5,2	12,6	2,610	0,0594	1,242	0,8922
Térmica	1317,6 ± 17	1299,6±1,4	18,3	1,829	0,1415	140,7	0,2114
Oxidativa	750,0 ± 6,4	739,0 ± 2,7	11,0	2,767	0,0505	7,230	0,5362
Fotolítica	1362,8 ± 17	901,7 ± 1,3	461,1	47,79	0,0001	178,0	0,0112

NOTA: T0 = TEMPO ZERO; T1 = TEMPO FINAL DE MONITORAMENTO DOS ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO NAS CONDIÇÕES FOTOLÍTICA, ÁCIDA, ALCALINA, NEUTRA, OXIDATIVA E TÉRMICA SECA, OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA; F = TESTE DE COMPARAÇÃO DE VARIÂNCIA. FONTE: O autor (2021).

Na FIGURA 12 é apresentado os cromatogramas de sobreposição dos picos cromatográficos nas condições de estresse ácido, alcalino, neutra, térmica, oxidativa e fotolÍtica em 254 nm, respectivamente, que foram obtidos durante o monitoramento dos ensaios de degradação forçada.

FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS DE OCLA OBTIDOS DOS ENSAIOS DEGRADAÇÃO DE FORÇADA

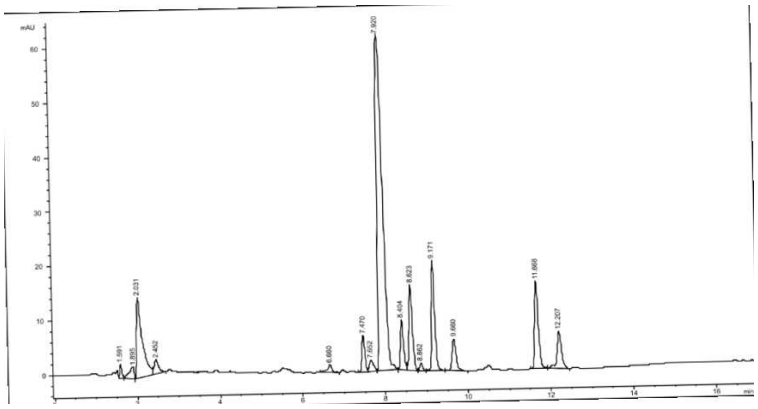


NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $ml.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.ml^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B); T1 = TEMPO DE MONITORAMENTO 7 DIAS, EXCETO CONDIÇÃO TÉRMICA MONITORADA EM 4 DIAS. FONTE: O autor (2021).

4.4.1. Estresse fotolítico

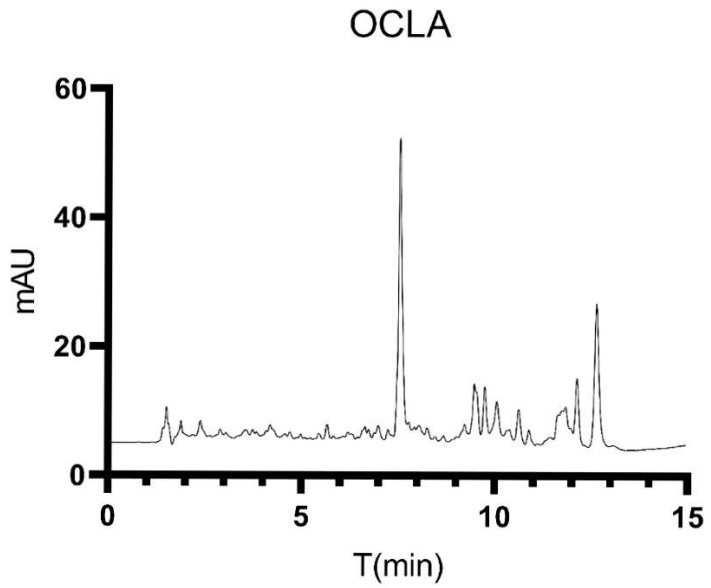
No estresse fotolítico, no período até 36 horas de exposição foram observados aparecimento de 9 PDs, com tR entre 6 e 13 min. FIGURA 13. Porém, é possível que 9 PDs observados 2 sejam PDs secundários, observados no tR de 6,66 e 8,86 min. Após uma exposição de OCLA a condições de estresse superior a 42 horas, é possível que alguns PDs que surgiram em um tempo maior possam ser oriundos de degradação secundária ver FIGURA 14. Também é possível observar nos cromatogramas do estresse fotolítico aumento de intensidade dos sinais correspondente a PDs ao longo de tempo de exposição como foi mostrado na FIGURA 15. Para evitar aparecimentos de PDs que sejam secundários, os ensaios de degradação subsequentes da condição fotolítica foram monitorados até 24 horas, os a sobreposição dos cromatogramas obtidos foram mostrados na FIGURA 16.

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DE ENSAIOS DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA, DURAÇÃO 36 HORAS



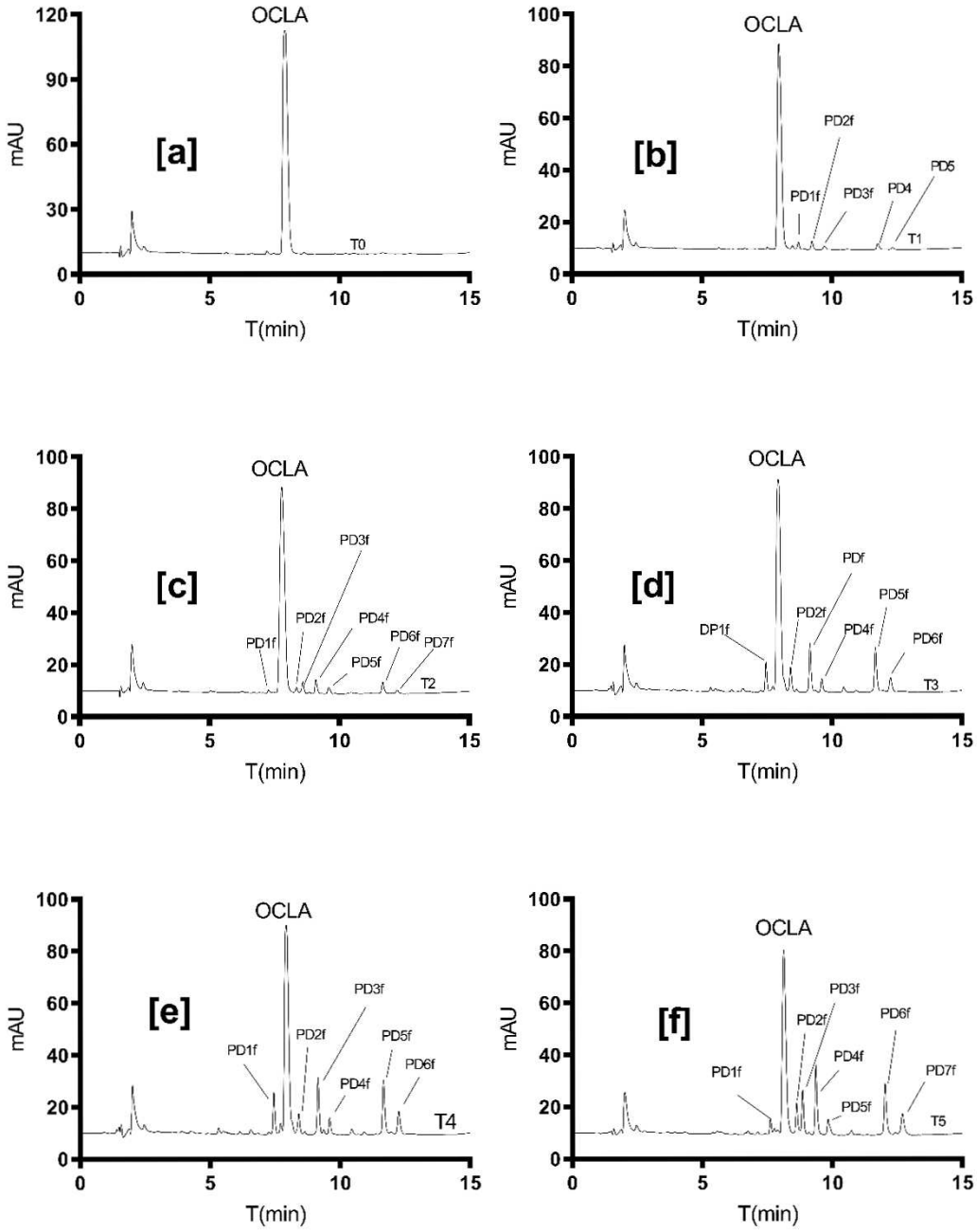
NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, DETECÇÃO EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5% B e 12,01 - 15 min 5% B). FONTE: O autor (2021).

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA DE ENSAIOS DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA EM 42 HORAS



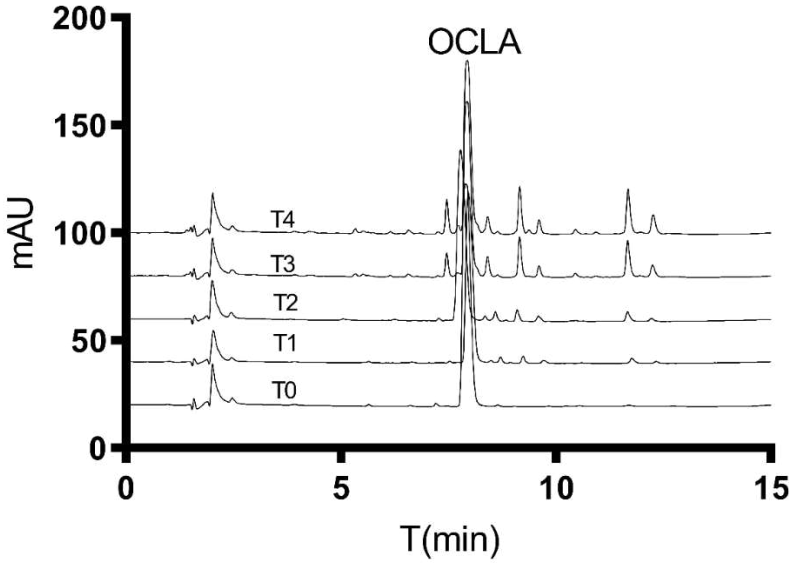
NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% b; 0,0 - 8,8 min 27% b, 8,9 - 10 min 27%b, 10 -12 min 5%b e 12,01 - 15 min 5%b): FONTE: O autor (2021).

FIGURA 15 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO FOTOLÍTICA



NOTA: [a] = TEMPO ZERO; [b] = TEMPO 6 HORAS; [c] =TEMPO 12 HORAS; [d] = TEMPO 18 HORAS; [e] = TEMPO 24 HORAS; [f] = TEMPO 30 HORAS; COLUNA ZORBAX C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, DETECÇÃO de 25 em λ=254 4 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $µg.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B E 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

FIGURA 16 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO FOTOLÍTICA ATÉ 24 HORAS

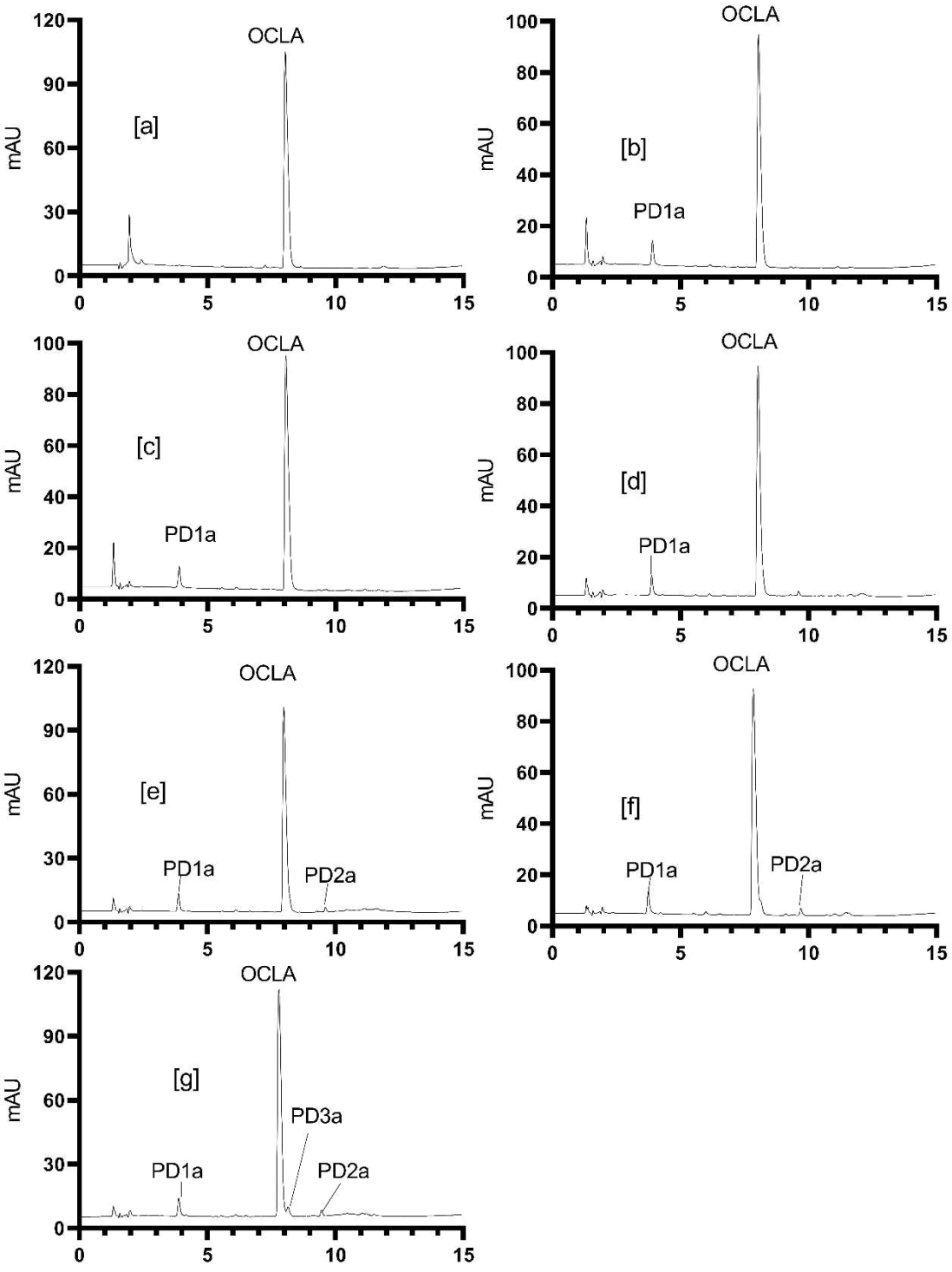


NOTA: T0 = TEMPO ZERO; T1 = TEMPO 6 HORAS; T2 =TEMPO 12 HORAS; T3 = TEMPO 18 HORAS; T4 = TEMPO 24 HORAS. NOTA; COLUNA ZORBAX C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1% CCOM pH 2,6 ± 56, ACETONITRLA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, DETECÇÃO em Λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$ de OCLA, MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% b; 0,0 - 8,8 min 27% b, 8,9 - 10 min 27%b, 10 -12 min 5%b e 12,01 - 15 min 5%b): FONTE: O autor (2021).

4.3.2. Estudo de degradação ácida

Na condição de estresse por hidrolise ácida, até o 7° dia de exposição foram observados 3 picos além do sinal correspondente ao OCLA, porém, é possível que sejam 3 PDs sendo um PDs primário pois, com o decorrer do tempo de monitoramento observa-se uma diminuição do sinal de maior intensidade no volume morto e aparecimento do PD 2 e 3, que foram denominados de PD2a e PD3a, respectivamente, cujo aumento da intensidade do sinal destes é proporcional a redução do volume morto. Os cromatogramas do monitoramento da condição ácida foram mostrados na FIGURA 17. Após isso, os ensaios subsequentes na condição ácida foram monitorados durante 24 horas.

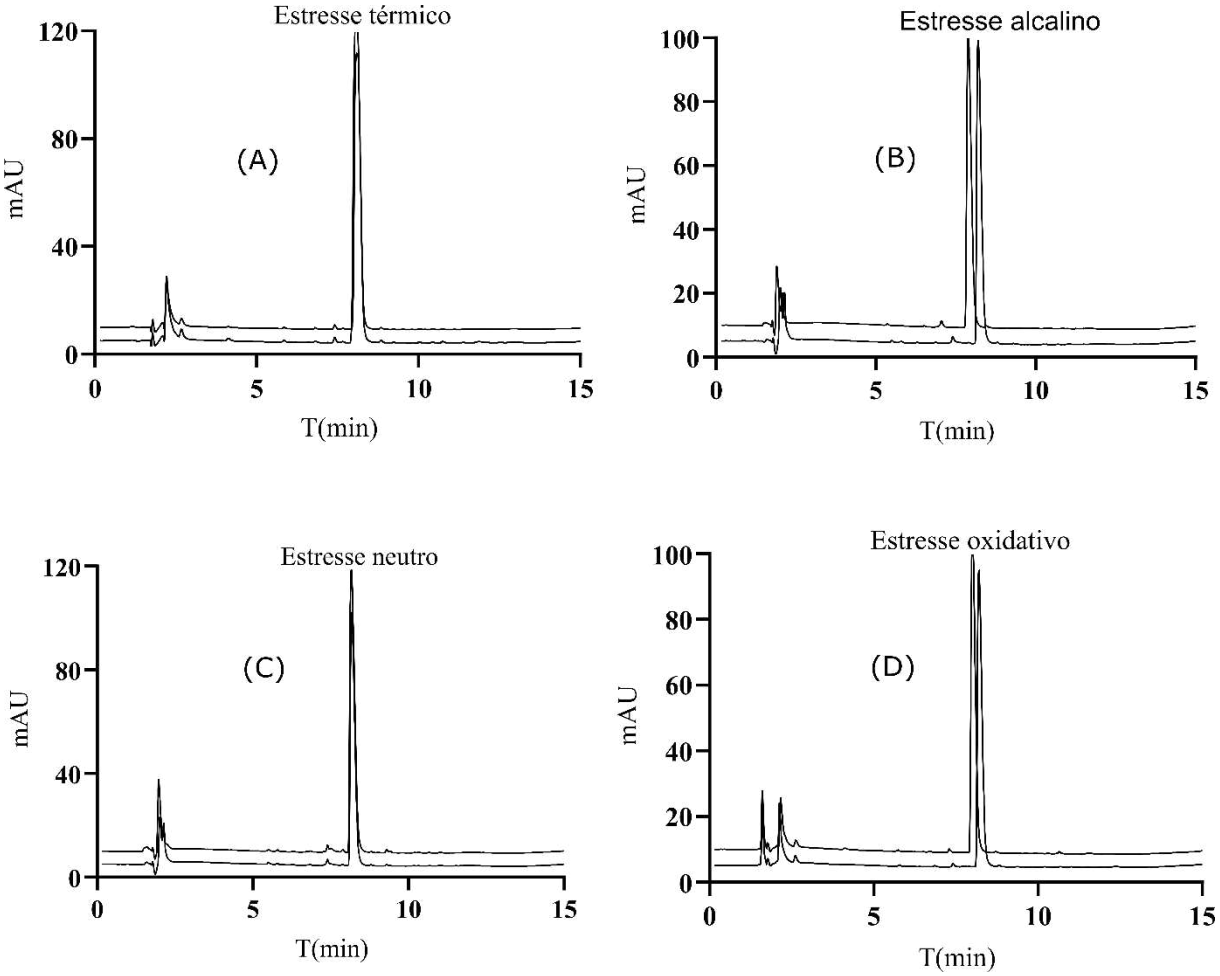
FIGURA 17 – ENSAIOS DE MONITORAMENTO DA CONDIÇÃO DE ESTRESSE ÁCIDA



NOTA: [A] = TEMPO ZERO; [B] = TEMPO 24 HORAS; [C] =TEMPO 48 HORAS; [D] = TEMPO 72 HORAS; [E] = TEMPO 96 HORAS; [F] = TEMPO 120 HORAS; [G] = TEMPO 144 HORAS; COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, DETECÇÃO EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B E 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

O fármaco OCLA mostrou-se resistente frente as condições de estresses oxidativa, térmica, por hidrolise (alcalina e neutra), respectivamente, pois não foi observado aparecimento de novos picos cromatográficos. Também não foi verificado o decaimento da intensidade do sinal cromatográfico correspondente ao OCLA. O resultado destes ensaios é apresentado na FIGURA 18.

FIGURA 18 – CROMATOGRAMAS DE CONDIÇÕES DE RESISTENTES



NOTA: A = ESTRESSE TÉRMICO, ESTRESSE ALCALINO, ESTRESSE NEUTRO, ESTRESSE OXIDATIVO; COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, FLUXO DE 1 mL.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, ELUIDO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B; MONITORADO EM 7 DIAS, EXCETO A CONDIÇÃO TÉRMICA QUE FOI MONITORADA EM 4 DIAS. FONTE: O autor (2021).

Considerando os resultados dos ensaios de degradação nas condições fotolitica, oxidativa, térmica, por hidrolise neutra, ácida e alcalina, pode-se dizer que na condição de estresse fotolítica foram observados 7 PDs no tempo de 24 horas de exposição do OCLA a radiação UV-Vis. O resultado sugere que OCLA é muito

sensível a radiação UV-Vis. Na condição de estresse por hidrolise ácida (HCl 1M por 24 horas) o resultado sugere apenas um PD com o tR 3, foi observado. O resultado sugere que OCLA é pouco sensível a hidrolise ácida. Nas condições de estresses oxidativa, térmica, por hidrolise (alcalina e neutra), não foram observados aparecimento novos picos cromatográficos, a pós o OCLA ser exposto a uma solução de 3% de peroxido de hidrogênio, NaOH 1M, água pura a 25 ºC e temperatura de 60 ºC durante 168 horas para condição oxidativa, alcalina, neutra e 96 horas, respectivamente. Na TABELA 9 são mostrados os PDs observados e a porcentagem de degradação nas condições testadas.

TABELA 9 – DEGRADAÇÃO DO OCLACITINIBE (%) NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Condição de estresse	Nº de PDs	Tempo de retenção dos PDs (min)	% de degradação
Padrão	--	--	--
Ácida	1	4	17,8
Alcalina	--	--	0,89
Neutra	--	--	1,4
Oxidativa	--	--	1,5
Térmica	--	--	1,4
Fotolítica	7	7,47; 8,4; 8,62; 9,17; 9,86; 11,66;12,7	33,8

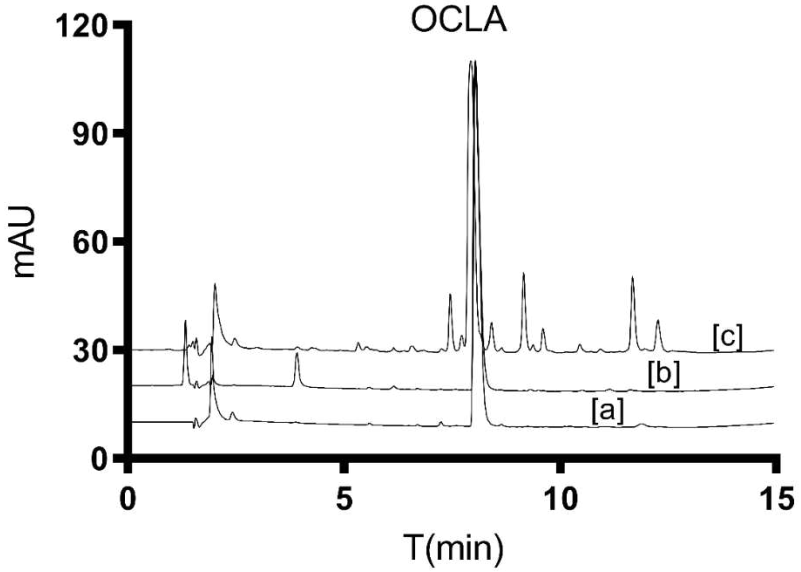
NOTA: PDs = PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO. FONTE: O autor (2021).

4.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DE OCLACITINIBE POR ANALYTICAL QUALITY BY DESIGN

Após o monitoramento das condições de estresse ácida e fotolítica os cromatogramas de 24 horas obtidos foram sobrepostos FIGURA 19 com objetivo de observar se os PDs aparecem no mesmo tR, antes de misturar as amostras degradadas em condições estresse ácida e fotolítica. Observa-se que não há sobreposição de sinais dos PDs (em tR diferentes) quando se comparam os dois cromatogramas, das condições ácidas e fotolitica.

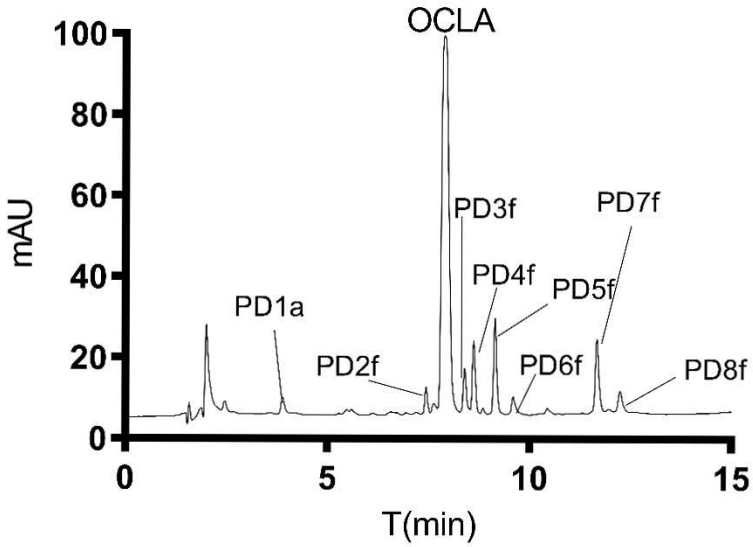
Com objetivo de estabelecer o método indicativo de estabilidade misturou-se amostras que foram submetidas as condições ácidas e fotolitica na concentração de 1000 $\mu g.mL^{-1}$. A pois isso, a mistura foi cromatografada nas mesmas condições dos ensaios de estresse, e pode-se observar que o tR de OCLA e dos PDs não sofreu alteração significativa. O cromatograma obtido da mistura das condições ácida e fotolítica esta mostrado na FIGURA 20.

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DAS CONDIÇÕES ÁCIDA. FOTOLÍTICA E CONTROLE



NOTA: [a] = CONTROLE TEMPO ZERO; [b] = CONDIÇÃO ÁCIDA; [c] = CONDIÇÃO FOTOLÍTICA; COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DE 25°C, DETECÇÃO EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DA MISTURA DE ANMOSTRAS DE AMOSTRAS SUBMETIDAS CONDIÇÃO DE ESTRESSE ÁCIDA E FOTOLÍTICA



NOTA: COLUNA ZORBAX C18 (150 X 4,6 mm, 3,5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA ÁCIDO FÓRMICO 0,1%, pH 2,6 ± 56, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 25°C, EM λ=254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 bar, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$, MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B). FONTE: O autor (2021).

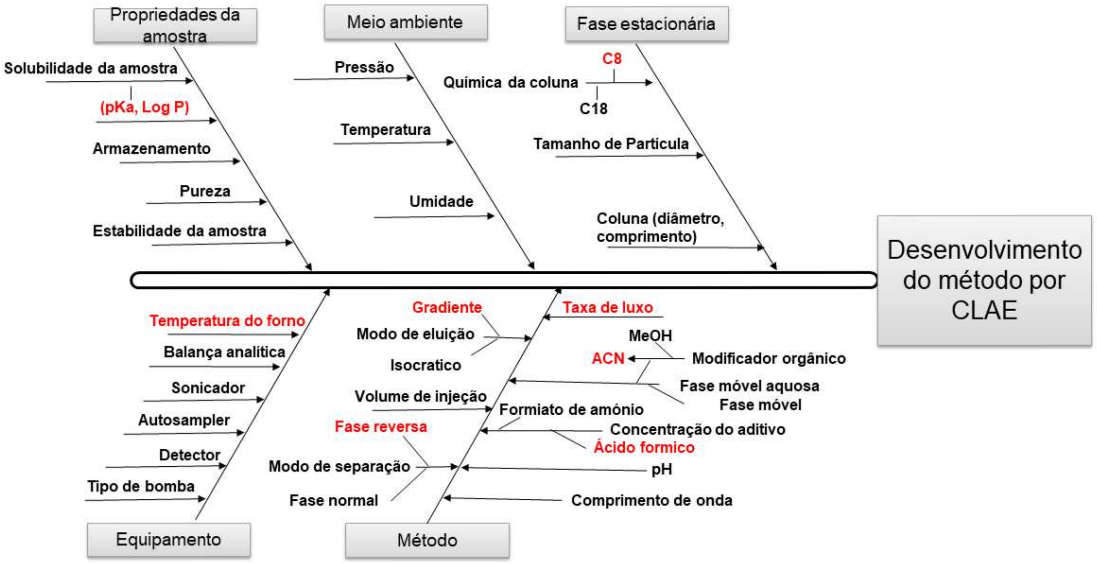
Após estabelecer o método cromatográfico indicativo de estabilidade de OCLA, este foi otimizado aplicando os conhecimentos de AQbD.

4.5.1. Perfil do alvo analítico e análise de riscos

O ATP do método é análogo ao objetivo do trabalho que é obter um método cromatográfico capaz de separar OCLA e seus PDs com resolução dos picos cromatográficos> 1,5, fator caudal dos picos cromatográficos< 1,5, picos cromatográficos com pureza de 99% e que o método tenha menor tempo corrida.

Os experimentos da triagem foram utilizados para avaliar os riscos que podem impactar nos CQAs. A FIGURA 21 mostra o diagrama de Ishikawa, onde foram elencados os possíveis fatores que podem ter impacto no método cromatográfico para o OCLA. O QUADRO 6 mostra a forma como estes fatores foram classificados conforme o grau de risco. Alto riscos foram atribuídos para aqueles que podem ter um grande impacto no desempenho final do método e de baixo risco os que tiveram um impacto baixo para desenvolver o método.

FIGURA 21 – APLICAÇÃO DO DIAGRAMA DE ISHIKAWA PARA DESCREVE A RELAÇÃO ENTRE CAUSA E EFEITO DOS CQAS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE COLA



NOTA: IDENTIFICAÇÃO DE RISCOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE DE OCLA EM VERMELHO CMPs CONSIDEADO DE ALTO RISCO. FONTE: O autor (2021).

Para o estudo de análise de risco foram aplicadas duas ferramentas da qualidade, o diagrama de Ishikawa e análise do modo de falha e efeito para análise dos parâmetros críticos do método. O tipo de coluna cromatográfica, temperatura do forno, taxa de fluxo, pH da fase móvel, % ACN, fase reversa, solubilidade da amostra foram considerados como sendo os parâmetros críticos do método, de alto risco, para desenvolver o método analítico indicativo de estabilidade para o Oclacitinibe.

QUADRO 6 – AVALIAÇÃO DE RISCO ATRAVES DA ANÁLISE DO MODO DE FALHA E EFEITO

Risco		Descrição dos riscos	Justificativa da escolha
Alto		Temperatura da coluna	Aumento da temperatura do forno da coluna diminui o tempo de retenção.
		Fluxo	Aumento da taxa de fluxo diminui o tempo de retenção, afeta a partição.
		pH da fase móvel	Protonação da molécula, se parcial divisão do sinal analítico, pode modificar a interação do analito com a fase móvel, influenciando no tempo de retenção.
		Detector	Se o IFA tem cromóforo, o detector pode ser lâmpada UV-Vis. Cromóforo que absorve próximo de 200 nm são pouco seletivos, sofrer interferências, cromóforos fracos baixa são menos seletivos.
		Modificador de Orgânico (ACN)	Pode afetar o formato do pico e influenciar no tempo de retenção.
		Ácido fórmico 0,1%	Ajuda a pronator o OCLA, originando único pico cromatográfico
		CLAE de fase reversa	É adequado para separar moléculas de baixa polaridade
		C8	Apresenta como a química da coluna moléculas de C8, como sendo apolar, garante maior retenção da molécula, já que o OCLA é apolar.
		Solubilidade da amostra	A solubilidade da molécula garente obter uma boa separação.
Médio		Estabilidade da amostra	A maioria das amostras não são alterada de imediato quando é armazenada a -40 C.
		Modo de eluição por gradiente	Melhor para separar mais que analito de uma amostra, como o estudo é direcionado a ensaio de degradação, por isso, foi proposto o gradiente para separar OCLA e seus PDs.
		Volume de injeção	Aumento do volume de injeção, aumenta fator caudal de OCLA.
		Comprimento de onda	Foi utilizado para detectar o sinal cromatográfico, sendo utilizados dois comprimentos de onda, 254 nm que foram observados os PDs e 286 nm, que apenas foi observado OCLA
Baixo		Pressão	A mudança da pressão tem influência com a variação da linha de base.
		Tamanho de partícula da coluna	Como foram selecionadas duas colunas cromatográficas uma C 8 e C18, o tamanho de partícula C8 (4.6 mm × 150 mm, 5.0 µm) e C18 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 µm).
		Sonicador	Utilizada para sonicar a fase móvel e amostra, caso tenha bolhas na fase móvel.
		Amostrador automático do equipamento	Existia apena único amostrador automático, por isso que não foi utilizado.
		Tipo de bomba do equipamento	Foi utilizada única bomba que foi bomba quaternária.
		Contaminação do meio ambiente	Existiu pouca interferência no método a contaminação do meio ambiente
		Umidade do meio ambiente	Durante o desenvolvimento não teve interferência no método.
			Continua
			Conclusão
		Descrição dos riscos	**Justificativa da escolha**
		Diâmetro da coluna	O diâmetro da coluna foi o mesmo nas duas colunas (4.6 mm), tanto C 8 e C18, respectivamente.

		Isocratico	É útil para separar amostras com poucos analitos, como o objetivo era degradar a molécula de OCLA e separar os PDs, foi escolhido modo de eluição por gradiente.
		CLAE de fase normal	Utiliza a fase estacionaria é polar, tendo pouco retenção, pois a molécula em estudo é apolar, por isso que não foi utilizado para a separação do IFA e seus PDs.
		Comprimento da coluna (150 mm)	As colunas utilizadas tiveram o mesmo comprimento.
		Pureza da amostra	Varia de acordo com a molécula em estudo.
		Armazenamento	Varia de acordo com o laboratório.

NOTA: A COR VERMELHA = A ALTO RISCO; AZUL = MÉDIO RISCO; VERDE = BAIXO RISCO, RESPECTIVAMENTE. FONTE: O autor (2021).

4.5.2. Experimentos de triagem para seleção de variáveis categóricas

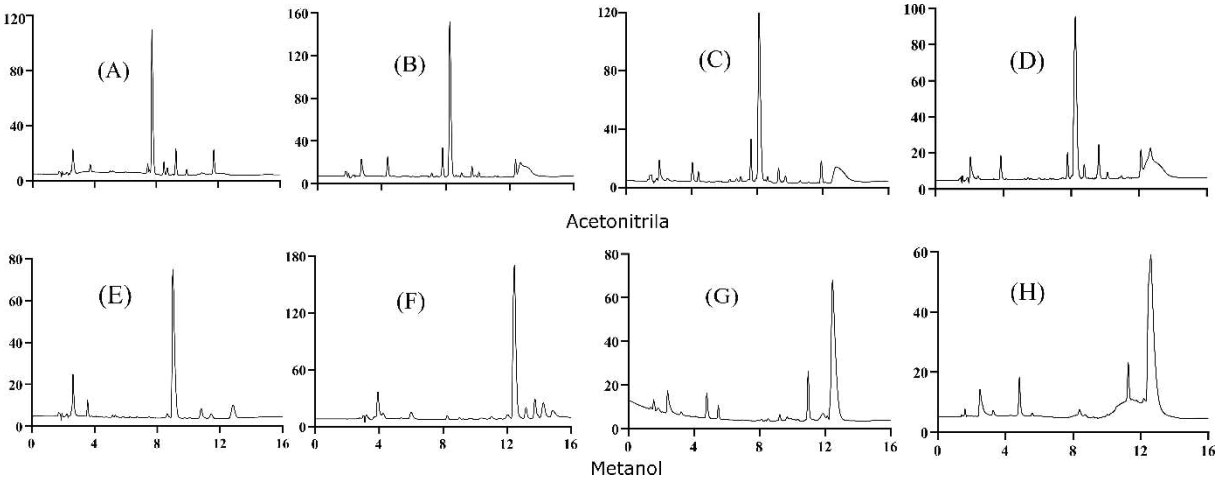
Após análise de riscos, a próxima etapa para otimização do método analítico indicativo de estabilidade de OCLA, foi selecionar variáveis categóricas, utilizando planejamento fatorial completo. Os resultados obtidos dos experimentos de triagem foram apresentados na TABELA 10 e FIGURA 22, respectivamente. Sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando a coluna octilsilano (C8), com a fase móvel constituída por água contendo 0,1% de ácido de fórmico com pH de 2,6, com modo de eluição por gradiente e ACN. Portanto, para esta etapa foi fixado a fase estacionária C 8 e solvente orgânico (ACN) para a fase seguinte. A seleção da coluna C 8 e ACN foi baseada no resultado obtido do perfil cromatográfico e também por apresentar valores dos parâmetros cromatográficos relativamente adequados, em comparação com a C18 e solvente orgânico (MeOH). A melhor condição encontrada foi usando coluna C 8, fase móvel aquosa com 0,1% de ácido fórmico e modificador orgânica ACN. As piores condições foram encontradas utilizando fase móvel orgânica MeOH, tanto com coluna C 8 ou C 18.

TABELA 10 – RESULTADOS DE VARIÁVEIS CATEGÓRICAS TESTADAS

Aditivo	tR	n	Rs	Seletividade	Fator caudal
C8 ACN aditivo ácido fórmico 0,1%	7,713	29818	3,89	1,14	1,512
C8 MeOH aditivo formiato de amônio (10 mM)	12,46	21584	1,24	1,04	1,836
C8 MeOH aditivo ácido fórmico 0,1%	11,34	36363	5,67	1,12	1,741
C8 ACN aditivo formiato de amônio (10 mM)	7,91	24653	1,43	1,07	1,676
C18 ACN aditivo ácido fórmico 0,1%	7,95	19452	1,65	1,09	1,721
C18 MeOH aditivo formiato de amônio (10 mM)	12.59	6540	1,53	1,04	1,852
C18 MeOH aditivo AFO 0,1%	13.11	24765	1,23	1.02	1,6547
C18 ACN aditivo formiato de amônio 10 (mM)	7,83	20742	1,72	1,03	1,816

NOTA: tR = TEMPO DE RETENÇÃO; n = NÚMERO DE PRATOS TEORICOS; Rs = RESOLUÇÃO; COLUNA ZORBAX ECLIPSE OCTADECILSILANO C18 (150 mm × 4.6 mm, 3.5 µm) E XBridge OCTILSILANO C 8 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm); FONTE: O autor (2021).

FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS DE OCLA E SEUS PDS OBTIDO POR ENSAIOS DE ESTRESSE

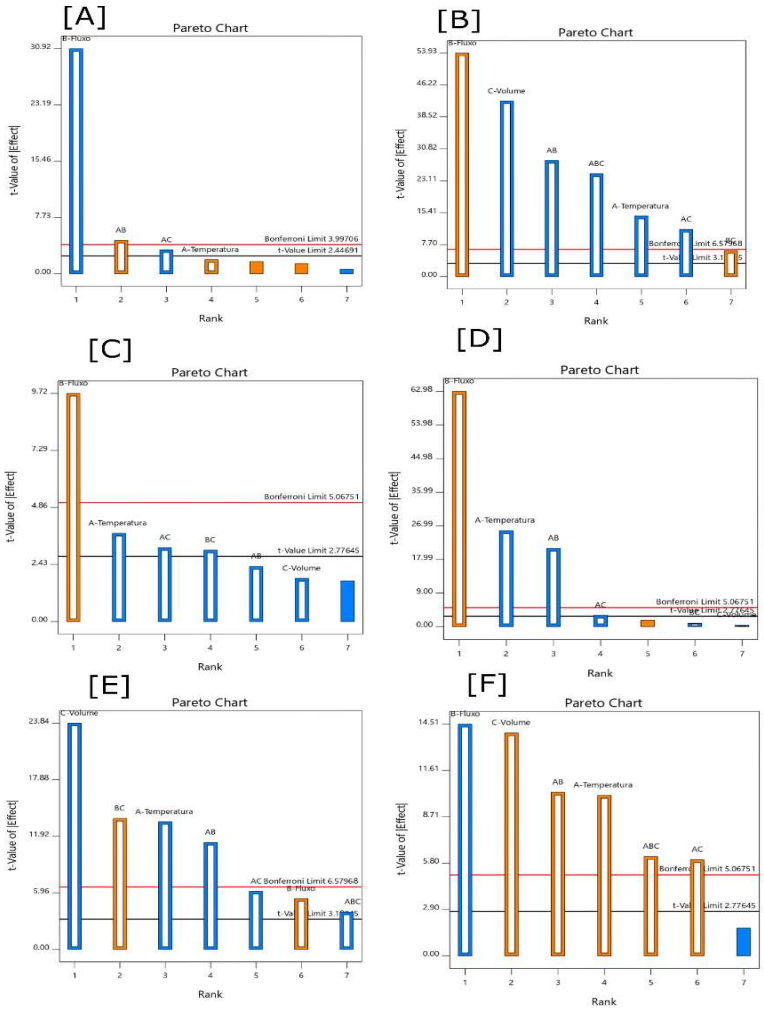


NOTA: (A) = C 8 COM 0,1% ÁCIDO FÓRMICO pH 2,6, ACN; (B) = C 8 COM FORMIATO DE AMÔNIO 10 mM pH 4, ACN; (C) = C 18 COM ÁCIDO FÓRMICO pH 2,6, ACN; (D) = FORMIATO DE AMÔNIO 10 mM pH 4, ACN; (E) = C 8 COM 0,1% ÁCIDO FÓRMICO, pH 2,6, MeOH; (F) = C 8 – FORMIATO DE AMÓNIO 10 mM pH 4, MeOH; (G) = C 18 COM 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO pH 2,6, MeOH; (H) = C 18 – FORMIATO DE AMÔNIO 10 mM pH 4, MeOH; ,RESPECTIVAMENTE, TAXA DE FLUXO DE 1 $mL.min^{-1}$, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO DORNO DE 25°C E DETECÇÃO EM 254 nm, PRESSÃO DO SISTEMA DE 156 BAR, CONCENTRAÇÃO DE 200 $\mu g.mL^{-1}$ DE OCLACITINIBE, ELUIÇÃO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27% B, 10 -12 min 5% B e 12,01 - 15 min 5% B). FONTE: O autor (2021).

4.5.3. Experimentos para a seleção de variáveis continuas

Depois de escolher a fase estacionária e o modificador orgânico, na sequência foram selecionadas as variáveis continuas que foram significativas no fatorial fracionário. Os resultados indicam que coeficientes que tiveram valores de p significativos mostram importância para explicar o comportamento de cada fator testado. Conforme estes resultados foram definidos como CMPs, para a fase de otimização do método, os seguintes fatores a temperatura do forno e taxa de fluxo. Os efeitos de cada coeficiente do modelo testado são apresentados na FIGURA 23 e TABELA 11.

FIGURA 23 – GRÁFICO DE PARETO DAS VARIÁVEIS CONTINUAS



NOTA: A=TEMPERATURA DE FORNO, B=TAXA DE FLUXO E VOLUME DE INJEÇÃO; [A] = TEMPO DE RETENÇÃO DE OCLA; [B] = RESOLUÇÃO ENTRE PD 2 E OCLA; [C] = RESOLUÇÃO DE OCLA E PD 3; [D] = PUREZA DO PICO; [E] = NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS; [F] = FATOR CAUDAL DE OCLA. FONTE: O autor (2021).

TABELA 11 – RESULTADOS DE P-VALOR DOS EFEITOS DE CADA COEFICIENTES

Fatores	tR	Rs PD 2 e OCLA	Rs OCLA e PD 3	Pureza	n	Fator caudal
A	0,0046	0,1104	0,0452	0,00017	0,4518	0,0246
B	0,0005	0,0037	0,0042	0,0004	0,7345	0,0010
C	0,8076	0,0073	0,3302	0,0005	0,2237	0,9646
AB	0,3417	0,0023	0,2307	0,00015	0,5221	0,0456
AC	0,6383	0,1791	0,1312	0,00107	0,7212	0,7030
BC	0,8407	0,4070	0.1412	-	0,4414	0,9058
ABC	0,9388	0,0317	-	0,0095	0,8172	-
Curvatura	0,0031	0,0079	0,0511	0,1365	0,00014	0,0007

NOTA: A = TEMPERATURA DO FORNO; B = TAXA DE FLUXO; C = VOLUME DE INJEÇÃO; AB = INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA DO FORNO E TAXA DE FLUXO; AC = INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA DO FORNO E VOLUME DE INJEÇÃO; BC = INTERAÇÃO ENTRE TAXA DE FLUXO E VOLUME DE INJEÇÃO; ABC = INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA DO FORNO, TAXA DE FLUXO E VOLUME DE INJEÇÃO; tR =

TEMPO DE RETENÇÃO; Rs = RESOLUÇÃO; n = NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS; FATOR CAUDAL; EM VERMELHO VALORES DE p< 0,05 QUE INDICAM QUE OS EFEITOS DOS COEFICIENTES DO MODELO FORAM SIGNIFICATIVOS. FONTE: O autor (2021).

4.5.4. Otimização do método aplicando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta

O planejamento experimental de Box-Behnken foi aplicado, com objetivo de otimizar ou determinar o ponto ótimo experimental a partir de gráfico de contorno 2D e de superfície de respostas 3D FUGURA 24, 25 e 26, respectivamente, através da interação dos CMPs que foram definidos na etapa anterior por fatorial fracionário. Foram gerados três modelos diferentes cubico para fator caudal, quadrático para a pureza do OCLA e tR do último pico cromatográfico, respectivamente. A TABELA 12 mostra os resultados que foram testados para desenho experimental de Box-Behnken.

A qualidade dos modelos de regressão foi avaliada utilizando ANOVA de falta de ajuste, coeficiente de determinação (R^2) ajustado, análise de normalidade e homocedasticidade dos resíduos avaliada utilizando os gráficos de probabilidade-probabilidade do inglês probability-probability plot (p-p plot) e fator de inflação de variância (VIF). Os gráficos de p-p FIGURA 27 mostram que existem uma concordância de distribuição linear dos dados e os resíduos estão distribuídos dentro do intervalo de -3 e 3. O VIF foi aplicado para avaliar multicolinearidade dos dados, VIF desejável deve ser igual a 1. Os resultados obtidos apresentaram valores de VIF adequado, pois os valores R^2 são alto para fator caudal e tR do último pico, e seus coeficientes da regressão apresentam valores de p< 0,05, mostrando que não há multicolinearidade dos dados obtidos. Na TABELA 13 é apresentado as equações polinomiais para fator caudal de OCLA, pureza de OCLA e tR do último pico, respectivamente. Observando os resultados da análise de regressão representados na TABELA 14. Os modelos de regressão explicam≥ 90,37% da variância dos dados, para comparar a inclusão ou exclusão dos termos dos coeficientes foi considerado dois critérios a qualidade de ajuste do modelo e maior capacidade preditiva (R^2) ajustado. Portanto o coeficiente de determinação (R^2) ajustado explicam≥ 78% a variância dos dados do modelo. Todos modelos avaliados foram significativos (p< 0,05) e com uma ausência de falta de ajuste p> 0,05. O sinal/ruído (AP) adequado

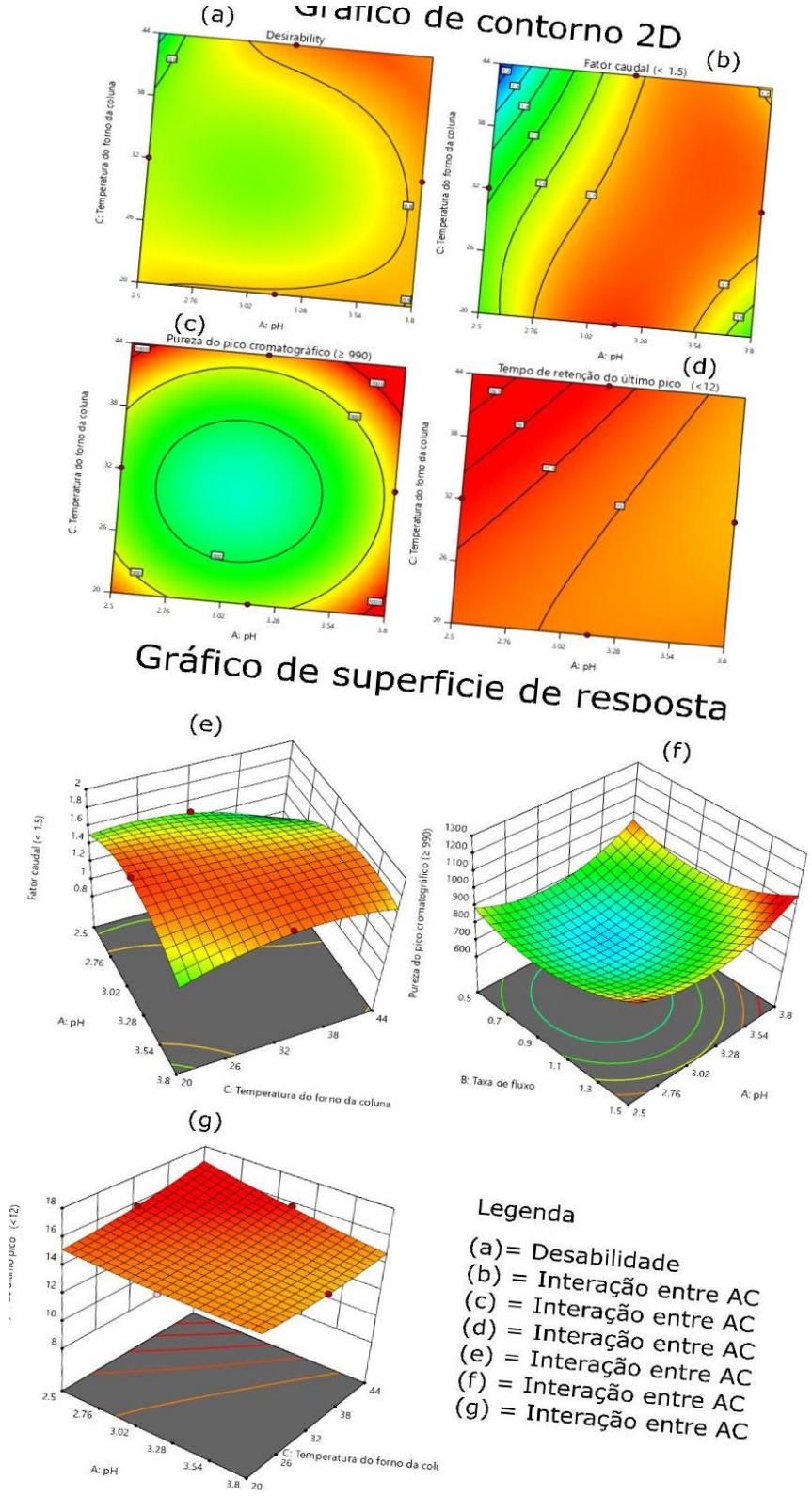
deve ser> 4, o modelo testado apresentou valores de sinal/ruído> 4, mostrado que todos CQAs analisados exibiram valores de sinal/ruído adequados.

TABELA 12 –RESULTADOS TESTADOS DO DESENHO DE EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN

Run	STD	pH	Fluxo	TºC	Fator caudal	Pureza	tR do último pico
1	17	2,5	0,5	32	1,492	783,084	15,81
2	8	3,8	0,5	32	1,776	973,501	14,679
3	7	2,5	1,5	32	1,371	999,086	9,289
4	5	3,8	1,5	32	1,116	999,306	9,718
5	9	2,5	1	20	1,413	892,33	11,988
6	13	3,8	1	20	1,14	999,712	12,514
7	11	2,5	1	44	1,14	999,712	12,514
8	6	3,8	1	44	1,427	984,499	11,11
9	3	3,15	0,5	20	1,836	836,366	14,794
10	15	3,15	1,5	20	1,462	999.883	10,092
11	12	3,15	0,5	44	1,648	999,247	15,808
12	14	3,15	1,5	44	1,418	999,401	9,214
13	10	3,15	1	32	1.557	842,25	11,681
14	4	3,15	1	32	1,577	649,294	11,475
15	1	3,15	1	32	1,524	639,738	11,691
16	2	3,15	1	32	1,556	643,503	11,686
17	16	3,15	1	32	1,533	640,371	11,691

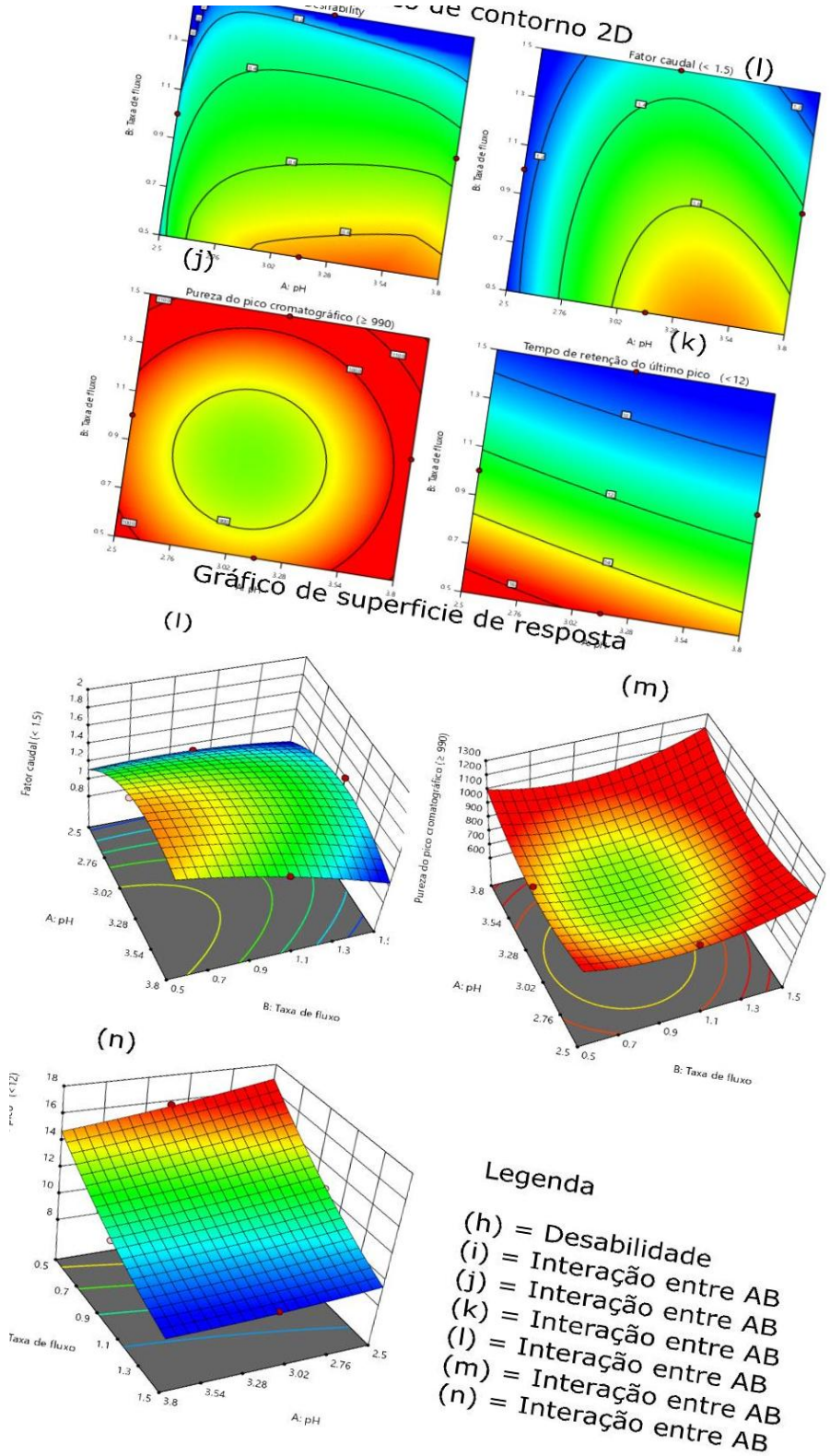
NOTA: STD = RANDOMIZAÇÃO; Run = nº DE CORRIDA; T ºC = TEMPERATURA DO FORNO; TR = TEMPO DE RETENÇÃO; EM VERMELHO RÉPLICAS EM QUINTO DUPLICATA DO PONTO CENTRAL. FONTE: O autor (2021).

FIGURE 24 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO pH E TEMPERATURA DO FORNO



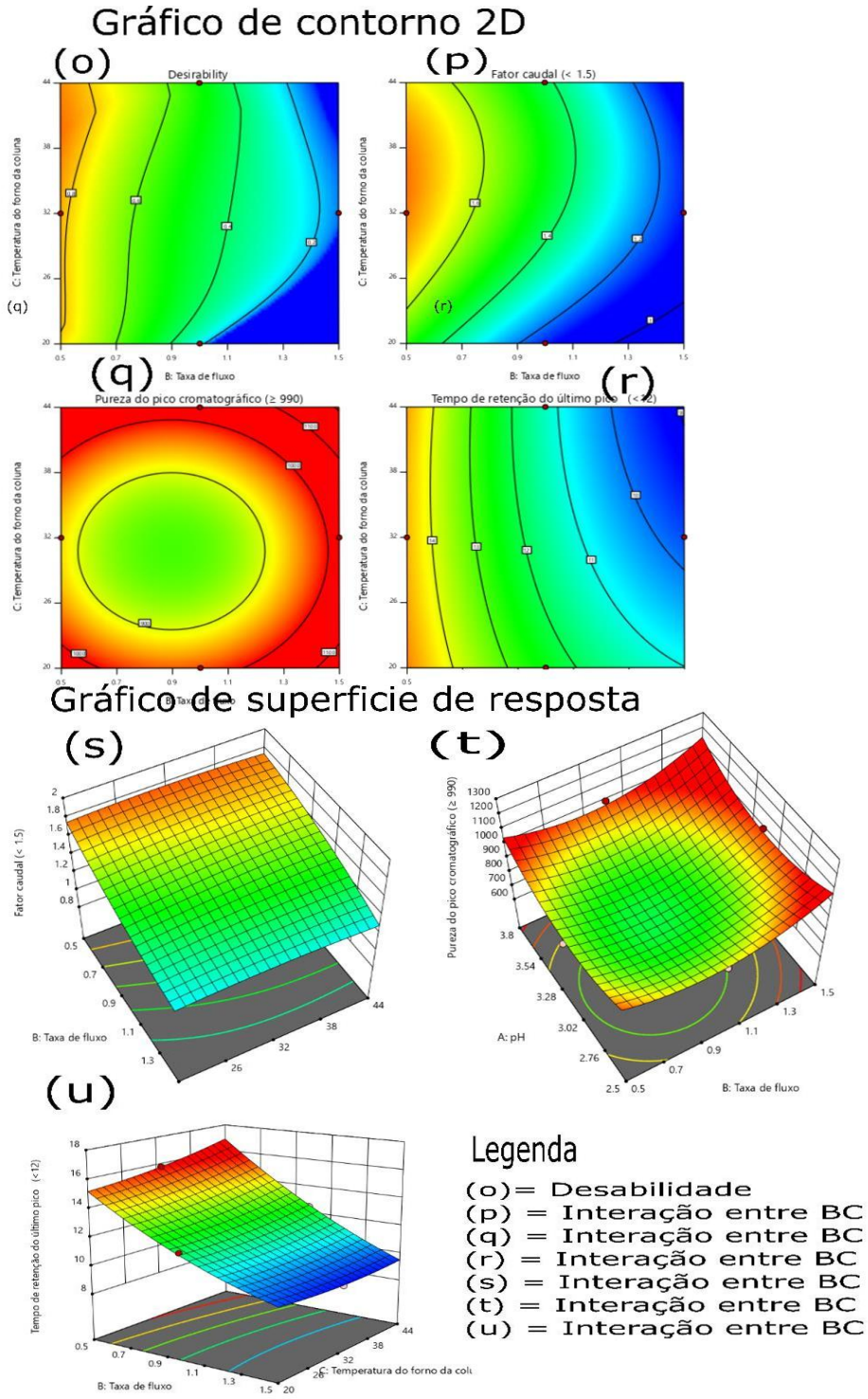
NOTA: (b-e) = FATOR CAUDAL DE OCLACITINIBE; (c-f) = PUREZA DE OCLACITINIBE; (d-g) = TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO; A = pH; C = TEMPERATURA DO FORNO.
FONTE: O autor (2021).

FIGURE 25 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO pH E TAXA DE FLUXO



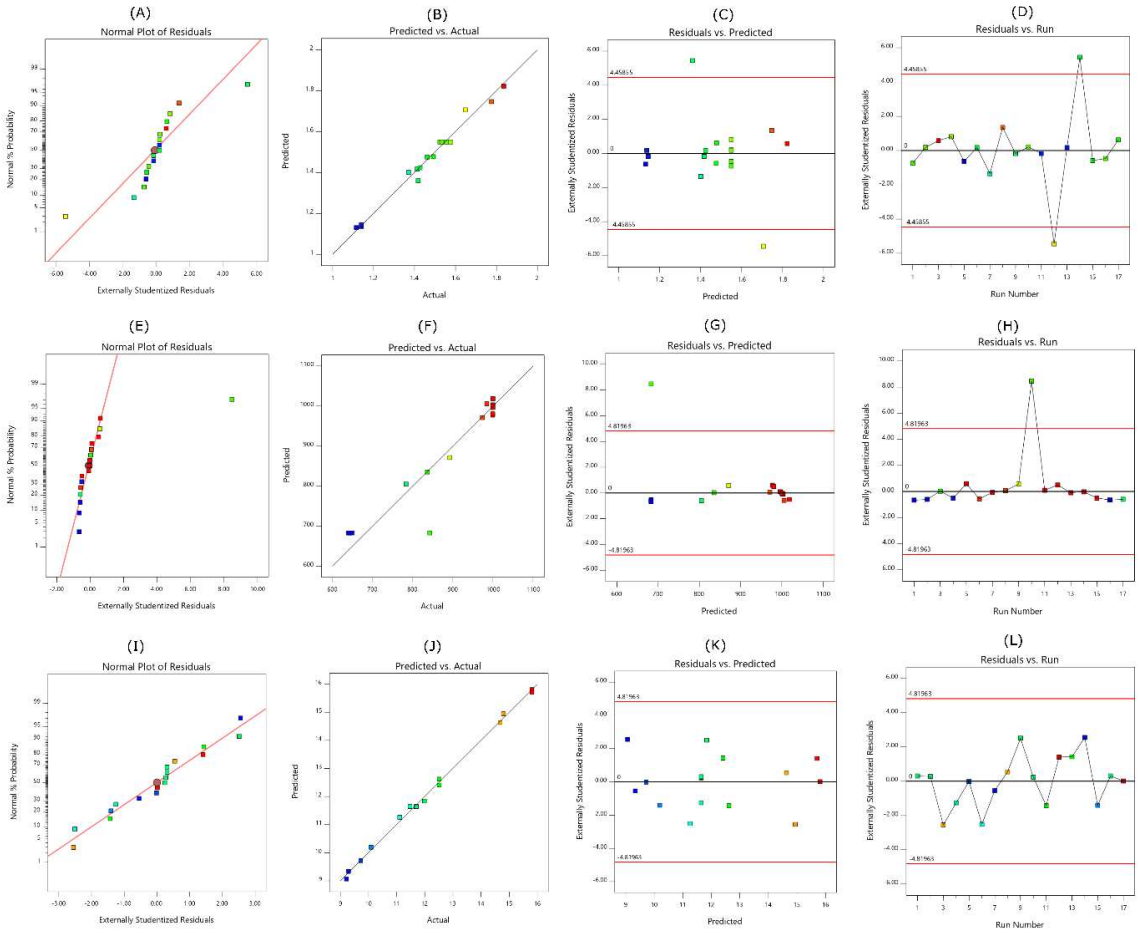
NOTA: (h) = DESABILIDADE; (i-l) = FATOR CAUDALOCLACITINIBE; (j-m) = PUREZA DE OCLACITINIBE; (k-n) = TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO; A = pH; B = TAXA DE FLUXO. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 26 – GRÁFICO DE CONTORNO 2D E DE SUPERFICIE DE RESPOSTA PARA INTERAÇÃO TAXA DE FLUXO E TEMPERATURA DO FORNO



NOTA: (o) = DESABILIDADE; (p-s) = FATOR CAUDALOCLACITINIBE; (q-t) = PUREZA DE OCLACITINIBE; (r-u) = TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO; B = TAXA DE FLUXO; C = TEMPERATURA DO FORNO. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 27 – GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL DE RESÍDUOS, DE VALORES PREVISTOS VERSUS ATUIAS



NOTA: [a, b, c, d] = GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL; GRÁFICO DE VALORES PREVISTOS VERSUS ATUAIS RESÍDUOS VERSUS PREVISTOS; RESÍDUOS VERSUS CORRIDA PARA TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO; [e, f, g, h] = GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL; GRÁFICO DE VALORES PREVISTOS VERSUS ATUAIS RESÍDUOS VERSUS PREVISTOS; RESÍDUOS VERSUS CORRIDA PARA PUREZA DO PICO CROMATOGRÁFICO; [i, j, k, l] = GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL; GRÁFICO DE VALORES PREVISTOS VERSUS ATUAIS RESÍDUOS VERSUS PREVISTOS; RESÍDUOS VERSUS CORRIDA PARA FATOR CAUDAL DE OCLA, RESPECTIVAMENTE. FONTE: O autor (2021).

TABELA 13 – EQUAÇÕES POLINOMINAIS PARA FATOR CAUDAL DE OCLA, PUREZA DE OCLA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ÚLTIMO PICO

Equação 1	$y1 = + 1,55 - 0,1731x_2 - 0,0580x_3 - 0,1348x_1{*}x_2 + 0,1400x_1{*}x_3 - 0,2108x_1^2 + 0,1002x_3^2 - 0,0586x_3 + 0,0615x_1{*}x_3^2$
Equação 2	$y2 = + 683,03 + 35.35x_1 + 50,68x_2 + 31,82x_3 - 47,55x_1{*}x_2 - 30,65x_1{*}x_3 - 40,84x_2{*}x_3 + 133,03x_1^2 + 122,69x_2^2 + 153,01x_3^2$
Equação 3	$y3 = +11,64 - 0,1975x_1 - 2,85x_2 - 0,0928x_3 + 0,3900x_1{*}x - 0,4825x_1{*}x_3 - 0,4730x_2{*}x_3 + 0,1418x_1^2 + 0,5873x_2^2 + 0,2449x_3^2$

FONTE: O autor (2021).

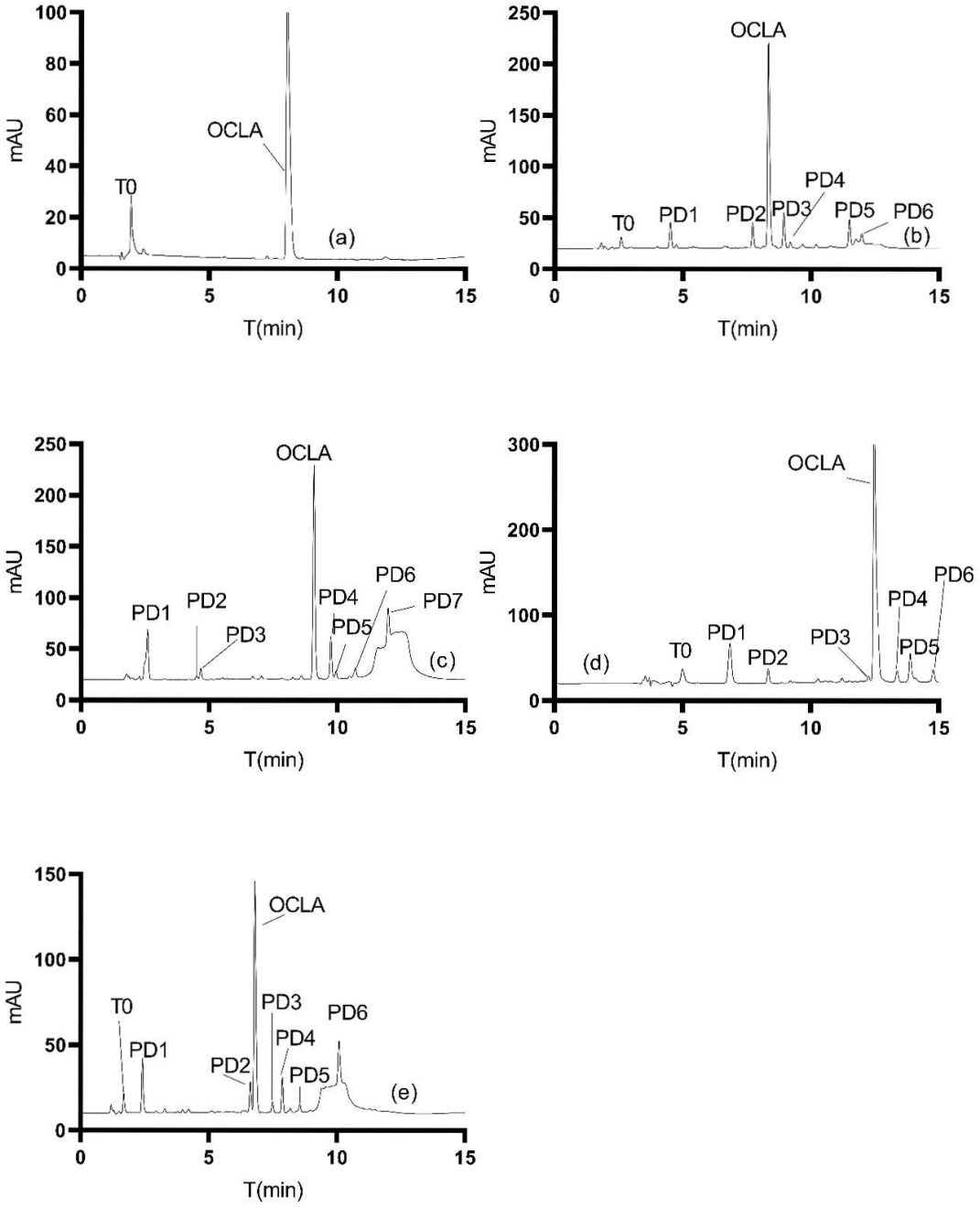
TABELA 14 – MODELO DE REGRESSÃO OBTIDO APLICANDO PROJETO EXPERIMENTAL DE BOX-BEHNKEN

Fator caudal de OCLA					**Pureza do pico cromatográfico**					**Tempo de retenção de último pico**				
Ordem		Cubico			Ordem		Quadrático			Ordem		Quadrático		
Parâmetro	**Coef**	**F**	**p-valor**	**VIF**	**Parâmetro**	**Coef**	**F**	**p-valor**	**VIF**	**Parâmetro**	**Coef**	**F**	**p-valor**	**VIF**
Modelo	1.55	57,71	0,0001		Modelo	+683,03	7,30	0,0079	1,00	Modelo	+11,64	313,19	0,0001	
B	-0.1731	172,25	0,0001	1,00	A	+35,35	2,04	0,1965	1,00	A	-0,1975	12,64	0,0093	1,00
C	-0.0580	9,67	0,0145	1,00	B	+50,68	4,19	0,0799	1,00	B	-2,85	2626,76	0,0001	1,00
AB	-0.1348	52,17	0,0001	1,00	C	+31,82	1,65	0,2397	1,01	C	-0,0928	2,79	0,1389	1,00
AC	0.1400	56,32	0,0001	1,00	AB	-47,55	1,84	0,2167	1,00	AB	+0,3900	24,64	0,0016	1,00
A^2	-0.2108	134,44	0,0001	1,53	AC	-30,65	0,7660	0,4105	1,00	AC	-0,4825	37,72	0,0005	1,00
B^2	0.1002	30,35	0,0006	1,00	BC	-40,84	1,36	0,2817	1,00	BC	-0,4730	36,25	0,0005	1,00
C^2	-0.0586	10,38	0,0122	1,00	A^2	+133,03	15,19	0,0059	1,01	A^2	+0,1418	3,43	0,1064	1,01
A^2C	0.0615	5,43	0,0481	1,53	B^2	+122,69	12,92	0,0088	1,01	B^2	+0,5873	5,83	0,0001	1,01
-	-	-	-	-	C^2	+150,01	18,32	0,0016	1,01	C^2	+0,2449	10,20	0,0151	1,01
Fonte	MQ	F	p-valor		Fonte	MQ	F	p-valor		Fonte	MQ	F	p-valor	
Resíduos	0,0014					4905,31					0,0247			
Lack of fit	0,0023	5,27	0,0683			863,89	0,1089	0,9505			0,0456	5,05	0,0759	
Erro puro	0,0004					7936,37					0,0090			
Analise estatística														
		R^2	0,9830			R^2	0,9037				R^2	0,9975		
		R^2-adj	0,9659			R^2-adj	0,7798				R^2-adj	0,9943		
		R^2-pred	0,8933			R^2-pred	0,7445				R^2-pred	0,9678		
		CV%	2,54			CV%	8,00				CV%	1,30		
		AP	25,4629			AP	6,2438				AP	55,9667		

NOTA: A = pH; B = TAXA DE FLUXO; C = TEMPERATURA DO FORNO; R^2 = COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO; R^2-adj = COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO AJUSTADO; R^2-pred= COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO PREDITIVO; AP = PRECISÃO ADEQUADA DE SINAL E RUÍDO; COEF = COEFICIENTES DOS TERMOS, F= VALOR F; CV %= COEFICIENTE DE VARIAÇÃO EM PORCENTAGEM; LACK OF FIT = FALTA DE AJUSTE; VIF FATOR DE INFLAÇÃO DE VARIÂNCIA. FONTE: O autor (2021).

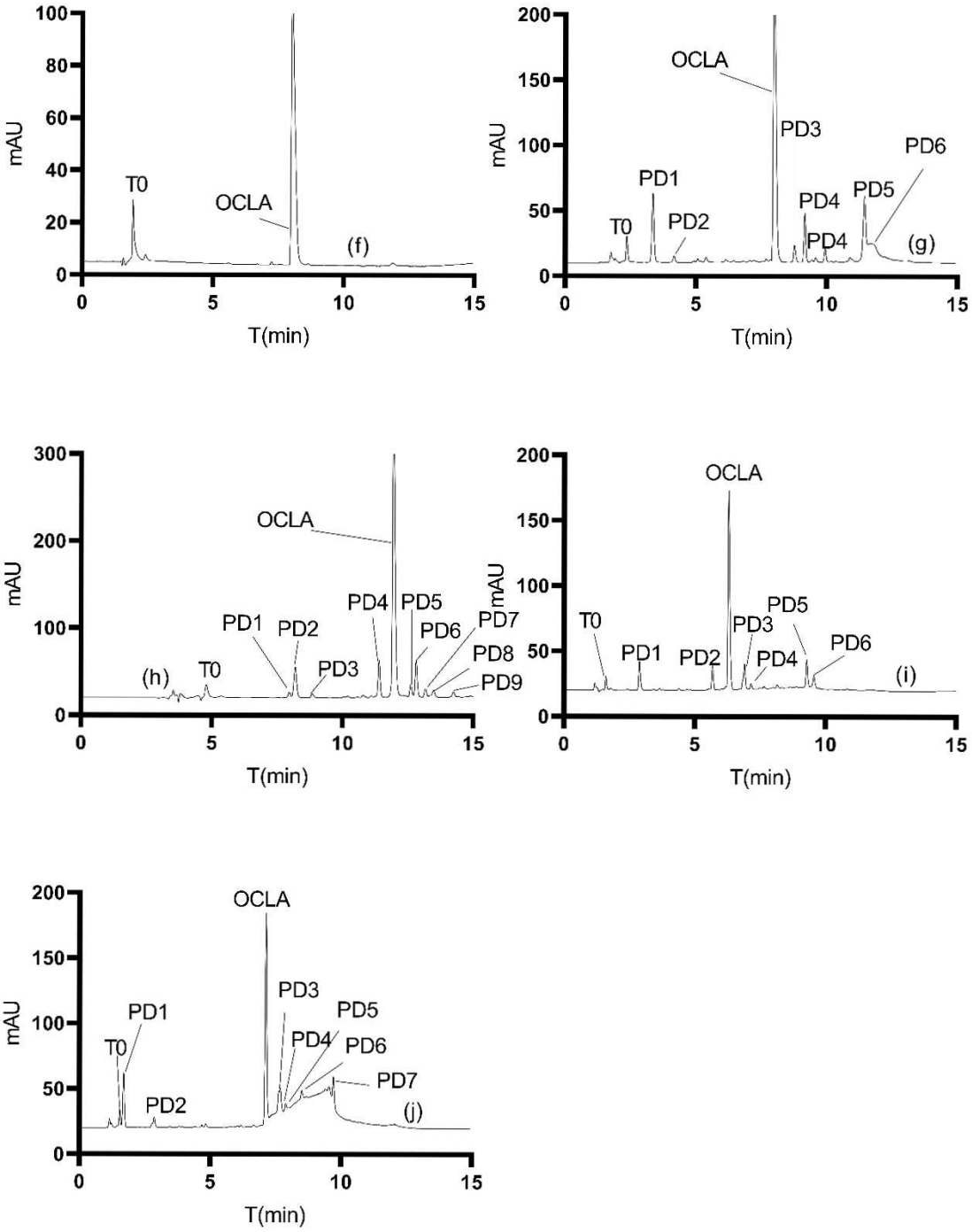
Os resultados dos cromatogramas obtidos dos experimentos de otimização utilizando planejamento experimental de Box-Behnken foram apresentados na FIGURA 28, 29 e 30, respectivamente.

FIGURE 28 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 20 ºC



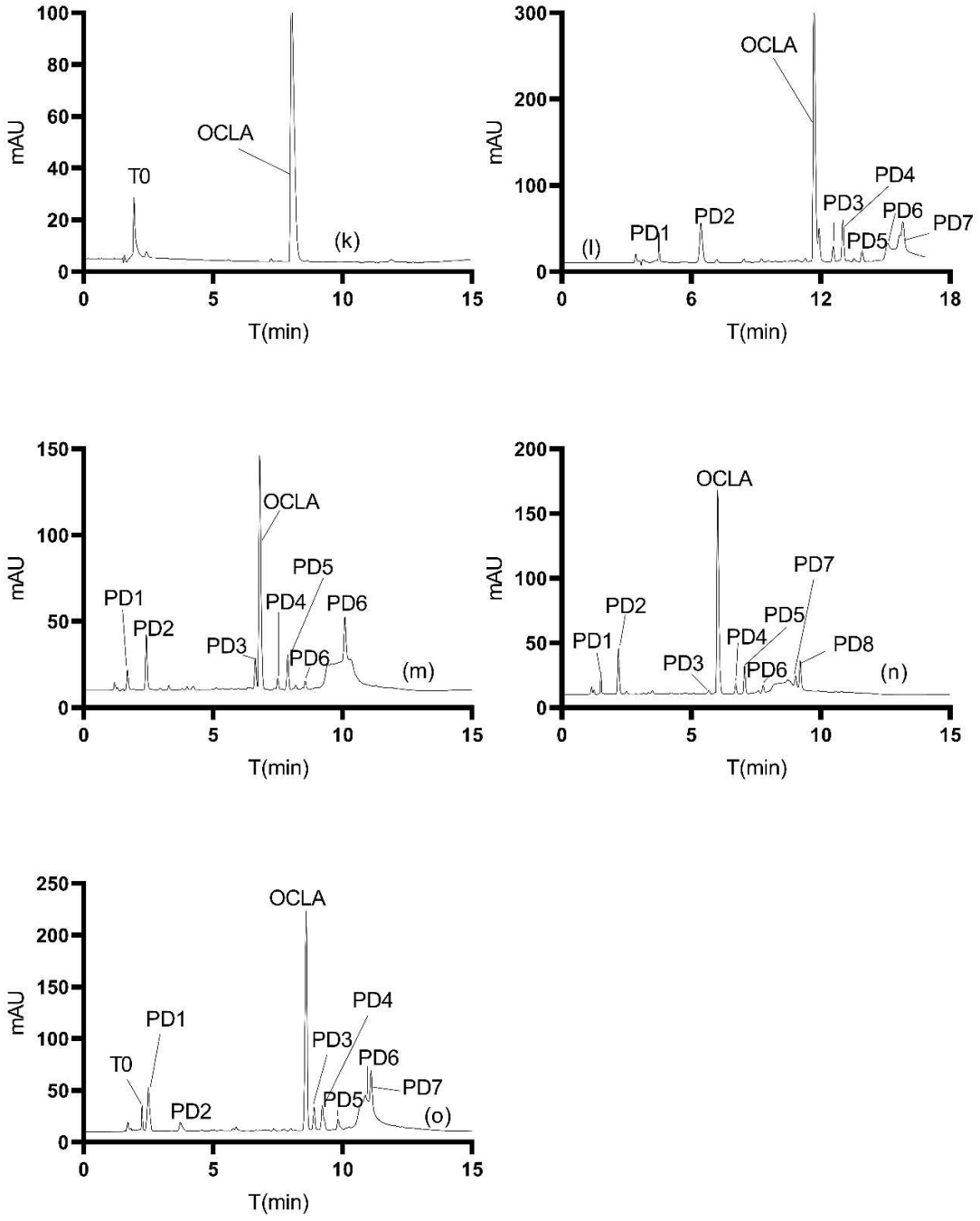
NOTA: (a) = CONTROLE; (b) = TAXA DE FLUXO 1 mL.min^{-1}, pH 2,5; (c) =TAXA DE FLUXO 1 mL.min^{-1}, pH 3,8; (d) = TAXA DE FLUXO 0,5 mL.min^{-1}, pH 3,15; (e) = TAXA DE FLUXO 1,5 mL.min^{-1}, pH 3,15, RESPECTIVAMENTE; VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, 25°C, DETECÇÃO EM λ=254 nm, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, ELUIDO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B), COLUNA C 8. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 29 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 32 ºC



NOTA: (f) = CONTROLE; (g) = TAXA DE FLUXO 1 mL.min^{-1}, pH 3,15; (h) = TAXA DE FLUXO 0,5 mL.min^{-1}, pH 2,5; (i) = TAXA DE FLUXO 1,5 mL.min^{-1}, pH 2,5; (j) = TAXA DE FLUXO 1,5 mL.min^{-1}, pH 3,8; RESPECTIVAMENTE; VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, 25°C, DETECÇÃO EM λ=254nm, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, ELUIDO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 15 min 5%B), COLUNA C 8. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 30 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A FASE DE OTIMIZAÇÃO COM A TEMPERATURA DE 44 ºC



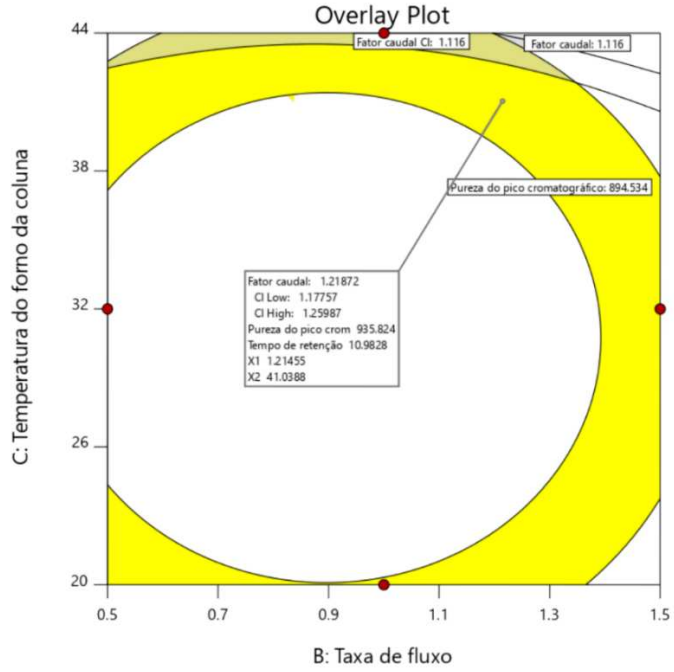
NOTA: (k) = CONTROLE; (l) = TAXA DE FLUXO 0,5 mL.min^{-1}, pH 3,15; (m) = TAXA DE FLUXO 1,5 mL.min^{-1}, pH 2,5; (n) = TAXA DE FLUXO 1,5 mL.min^{-1}, pH 3,8; (o) = TAXA DE FLUXO 1 mL.min^{-1}, pH 3,15, RESPECTIVAMENTE; VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, 25°C, DETECÇÃO EM λ=254nm, CONCENTRAÇÃO DE 200 µg.mL^{-1}, ELUIDO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 8,8 min 27% B, 8,9 - 10 min 27%B, 10 -12 min 5%B e 12,01 - 18 min 5%B), COLUNA C 8. FONTE: O autor (2021).

4.6.5. Região operacional do desenho do método

Na FIGURA 31 foi apresentado a sobreposição de todos experimentos pré-definidos por planejamento experimental de Box-Behnken através de Overlay plot. O ponto bandeira foi definido baseando-se com o propósito do método. Esta região é considerada a mais robusta e que pode ser operável durante a etapa de otimização do método indicativo de estabilidade de OCLA.

Os resultados obtidos para a análise de confirmação demonstraram que os experimentos observados condizem com o predito pelo o MODR. As condições analisadas foram temperatura do forno de 41ºC, taxa de fluxo de 1,2 mL.min^{-1}, pH 2,5 e os resultados da confirmação foram apresentados na TABELA 15.

FIGURA 31 – DEFINIÇÃO DOS PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS OTIMOS ATRAVÉS DO GRAFICO DE OVERLAY PLOT



FONTE: O autor (2021).

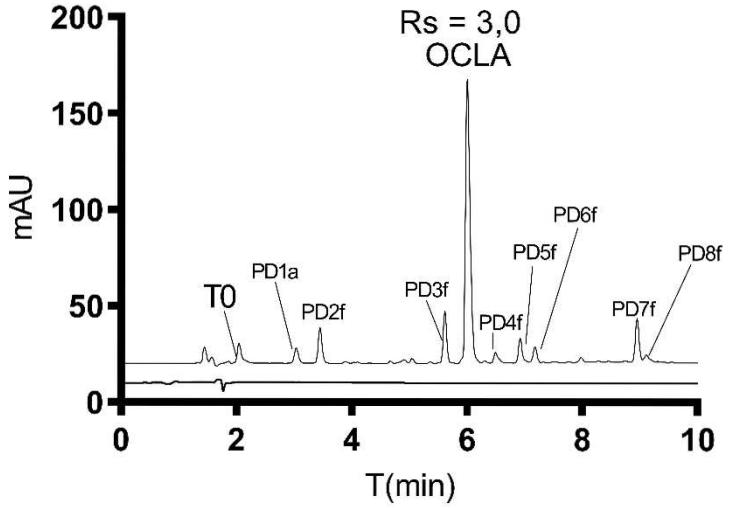
TABELA 15 – CONFIRMAÇÃO DOS PARAMETROS CROMATOGRAFICOS PREVISTOS PELA REGIÃO OPERACIONAL DO DESENHO DO MÉTODO

CQAs	Media prevista	IC 95%	Valor observado	n
Fator caudal do OCLA	1,25139	1,15145 – 1,3513	1,323	3
Pureza do OCLA	926,543	727,267 – 1125,82	999,809	3
tR do último pico	10,297	9,4346 – 11,0435	9,574	3

NOTA: CQAS = ATRIBUTO CRITICO DE QUALIDADE. tR = TEMPO DE RETENÇÃO; n = NÚMERO DE RÉPLICAS. FONTE: O autor (2021).

Após a confirmação dos parâmetros cromatográficos por MODR, foi obtido o resultado do cromatograma final otimizado que foi demostrado na FIGURA 32, a otimização do método final foi estabelecida utilizando a temperatura de forno de 41 ºC, taxa de fluxo de 1,2 mL.min^{-1} e pH da fase móvel de 2,5 contendo 0,1% de ácido fórmico, respectivamente. Eluido por gradiente (0,0 min 5% B; 0,0 - 6,7 min 27% B, 6,8 - 10 min 27%B, 10 min 5%B) de água contendo 0,1% de ácido fórmico.

FIGURA 32 – CROMATOGRMA FINAL OTIMIZADO DE OCLACITINIBE E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO



NOTA: COLUNA XBRIDGE C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO, ACETONITRILA, pH 2,5, TAXA DE FLUXO 1,2 mL.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 41°C, DETECÇÃO EM 254 nm, ELUIDO POR MODO GRADIENDE (0,0 min 5% B; 0,0 - 6,7 min 27% B, 6,8 - 10 min 27%B, 10 min 5%B); PD = PRODUTO DE DEGRADAÇÃO; Rs = RESOLUÇÃO; T0 = TEMPO MORTO. FONTE: O autor (2021).

4.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

4.7.1. Teste de adequação do sistema cromatográfico

O teste de adequação do sistema, foi avaliado através da injeção de amostra de padrão de OCLA e de amostra degradada, utilizando método otimizado. O sistema CLAE-DAD foi considerado adequado, pois o fator caudal dos picos cromatográficos foi< 1,5, a resolução dos picos cromatográficos foi> 2, eficiência cromatográfica foi> 2000. O resultado do teste de adequação do sistema foi representado na TABELA 16.

TABELA 16 – TESTE DE ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

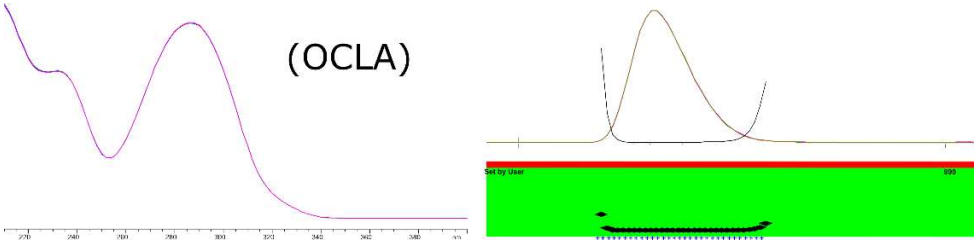
Pico cromatográfico	tR (min)	Rs	n	Fator caudal	Pureza do pico
OCLA	6,005	3,015	26639	1,3734	999,841
PD 1	3,040	7,634	8391	1,186	999,444
PD 2	3,452	3,238	12997	1,149	999.842
PD 3	6,495	2,294	31787	1,402	998,487
PD 4	6,923	3,289	58487	1,457	968,859
PD 5	7,181	2,153	53098	0,990	994,959
PD 6	7,980	6,550	71986	1,141	979,125
PD 7	8.951	8,097	88310	1,167	999,536
PD 8	9.111	2,643	61249	1,486	997,623

NOTA: tR = TEMPO DE RETENÇÃO; Rs = RESOLUÇÃO; n= NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS. FONTE: O autor (2021).

4.7.2. Seletividade

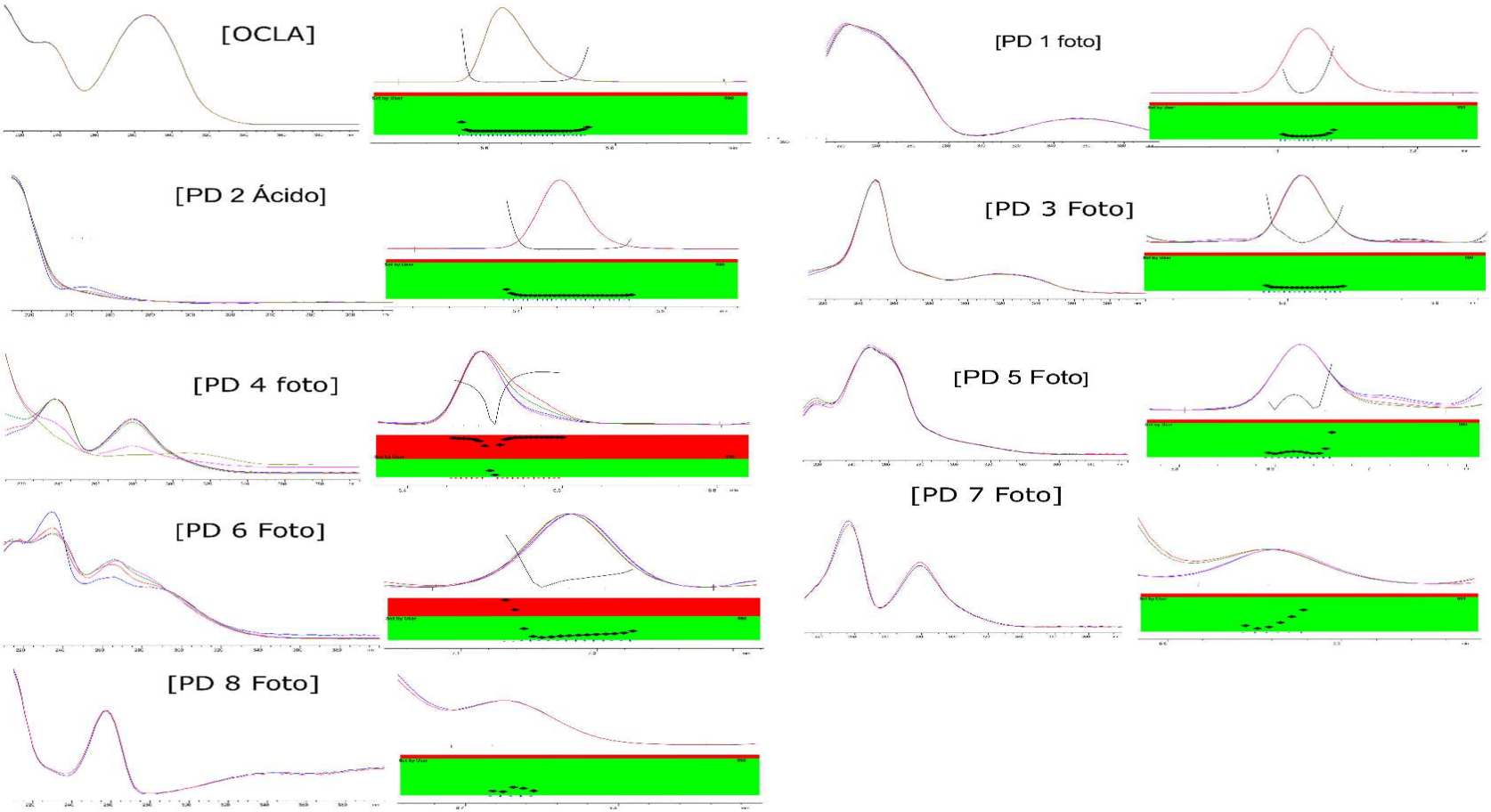
O software ChemStation, mostrou que OCLA teve pico cromatográfico puro indicando que não houve coeluição entre OCLA, branco, placebo, diluentes e seus PDs durante a separação dos analitos. Na FIGURA 33 foi apresentado o espectro de absorção de OCLA. Os PDs formados durante os ensaios de estresse de OCLA, tiveram os picos cromatográficos puros, exceto os PD4 e PD6, que houve coeluição, durante a separação. O método foi considerado seletivo, pois, tem a capacidade de avaliar o pico cromatográfico de interesse (OCLA) na presença de interferentes como PDs, placebo, branco e diluente, respectivamente. Os espectros de absorção de pureza dos picos cromatográficos (PDs) foram apresentados na FIGURA 34. Outra forma de observar ausência de interferência foi comparando os cromatogramas da solução padrão de OCLA, da solução branca e do placebo, onde não foi verificado nenhum pico no cromatograma característico de excipientes (placebo), de OCLA e branco, respectivamente. Na FIGURA 35 é apresentado a sobreposição dos picos característicos da solução padrão de OCLA, branca e placebo, respectivamente.

FIGURA 33 – ESPECTRO DE UV DE ABSORBÂNCIA DE PADRÃO DE OCLACITINIBE PARA ENSAIO DE SELETIVIDADE



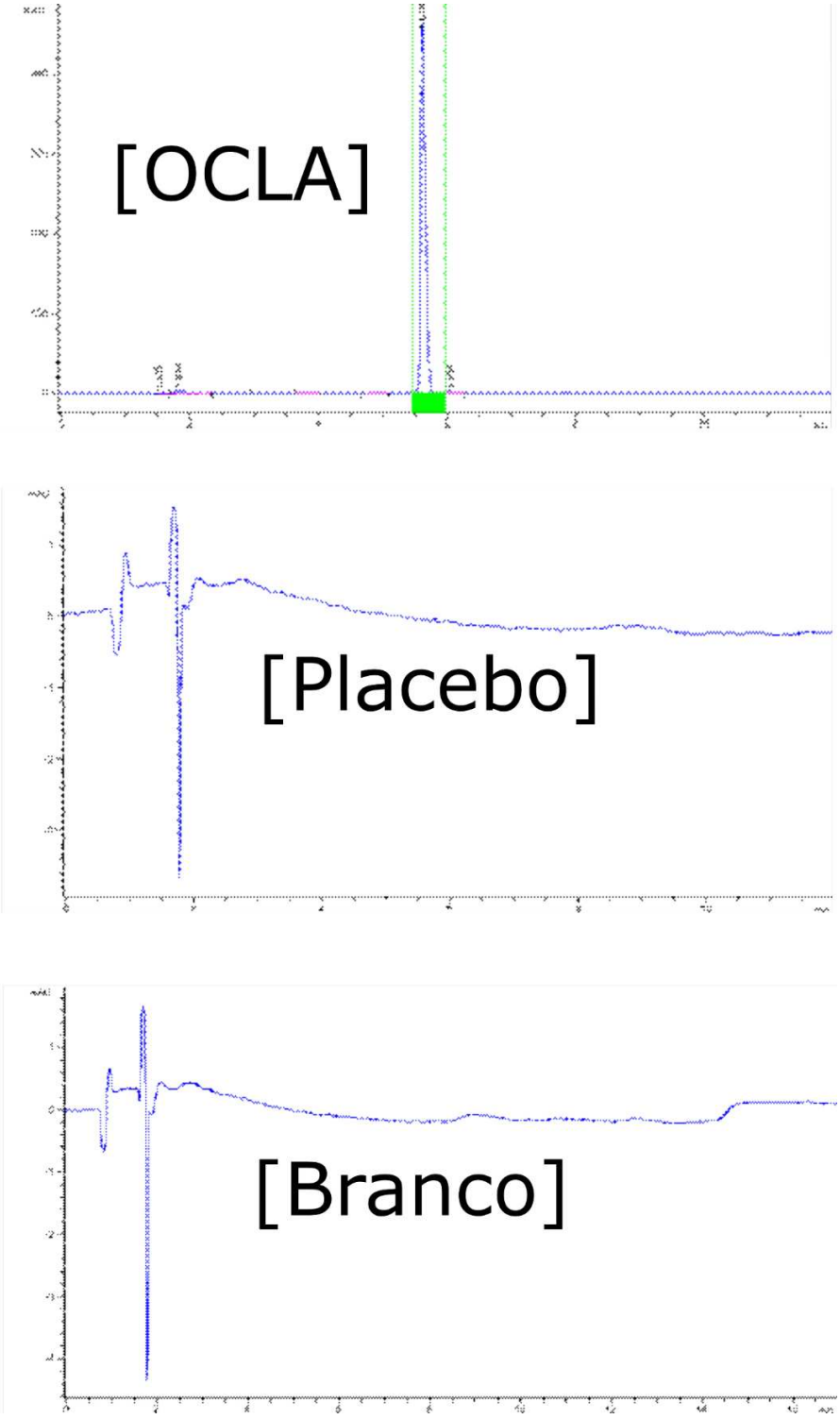
FONTE: O autor (2021).

FIGURA 34 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE OCLACITINIBE E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO



NOTA: OCLA = OCLACITINIBE; PD = PRODUTO DE DEGRADAÇÃO. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA CARACTERÍSTICO SOLUÇÃO PADÃO, PLACEBO E BRANCO



NOTA: COLUNA XBRIDGE C8 (150 X 4,6 mm, 5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO pH 2,5, ACETONITRILA, TAXA DE FLUXO DE 1,2 ml.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 41°C, DETECÇÃO EM 254 nm, O MODO DE ELUIÇÃO POR GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 6,7 min 27% B, 6,8 - 10 min 27%B, 10 5%B). FONTE: O autor (2021).

4.7.3. Linearidade e intervalo de trabalho

A curva de calibração foi estudada utilizando cinco níveis de concentração (80 - 240 $\mu g.mL^{-1}$), em triplicatas. Os resultados das áreas obtidas, sendo demostrado na TABELA 17.

TABELA 17 – ÁREA PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OCLACITINIBE

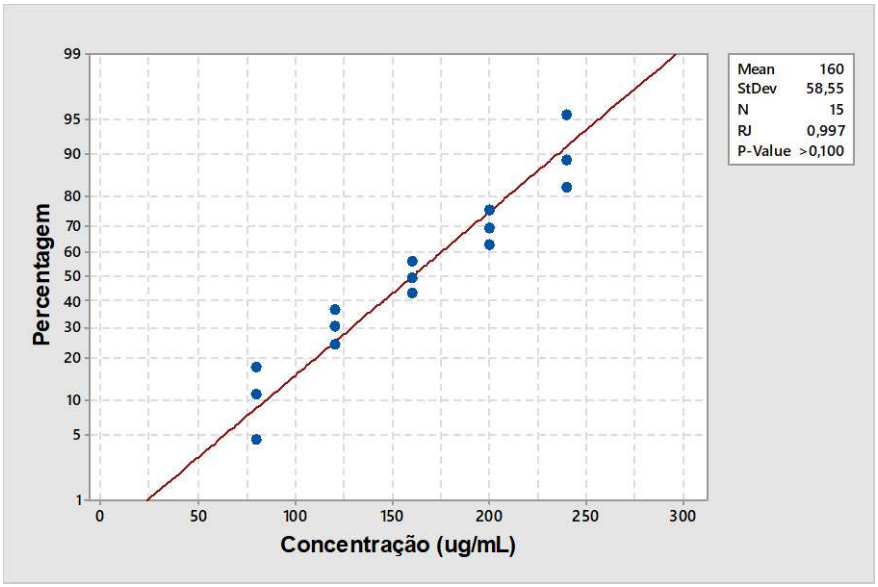
Nível	Concentração ($\mu g.mL^{-1}$)	Replicas			Média	DPR (%)
		Área 1	Área 2	Área 3		
1	80	1125,3	1192,0	1150,5	1155,933	2,914
2	120	1874,3	1868,5	1860,7	1867,833	0,365
3	160	2433,3	2548,7	2463,4	2481,800	2,412
4	200	3200,8	3261,2	3187,2	3216,400	1,225
5	240	3861,8	3944,2	4045,5	3950,500	2,329

NOTA: DPR = DESVIO PADRÃO RELATIVO. FONTE: O autor (2021).

Para realizar a análise de regressão, foram avaliados os pré-requisitos delas, primeiramente foi avaliado teste de normalidade dos resíduos dos dados, os resultados sendo apresentado na FIGURA 36, utilizando teste de normalidade de Ryan-Joiner, que mostrou que os resíduos dados seguem uma distribuição normal, o teste de Ryan-Joiner apresentou um valor de 0,997, com valor de p> 0,100, rejeitando-se a hipótese alternativa, indicando que os resíduos apresentam uma distribuição normal. Em seguida foi avaliada a homocedasticidade dos resíduos através de teste de igualdade de variância, utilizando teste de Levene. Na qual a hipótese nula representa igualdade das variâncias, enquanto a hipótese alternativa representa que há pelo menos uma variância diferente, com alfa de 0,05. O teste de Levene demostrou que as variâncias foram semelhantes ao longo da distribuição, com valor de p> 0,05, rejeitando-se a hipótese alternativa, mostrando que os dados foram homocedastico, os resultados foram demostrados na FIGURA 37 e 38, respectivamente.

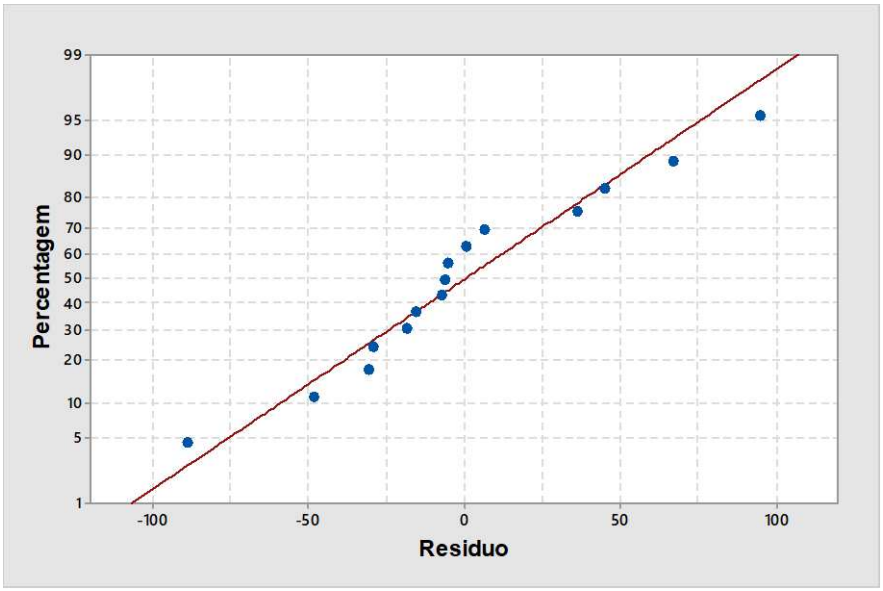
Autocorreção dos resíduos foi avaliada utilizado teste de Durbin-Watson, que apesentou um valor de 1,97659, indicando que não houve autocorrelação dos resíduos dos dados observados. Os valores de intervalo de Durbin-Watson devem estar entre (1,5 a 2,5), na TABELA 18 é apresentado o resumo estatístico para avaliação dos resíduos dos dados.

FIGURA 36 – GRÁFICO DE TESTE DE NORMALIDADE DOS RESÍDUOS



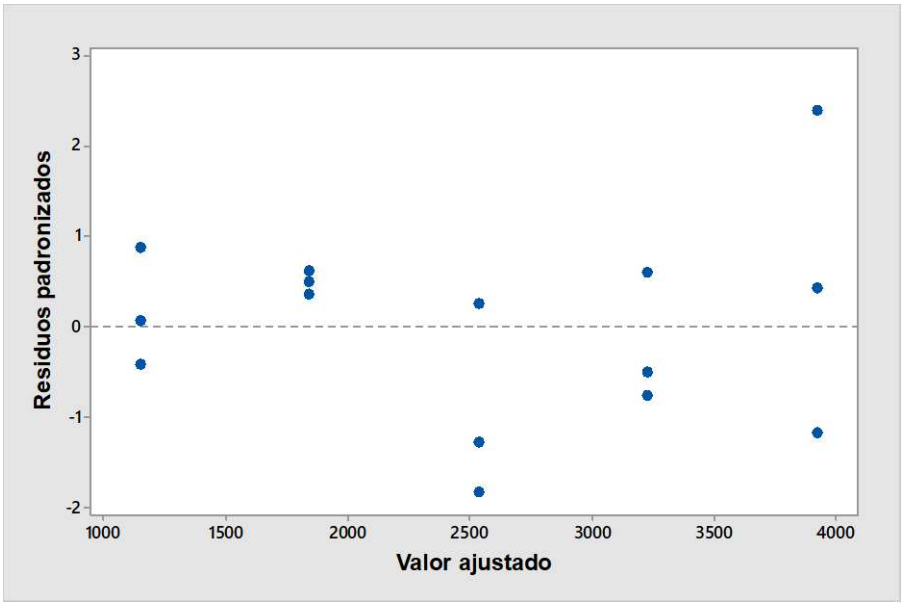
NOTA: N = NÚMERO DE RÉPLICAS; RJ = VALOR DE RYAN-JOINER. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 37 – GRÁFICO DE PROBABILIDADE NORMAL DOS RESÍDUOS



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 38 – RESÍDUOS PADRONIZADOS VERSUS VALOR AJUSTADO DA REGRESSÃO



FONTE: O autor (2021).

TABELA 18 – ESTATÍSTICA UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS DA REGRESSÃO LINEAR

Teste	Estatística	Média	DP	p-valor	Avaliação dos resíduos
Ryan-Joiner	0,997	160	58,55	>0,100	Normalidade
Levene	7,51	-	-	0,111	Homocedasticidade
Durbin-Watson	1,97659	-	-	-	Auto correlação

NOTA: DP = DESVIO PADRÃO. FONTE: O autor (2021).

Após a avaliação da normalidade, homocedasticidade, autocorrelação dos resíduos, como requisitos para análise de regressão linear. A pois isso, foram avaliados coeficientes de correlação de Pearson (R), de determinação (R^2), angular, linear através de t *Student*, e análise de variância (ANOVA). O resultado da regressão linear sugere o coeficiente de correlação de Pearson R> 0,999, mostrando que existe uma boa correlação entre as variáveis contínuas (x e y). Além disso, o coeficiente de determinação foi R^2> 0,997. Demostrando que o modelo de regressão proposto explica 99,7% de confiabilidade da variância dos dados. O teste t de *Student* obteve significância variável para coeficiente angular que apresentou um valor de p< 0.001, e de coeficiente linear p =0.067, demostrando que a determinação da concentração de OCLA foi obtida apenas através das áreas dos picos cromatográfico, resultado sendo demostrado na TABELA 19. O nível de significância de ANOVA, foi p< 0.001,

sugerindo que o ajuste do modelo de regressão é estatisticamente significativo TABELA 20. A representação gráfica da resposta (y) em função da concentração do analito (x) e os cromatogramas obtidos durante validação do método desenvolvido foram apresentados na FIGURA 39 e 40, respectivamente. Na TABELA 21 foi apresentado o resumo do resultado de curva de calibração e regressão linear de OCLA.

TABELA 19 – COEFICIENTES DE REGRESSÇAO LINEAR DE OCLACITINIBE

Modelo	Valor	DP	Teste t	p-valor	95% de intervalo de confiança para os coeficientes	
					Nível baixo	Nível alto
Coeficiente angular		0,26	65,9	0,0001	16,78	17,9
Coeficiente linear		44,65	- 5,39	0,067	- 337,05	- 144,29
R	0,999			0,0001		
R^2	0,997					

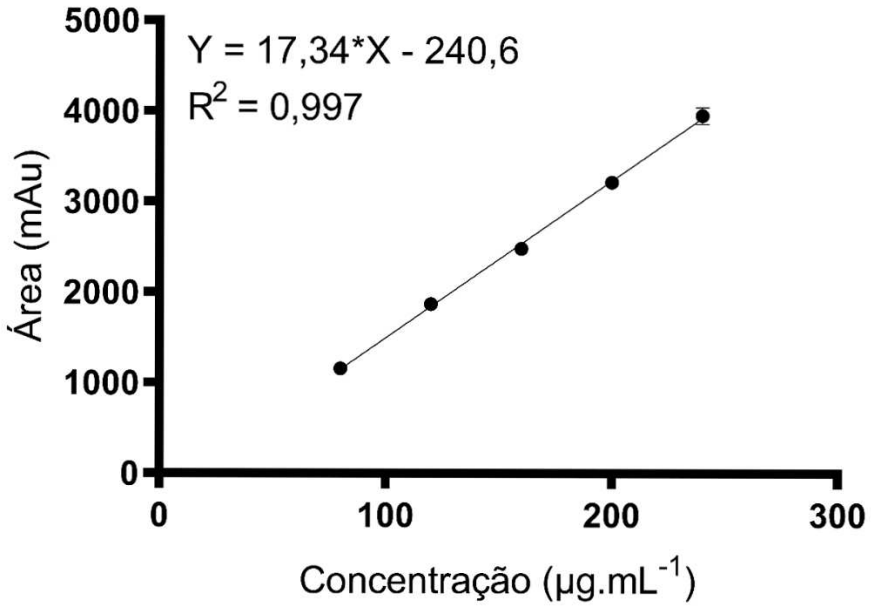
NOTA: R = COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE PEARSON; R^2 = COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO; DP = DESVIO PADRÃO. FONTE: O autor (2021).

TABELA 20 – ANALISE DE VARIÂNCIA DE OCLACITINIBE

Modelo	gl	SQ	MQ	Teste F	p-valor
Regressão	1	14439504,387	14439504,387	4345,87	0,0001
Resíduo	13	43193,522	3322,579	-	-
Total	14	14482697,909	-	-	-

NOTA: gl = GRAU DE LIBERDADE; SQ = SOMA QUADRÁTICA; MQ = MÉDIA QUADRÁTICA. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 39 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DE OCLACITINIBE ENTRE 80–240 µg.mL-1



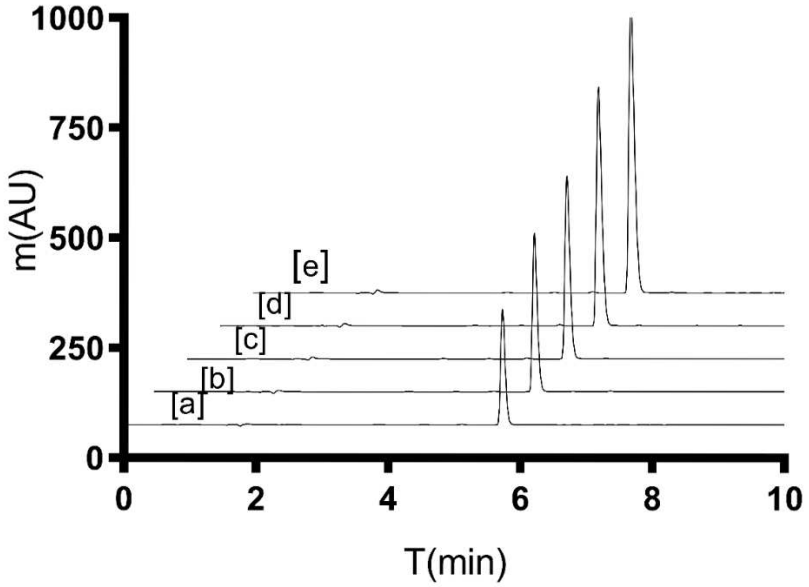
FONTE: O autor (2021)

TABELA 21 – RESUMO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO E REGRESSÃO LINEAR DE OCLACITINIBE

Intervalo de trabalho (µg.mL^{-1})		Teste t	p-valor
Equação	Y = 17,34*X - 240,6		
Coeficiente de correlação (R)	0,999		0,0001
R^2	0,997		
Coeficiente angular	17,34	65,9	0,0001
Coeficiente linear	-240,6	- 5,39	0,067
LD	10,89 µg.mL^{-1}		
LQ	33,01 µg.mL^{-1}		

NOTA: R^2 = COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO; LD = LIMITE DE DETECÇÃO; LQ = LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO; µg.mL^{-1} = MICROGRAMA POR MILÍMETROS. FONTE: O autor (2021).

FIGURA 40 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DURANTE A LINEARIDADE DO MÉTODO EM CINCOS PONTOS ENTRE 80–240 µg.mL^{-1}



NOTA: COLUNA XBRIDGE C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm); FASE MÓVEL CONSTITUÍDA POR ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO pH 2,5, TAXA DE FLUXO DE 1,2 mL.min^{-1}, VOLUME DE INJEÇÃO DE 12 µL, TEMPERATURA DO FORNO DE 41°C, DETECÇÃO EM λ=286 nm, ELUIDO POR MODO GRADIENTE (0,0 min 5% B; 0,0 - 6,7 min 27% B, 6,8 - 10 min); [a], [b], [c], [d] E [e] = CONCENTRAÇÃO DE 80, 120, 160, 200 E 240 µg.mL^{-1}, RESPECTIVAMENTE. FONTE: O autor (2021).

4.7.4: Precisão e exatidão

A repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediaria (inter-dia) foram avaliadas em triplicata, utilizando-se três concentrações diferentes 80, 160 e 240 µg.mL^{-1} fortificadas com excipientes como descrito no tópico 3.9.5.

A precisão intra-dia e inter-dia foram avaliadas a partir de amostras preparadas nas mesmas condições pelo mesmo analista no mesmo dia. Foram analisadas no CLAE-DAD. A precisão intermediaria (inter-dia) foi avaliada através teste t *Student*, em cada nível de concentração entre analistas diferentes e em diferentes dias. Onde os valores obtidos para o teste t *Student*, mostraram que as medias das áreas obtidas são estatisticamente equivalentes (iguais), com p> 0,05. Concluindo-se que a precisão inter-dia entre os analistas são semelhantes, o resultado sendo demostrada na TABELA 22.

O método desenvolvido foi considerado exato, por apresentar valores de DPR inferior 3%. A recuperação foi determinada pelo método de adição de padrão e

porcentagem de recuperação encontrada foi de 97,97 para a concentração 80 µg.mL-1, 98,59 para a de concentração de 160 µg.mL^{-1} e 98,36 para a concentração de 240 µg.mL^{-1}, respectivamente. Os resultados da exatidão foram apresentados na TABELA 23.

O método foi considerado preciso e exato, pois apresentou valores de DPR inferior a 3%.

TABELA 22 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS DE PRECISÃO INTRA-DIA E INTERMEDIARIA DE OCLACITINIBE

Precisão														
Parâmetro		Repetibilidade					Precisão intermediaria						Teste estatístico	
		Ensaio 1					Ensaio 2						p-valor	
(µg.mL^{-1})	n=3	Tempo 1	Tempo 2	Média	DP	DPR	n=3	Analista 1	Analista 2	Média	DP	DPR	Teste t	Teste F
		950,9	948,2					962.3	988.5					
80	3	967,6	951,1	957,7	8,6	0,9	3	943.3	952.7	956,3	17,3	1,8	0.4014	0.3929
		954,7	945,0					943.3	947.9					
		2027,2	1975,9					2028.9	2035.4					
160	3	2028,0	2029,3	2049,6	38,1	1,9	3	2036.0	2059.3	2029,7	19,6	1,0	0.8219	0.1760
		2093,5	2057,0					2017.9	2000.9					
		3078,8	3088,8					3079.6	3154.6					
240	3	3026,5	3137,4	3040,2	33,9	1,1	3	3127.9	3144.8	3116,6	30,3	1,0	0.1972	0.8787
		3015,3	3126,1					3091.5	3101.2					

TESTE T *STUDENT* COM NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95% (VALOR p NÍVEL BAIXO = 0,4014; VALOR p NÍVEL MÉDIO = 0,8219; VALOR p NÍVEL ALTO = 0,1972 E TESTE F DE COMPARAÇÃO DE VARIÂNCIAS EM NÍVEL BAIXO = 0,3929; NÍVEL MÉDIO = 0,1760; NÍVEL ALTO = 0,8787), RESPECTIVAMENTE DP = DESVIO PADRÃO; DPR = DESVIO PADRÃO RELATIVO. FONTE: O autor (2021).

TABELA 23 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS DE EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO DE OCLACITINIBE

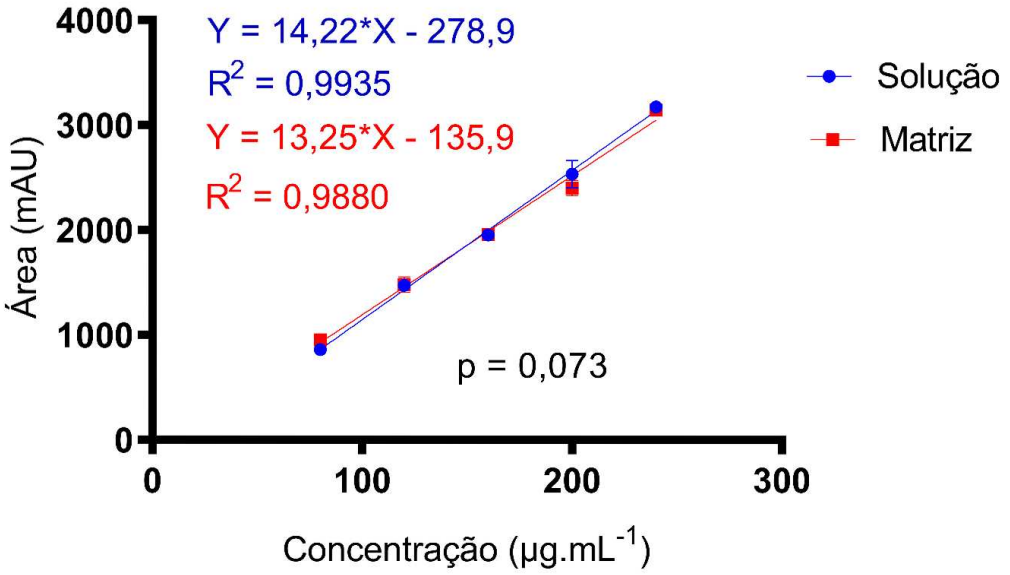
Nível	Concentração (µg.mL^{-1})	Área teórica			Área observada		DPR	Recuperação (%)
		Área	Media ± DP	DPR	Área	Media ± DP		
		975,2			975,9			
Baixa	80	988,5	986,7 ± 10,7	1,1	968,7	966,7 ± 10,4	1,1	97,97,
		996,3			955,4			
		1975,1			1955,5			
Média	160	1956,6	1958,2 ± 16,2	0,8	1927,9	1930,5 ± 23,8	1,2	98,59
		1942,9			1908,2			
		3383,5			3237,5			
Alta	240	3296,8	3318,6 ± 57,2	1,7	3265,6	3264,3 ± 26,1	0,8	98,36
		3275,4			3289,7			

NOTA: DP = DESVIO PADRÃO; DPR = DESVIO PADRÃO RELATIVO. FONTE: O autor (2021).

4.7.5. Efeito matriz

O efeito matriz do método foi determinado através da regressão linear, onde foram comparados os valores de coeficiente angular entre as curvas de calibração da solução padrão de OCLA e solução fortificada com excipientes. Observa-se um paralelismo entre as duas curvas de calibração e o teste de comparação de coeficiente angular e linear apresentou p-valor> 0,073 (FIGURA 41). O p-valor para teste t *Student* e F de comparação de variância foram (p> 0,9836 e p> 0,8979), respectivamente. Estes resultados demostram que ambas curvas de calibração são estatisticamente iguais (semelhantes). Na TABELA 24 é apresentado os valores de DP e DPR %, de ambas curvas de calibração, respectivamente.

FIGURA 41 – COMPARAÇÃO DA CURVA EM SOLUÇÃO E EM MATRIZ 80–240 µg.mL^{-1}



FONTE: O autor (2021)

TABELA 24 – RESULTADOS OBTIDOS PARA EFEITO MATRIZ

Solução	DPR	Efeito matriz	DPR
Média ± DP		Média ± DP	
856,83 ± 17,86	2,08	950,73 ± 7,34	0,77
1471,00 ± 19,17	1,36	1477,90 ± 20,47	1,42
1951,67 ± 55,05	2,82	1955,00 ± 17,85	0,91
2532,73 ± 90,83	3,11	2399,70 ± 75,75	3,16
3170,27 ± 35,96	1,13	3140,67 ± 53,74	1,71

NOTA: DP = DESVIO PADRÃO; DPR = DESVIO PADRÃO RELATIVO. FONTE: O autor (2021).

4.7.6. Limite de detecção e de quantificação

Os valores de LD e LQ foram avaliados utilizando-se os parâmetros da curva de calibração (equação 5 e 6), respectivamente. A partir do PD do intercepto da curva e coeficiente angular. Para isso o LD encontrado foi de 10,89 µg.mL^{-1} e o valor de LQ encontrado foi de 33,01 µg.mL^{-1}. Na TABELA 25 são mostrados os resultados do coeficiente angular e linear para avaliar o LD e LQ do método desenvolvido para OCLA.

TABELA 25 – COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR DE OCLACITINIBE

Parâmetro	R1	R2	R3	Média da curva	DP	DPR
IC	17,00	17,24	17,79	17,343	0,41	2,4
Intercepto	-220,7	-195,9	-305,1	-240,57	57,25	-23,8

NOTA: IC = CURVA DE INCLINAÇÃO, DP = Desvio padrão, DPR = DESVIO PADRÃO RELATIVO; LD = LIMITE de detecção; LQ = LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO; FONTE: O autor (2021).

$$LD = \frac{3{,}3 \times DP\ (Intercepto)}{IC} = \frac{3{,}3 \times 57{,}25}{17{,}343} = \frac{188{,}9}{17{,}34} = 10{,}89\ \mu g.mL^{-1} \quad (5)$$

$$LQ = \frac{10 \times DP\ (Intercepto)}{IC} = \frac{10 \times 57{,}25}{17{,}343} = \frac{572{,}5}{17{,}34} = 33{,}01\ \mu g.mL^{-1} \quad (6)$$

Conforme os valores de LD e LQ, pode-se afirmar que é possível detectar e quantificar OCLA através da CLAE-DAD.

A reprodutibilidade do LQ foi verificada injetando amostra de solução padrão de OCLA em triplicatas, os resultados obtidos apresentaram o DPR inferior 2%, indicando que o LQ é reprodutível, como foi ilustrado na TABELA 26. A exatidão do LQ foi demostrada da através da equação de reta da curva de calibração utilizando as a média da área experimentais do LQ. A porcentagem da concentração experimental do LQ obtida da curva de calibração apresentou um valor próximo da concentração teórica do LQ, que foi considerado 100%. Na equação 7 e 8 foram apresentadas a concentração e a porcentagem experimental do LQ. O valor do LQ encontrado teve uma exatidão de 96%.

TABELA 26 – CONFIRMAÇÃO DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

(µg.mL^{-1})	Área R1	Área R2	Área R2	Média	DP	DPR
LQ	307,6	306,9	308,0	307,500	0,5567803	0,1810668

NOTA: LQ = LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO; FONTE: O autor (2021).

$$\begin{gathered} y = \ ax + b \leftrightarrow 307{,}5 = 17{,}34x - 240{,}6 \\ 307{,}5 + 240{,}6 = 17{,}34x \ \leftrightarrow 548{,}1 = 17{,}34x \\ x = \frac{548{,}1}{17{,}34} = 31{,}61 \ \mu g.mL^{-1} \end{gathered} \tag{7}$$

$$\begin{gathered} 33{,}01 \ \mu g.mL^{-1} = 100 \ \% \\ 31{,}61 \ \mu g.mL^{-1} = \ x \\ 31{,}61 \ \mu g.mL^{-1} \times 100 \ \% \ = 33{,}01 \ \mu g.mL^{-1}x \\ 3161 \ \mu g.mL^{-1}\% = \ 33{,}01 \ \mu g.mL^{-1}x \ \leftrightarrow x = 95{,}76 \ \% \end{gathered} \tag{8}$$

4.7.7. Robustez

A robustez do método foi demonstrada variando-se de forma deliberada o valor de pH da fase móvel aquosa, a temperatura do forno e a taxa de fluxo, respectivamente. A robustez do método desenvolvido foi demonstrada pelo DPR %, teste *t Student* e teste F de comparação de variâncias. O resultado foi mostrado na TABELA 27, este resultado demostra que o método é robusto nas condições analisadas. O DPR foi inferir a 2% para o tempo de retenção e área do pico cromatográfico, respectivamente. O teste t *Student* e teste F de comparação de variância apresentaram (p >0,05), mostrando que as áreas são estatisticamente equivalentes (iguais).

TABELA 27 – RESULTADOS DE ROBUSTEZ DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE-DAD

Nível baixo (Temperatura do forno da coluna 40 ºC; pH 2,45; taxa de fluxo 1,15 mL.min^{-1})										
	Tempo de retenção					Área				
λ (nm)	tR 1	tR 2	tR 3	Média de tR	DPR de tR	Média da Área 1	Média da Área 2	DPR	Teste t	Teste F
330	5,881	5,810	5,820	5,837	0,658	137,49	137,07	0,21	0,8182	0,4369
286	5,881	5,810	5,820	5,837	0,658	2712,69	2798,03	0,58	0,1169	0,3013
280	5,881	5,810	5,820	5,837	0,658	2598,15	2619,63	0,58	0,5163	0,9058
260	5,881	5,810	5,820	5,837	0,658	1088,03	1094,07	0,39	0,7082	0,9075
254	5,881	5,810	5,820	5,837	0,658	860,27	854,96	0,44	0.5707	0,2534
Condição de trabalho (Temperatura do forno da coluna 41 ºC; pH 2,5; taxa de fluxo 1,2 mL.min^{-1})										
λ (nm)	tR 1	tR 2	tR 3	Média de tR	DPR de tR	Média da Área 1	Média da Área 2	DPR	Teste t	Teste F
330	5,691	5,686	5,698	5,692	0,106	135,66	134,79	0,45	0,3353	0,5150
286	5,691	5,686	5,698	5,692	0,106	2815,23	2784,01	0,79	0,0563	0,3585
280	5,691	5,686	5,698	5,692	0,106	2535,31	2582,36	1,30	0,2082	0,6887
260	5,691	5,686	5,698	5,692	0,1056	1056,04	1048,87	0,48	0,5762	0,3659
254	5,691	5,686	5,698	5,692	0,1056	840,75	846,73	0,50	0,1718	0,6569
Nível alto (Temperatura do forno da coluna 42 ºC; pH 2,55; taxa de fluxo 1,25 mL.min^{-1})										
λ (nm)	tR 1	tR 2	tR 3	Média de tR	DPR de tR	Média da Área 1	Média da Área 2	DPR	Teste t	Teste F
330	5,602	5,610	5,623	5,612	0,188	127,23	126,59	0,35	0,6554	0,082
286	5,602	5,610	5,623	5,612	0,188	2536,49	2542,75	0,17	0,1303	0,8012
280	5,602	5,610	5,623	5,612	0,188	2404,24	2427,36	0,68	0,5047	0,7386
260	5,602	5,610	5,623	5,612	0,188	1006,19	1014,74	0,59	0,3632	0,2825
254	5,602	5,610	5,623	5,612	0,188	790,12	804,35	1,26	0,2136	0,060

NOTA: TESTE t = TESTE t STUDENT; TESTE F = TESTE F DE COMPARAÇÃO DE VARIANCIA; DPR = DESVIO PADÃO RELATIVO; tR = TEMPO DE RETENÇÃO. FONTE: O autor (2021).

5. CONCLUSÃO

O OCLA mostrou-se sensível às condições de estresse fotolitica e ácida, sendo bastante fotossensível. OCLA foi bastante estável frente as condições de estresses térmica, oxidativa e hidrolise (alcalina, neutra), resistindo a degradação nestas condições de estresse testadas. Ao todo foram detectados 8 PDs, sendo um na condição ácida e 7 na condição de estresse fotolitica.

A abordagem sistemática do AQbD, propicia um melhor conhecimento sobre o processo de desenvolvimento e entendimento das interações das variáveis analíticas, agregando qualidade no desenvolvimento, isto gera economia e da mais celeridade ao desenvolvimento e é possível através de ajustes dirigidos melhorar o método.

O ponto ótimo experimental foi definido através do projeto de Box Behnken, o método final otimizado foi estabelecido através do overlay plot do MODR, utilizando coluna Xbridge C 8, fase móvel aquosa constituída por água contendo 0,1% de ácido fórmico com pH 2,5 e ACN, taxa de fluxo 1,2 $mL.min^{-1}$, volume de injeção de 12 µL, temperatura do forno de 41°c, detecção em λ= 254 nm, modo de eluição gradiente na proporção de 73 - 95% de água contendo 0,1% de ácido fórmico.

Este método otimizado foi validado e mostrou-se seletivo, linear, isento de efeito matriz, preciso, exato e robusto. O método desenvolvido foi capaz de detectar e pode ser utilizado para quantificar OCLA na presença de seus PDs.

Como perspectivas futuras deste trabalho envolvem a identificação dos PDs utilizando cromatografia liquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

Agência Europeia do Medicamento. Apoquel - Folheto Informativo. p. 1–25, 2013. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2016/20160517134961/anx_134961_pt.pdf>.

Agrahari, V.; Bajpai, M.; Nanda, S. Essential concepts of mobile phase selection for Reversed phase HPLC. Research Journal of Pharmacy and Technology, v. 6, n. 5, p. 459–464, 2013.

Aishbagh, I. P. L. L. Basic Skills Training Guide -HPLC method development and validation- an overview. n. December, 2017.

ANVISA. Guia Nº 4 da ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1–22, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degradação+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902>.

ANVISA, A. N. de V. S.-M. da S. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Diário Oficial da União, v. 216, p. 1–27, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898778/RDC_318_2019_.pdf/72014894-122d-433e-97b0-2c48bfb4ab54>.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No. 166, de 24 de Julho de 2017, Dispõe Sobre a Validação de Métodos Analíticos e Dá Outras Providências; DOU 25/07/2017, Brazil. Available at https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf, accessed in January 2019.

Bäumer, W. Pharmacotherapy of canine atopic dermatitis-current state and new trends. Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, v. 67, n. 1, p. 107–111, 2020.

Blessy, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.

Bradley, C. W. et al. Longitudinal Evaluation of the Skin Microbiome and Association with Microenvironment and Treatment in Canine Atopic Dermatitis. Journal of Investigative Dermatology, v. 136, n. 6, p. 1182–1190, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.023>.

Bhaskaran, N.A. L. Kumar, M.S. Reddy, G.K. Pai, An analytical “quality by design” approach in RP-HPLC method development and validation for reliable and rapid estimation of irinotecan in an injectable formulation, Acta Pharm. 71 (2021) 57–79.

https://doi.org/10.2478/acph-2021-0008.

Chaves, J. A. P. Aplicação do princípio de Quality by Design no processo de desenvolvimento analítico de métodos indicativos de estabilidade. p. 41, 2017.

Chermprapai, S. et al. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, v. 1860, n. 2, p. 526–533, 2018.

Chermprapai, S. The immune-pathogenesis of canine atopic dermatitis: Skin barrier, microbiome and inflammation. [s.l: s.n.]

Chermprapai, S.; Thengchaisri, N. A descriptive study of allergen-specific IgE serological tests for canine atopic dermatitis in Thailand. BMC Veterinary Research, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2020.

Cosgrove, S. B. et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. Veterinary Dermatology, v. 24, n. 6, 2013.

Collard, W. T., Hummel, B. D., Fielder, A. F., King, V. L., Boucher, J. F., Mullins, M. A., Malpas, P. B., Stegemann, M. R. The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog. J. vet. Pharmacol. Therap. 37, 279–285.

Da Costa, G. N. et al. Diretrizes Para Elaboração De Um Protocolo E Relatório De Estudo De Degradação Forçada De Medicamentos De Acordo Com a Rdc 53/2015. 3.

Datta, N. et al. Stability studies of pharmaceutical products. Infection, v. 13, n. January,http//doi/ org/10.20959/wjpr20191-13872 p. 15, 2014.

Deboer, D. J. The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. Veterinary Dermatology, v. 28, n. 1, p. 25-e6, 2017.

Eisenschenk, M. N. C. Phenotypes of Canine Atopic DermatitisUSA, 2020. .

Enciso, N. et al. Multidose intramuscular allogeneic adipose stem cells decrease the severity of canine atopic dermatitis: A pilot study. Veterinary World, v. 12, n. 11, p. 1747–1754, 2019.

Ferey, L. et al. UHPLC method for multiproduct pharmaceutical analysis by Quality-by-Design. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 148, p. 361–368, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.014>.

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. Special Issue, p. 1–16, 2018.

Gedon, N. K. Y.; Mueller, R. S. Atopic dermatitis in cats and dogs: A difficult disease for animals and owners. Clinical and Translational Allergy, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0228-5>.

Gonzales, A. J. et al. Oclacitinib (APoquel ®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 37, n. 4, p. 317–324, 2014.

Gonzales, A. J. et al. IL-31-induced pruritus in dogs: A novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. Veterinary Dermatology, v. 27, n. 1, p. 34-e10, 2016.

Gupta, K. Analytical Quality by Design: A Mini Review. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, v. 1, n. 6, p. 1555–1559, 2017.

Haugh, I. M.; Watson, I. T.; Alan Menter, M. Successful treatment of atopic dermatitis with the JAK1 inhibitor oclacitinib. Baylor University Medical Center Proceedings, v. 31, n. 4, p. 524–525, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08998280.2018.1480246>.

Hensel, P. et al. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. BMC Veterinary Research, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5>.

Howell, M. D.; Kuo, F. I.; Smith, P. A. Targeting the Janus Kinase Family in Autoimmune Skin Diseases. Frontiers in Immunology, v. 10, n. October, 2019.

ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. European Medicines Agency, n. January, p. 1–9, 1998. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002647.pdf>.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH); ICH Topic Q 1 A (R2) - Stability Testing of New Drug Substances and Products; ICH: London, UK, 2003

ICH Q2B guideline: validation of Analytical Procedures: methodology (revision 4), International Conference on Harmonization. 2005. Disponível em:<http:// www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline. pdf >.5.

Isabel M. Haugh, MB, Bao, BCH, IAN T. Watson and M. Alan Menter, M. Successful treatment of atopic dermatitis with the JAK1 inhibitor oclacitinib, 2021.

ISO 10977:1993: Photography - Processed Photographic Colour Films and Paper Prints - Methods for Measuring Image Stability; International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 1993

Janga, K. Y. et al. Photostability Issues in Pharmaceutical Dosage Forms and Photostabilization. AAPS PharmSciTech, v. 19, n. 1, p. 48–59, 2018.

Janzen, H. Forced degradation studies - comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Assuntos Regulatórios de Medicamentos) - Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade Rheinische Friedrich-Wilhelm-Bonn, Alemanha**,** 2016a.

Jatiani, S. S. et al. JAK/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: Approaches for targeted therapies. Genes and Cance**r**, v. 1, n. 10, p. 979–993, 2010.

Jayagopal, B.; Shivashankar, M. Analytical Quality by Design – A Legitimate Paradigm for Pharmaceutical Analytical Method Development and Validation . Mechanics, Materials Science & Engineering Journal, v. 9, n. April, p. 10, 2017.

KIM H et al. A Double-Blind, Placebo Controlled-Trial of a Probiotic Strain Lactobacillus sakei Probio-65 for the Prevention of Canine Atopic Dermatitis. Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, n. 11, p. 1966–1969, 2015. Disponível em: <http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1506.06065>.

Kommanaboyina, B.; Rhodes, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 25, n. 7, p. 857–868, 1999a.

Koury, J. et al. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral blood are associated with canine atopic dermatitis. PLoS ONE, v. 14, n. 6, p. 1–13, 2019.

Krishna, M. V. et al. Quality by Design (QbD) approach to develop HPLC method for eberconazole nitrate: Application oxidative and photolytic degradation kinetics. Journal of Saudi Chemical Societ**y**, v. 20, p. S313–S322, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.001>.

Lipscomb, H.; de Bellis, F. Management of canine atopic dermatitis. Companion Animal, v. 25, n. 6, p. 162–167, 2020.

Lloyd, D. K.; Bergum, J.; Wang, Q. Application of quality by design to the development and validation of analytical methods. [s.l.] Elsevier Ltd, 2020.

Martins, G. D. C. et al. Clinical-pathological and immunological biomarkers in dogs with

atopic dermatitis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 205, n. February, p. 58–64, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.009>.

Methods, C. Reviewer Guidance ' Validation of Chromatographic Methods. n. November, 1994.

Moraes do Carmo, A. C.; Pereira, R. S.; Gratieri, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 98, p. 58–63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.017>.

Otašević, B. et al. Comparison of AQbD and grid point search methodology in the development of micellar HPLC method for the analysis of cilazapril and hydrochlorothiazide dosage form stability. Microchemical Journal, v. 145, n. November 2018, p. 655–663, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.033>.

Paola, A.; Tonhi, E.; SILV, P. Stability Indicating Methods. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, 2011.

Papadoyannis, I. N.; Samanidou, V. F. Validation of HPLC es, Instrumentation. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologiv. 27, n. 5, p. 753–783, 2004.

Papich, M. G. Oclacitinib Maleate. Saunders Handbook of Veterinary Drugs, p. 574–576, 2016.

Passarella, C. Failure modes and effects analysis. Contro**l**, v. 31, n. 10, p. 72–73, 2018.

Patel, K. G.; Jain, N. R.; Shah, P. A. Stability Indicating HPTLC Method for Analysis of Rifaximin in Pharmaceutical Formulations and an Application to Acidic Degradation Kinetic Study. ISRN Analytical Chemistry, v. 2013, p. 1–9, 2013.

Paterson, S. Supplementary therapy in canine atopic dermatitis. Companion Animal, v. 24, n. 8, p. 400–407, 2019a.

Paterson, S. Canine atopic dermatitis — the veterinary 'eczema' nurse. The Veterinary Nurse, v. 10, n. 6, p. 296–303, 2019b.

Patil, T. S.; Deshpande, A. S. Development of an Innovative Quality by Design (QbD) Based Stability-Indicating HPLC Method and its Validation for Clofazimine from its Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms. Chromatographia, v. 82, n. 2, p. 579–590, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-018-3660-8>

Peris-Vicente, J.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. Analytical Separation Science. Analytical Separation Science, p. 1–52, 2015.

Raman, N. V. V. S. S.; Mallu, U. R.; Bapatu, H. R. Analytical Quality by Design Approach to Test Method Development and Validation in Drug Substance

Manufacturing. Journal of Chemistry, v. 2015, 2015.

Rao, G.; Goyal, A. An Overview on Analytical Method Development and Validation by Using HPLC Gunjan Rao , Anju Goyal. The Pharmaceutical and Chemical Journal, v. 3, n. 2, p. 280–289, 2016.

Raposo, F.; Ibelli-bianco, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, v. 129, p. 115913, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>.

Roberto de Alvarenga Junior, B.; Lajarim Carneiro, R. Chemometrics Approaches in Forced Degradation Studies of Pharmaceutical Drugs. Molecules (Basel, Switzerland), v. 24, n. 20, 2019.

Roskoski, R. Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. Pharmacological Research, v. 111, p. 784–803, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.038>.

Rouessac. Chemical Analysis-Modern Instrumentation Methods. [s.l: s.n.]v. 1

Sabir, A. M.; Moloy, M.; Bhasin, P. S. Hplc Method Development and Validation: a Review. International Research Journal of Pharmacy, v. 4, n. 4, p. 39–46, 2016.

Sahu, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 147, p. 590–611, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>.

Santoro, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice, v. 49, n. 1, p. 9–26, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.08.002>.

Saridomichelakis, M. N.; Olivry, T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. Veterinary Journal, v. 207, p. 29–37, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.016>.

Sataloff, R. T.; Johns, M. M.; Kost, K. M. HPTLC: High-Performance Thin-Layer Chromatography. [s.l: s.n.]

Services, H. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. n. July, 2015.

Shabir, G. A. V alidation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration , the US

Pharmacopeia and the International Con. v. 987, p. 57–66, 2003.

Sharma, M. K. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. n. January, p. 1–4, 2017.

Siimon Lichtiger, Daniel h. Present, Asher Korinbluth, Trwin Gelernt, Joel Bauer, Greg Galler, Fabrizio Michelassi, S. H. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org on March 29, 2011. For personal use only. No other uses without permission. New England Journal of Medicine, v. 329, n. 14, p. 977–986, 1991. Disponível em: <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/329/14/977%5Cnhttp://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309303291401>.

Silva, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

Souza, C. P. et al. A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. Veterinary Dermatology, v. 29, n. 6, p. 489-e164, 2018.

Sylvester, B. et al. A Quality by Design (QbD) approach to the development of a gradient high-performance liquid chromatography for the simultaneous assay of curcuminoids and doxorubicin from long-circulating liposomes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 158, p. 395–404, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.018>.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). Quality by Design for ANDAs : An Example for Immediate-Release Dosage Forms. Fda, n. April, p. 1–107, 2012. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../UCM304305.pdf>.

Tambe, R.; Mankar, S.; Dighe, S. Analytical Method Development and Validation of Paliperidone: A Review. Research Journal of Science and Technology, v. 12, n. 1, p. 23, 2020.

TattersalL, P. et al. Impact from the recent issuance of ANVISA resolution RDC53/ 2015 on pharmaceutical small molecule forced degradation study requirements. American Pharmaceutical Review, v. 19, n. 2, 2016.

Tech, J. A. B.; Sahu, P. K. Analytical & Bioanalytical Techniques Definition of System Suitability Test Limits on the Basis of Robustness Test Results. v. 8, n. 2, 2017.

Thankor, N.; Amrutkar, S. Implementing Quality By Design in Analytical Development.

Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry, v. 15, n. 5, p. 1–5, 2017.

Tol, T. et al. Optimization of a liquid chromatography method for the analysis of related substances in daclatasvir tablets using design of experiments integrated with the steepest ascent method and Monte Carlo simulation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 178, p. 112943, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112943>.

Tome, T. et al. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. Organic Process Research and Developme**nt**, v. 23, n. 9, p. 1784–1802, 2019.

Veerubhotla, K.; Walker, R. B. Development and validation of a stability-indicating rp-hplc method using quality by design for estimating captopril. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 81, n. 1, p. 45–50, 2019.

WHO. Guidelines for Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well Established Drug Substances in Conventional Dosage Forms. World Health Organization Technical Report Series, n. 863, p. 65–80, 1996

Wolf, B. Handbook of Ion Chromatography Third, Completely Revised and Engarged Edition Volume 1. [s.l: s.n.] <http://dx.doi.org//10.1201/9781315214054, 2003.

Zacharis, C. K.; Vastardi, E. Application of analytical quality by design principles for the determination of alkyl p-toluenesulfonates impurities in Aprepitant by HPLC. Validation using total-error concept. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 150, p. 152–161, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.009>.

Zhang, L.; MAO, S. Application of quality by design in the current drug development. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>.

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, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.062>.