



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aplicação de Planejamento Fatorial no Estudo de Degradação
Forçada em Meio Ácido de Matéria-Prima de Apixabana**

Igor Natã Fagundes Rodrigues



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aplicação de Planejamento Fatorial no Estudo de Degradação
Forçada em Meio Ácido de Matéria-Prima de Apixabana**

Igor Natã Fagundes Rodrigues

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Eising

Toledo – PR,
2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Fagundes Rodrigues, Igor Natã

Aplicação de Planejamento Fatorial no Estudo de Degradação Forçada em Meio Ácido de Matéria-Prima de Apixabana / Igor Natã Fagundes Rodrigues; orientador Renato Eising. -- Toledo, 2024.

87 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

1. Estudo de Degradação de Forçada de fármacos. 2. Aplicação de cromatografia líquida na indústria farmacêutica. 3. A importância de métodos indicativos de estabilidade. 4. Aplicabilidade da caracterização de estruturas químicas de fármacos por Espectroscopia de Massas. I. Eising, Renato, orient. II. Título.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	8
2 - OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos	9
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 Estudo de Degradação Forçada de Medicamentos.....	10
3.1.1 Condições de Degradação.....	13
3.1.2 Orientação para Avaliação dos Produtos de degradação Majoritários.....	23
3.2 Avaliação da estrutura química de Apixabana para o Estudo de Degradação Forçada (EDF)	23
3.3 Planejamento Fatorial de Experimentos.....	29
3.3.1 Principais Modelos Experimentais: Com Foco na Abordagem DoE.....	30
3.3.2 Aplicação da Metodologia de Superfície Resposta no Planejamento Fatorial	31
3.3.3 Aplicação da Função de Desejabilidade no Planejamento Fatorial.....	32
3.3.4 Aplicação de Design Space (DS) no Planejamento Fatorial	33
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 equipamentos	37
4.2 Padrão, Amostra, reagentes e Solventes	37
4.3 Metodologia analítica	37
4.3.1 Preparo das soluções utilizadas no Estudo de Degradação Forçada.....	38
4.3.2 Estudo de Degradação Forçada – Planejamento Fatorial	38
4.3.3 Sistema Cromatográfico.....	40
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Avaliação da Amostra controle.....	43
5.2 Degradação Ácida	45
5.2.1 Resultados	45
5.3 injeção dos padrões das impurezas RRT 0,40 e RRT 0,90	65
5.4 Caracterização da Impureza RRT 0,33 por Espectrometria de Massa	68
6 - CONCLUSÃO	81
7 - REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios propostos e condições de testes de longo prazo.	10
Tabela 2: Taxas de Reação de Degradação (Relativas a 25 °C) assumindo cinética de Arrhenius (relação entre a taxa de reação química e a temperatura) e Energias de Ativação (E_a) de 12, 17, 19.8, 25.8 e 29.8 kcal.mol ⁻¹ , conforme apresentado por Baertschi, Alsante e Reed (3).	15
Tabela 3: Número de dias estimados para simular um estudo de degradação de 24 meses a 25°C usando a cinética de Arrhenius e diferentes energias de ativação.....	16
Tabela 4: Condições recomendadas para degradação ácida e básica em insumo farmacêutico ativo/matéria-prima.	17
Tabela 5: Condições recomendadas para degradação ácida e básica em medicamento/produto acabado.....	17
Tabela 6: Condições recomendadas para o estudo de degradação oxidativo com peróxido de hidrogênio.....	20
Tabela 7: Condições recomendadas para o estudo de degradação oxidativo com metais de transição.	21
Tabela 8: Modelo experimental fatorial Modelo com Composto Central e com Pontos Axiais.	31
Tabela 9: Condições experimentais do planejamento fatorial 2 ³ para o estudo de degradação ácida.	39
Tabela 10: Parâmetros do sistema cromatográfico.	40
Tabela 11: Gradiente de teste conforme método de fabricante.....	41
Tabela 12: Dados quantitativos da solução amostra controle utilizada no estudo de degradação forçada.....	44
Tabela 13: Resultados do estudo de estresse em meio ácido para os experimentos de 1 a 8 (planejamento fatorial completo em dois níveis).	46
Tabela 14: Resultados do estudo de estresse em meio ácido para os experimentos 9 a 17 (ponto central e pontos axiais).	47
Tabela 15. Íons dos produtos de degradação de apixabana.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração.....	12
Figura 2: Diagrama de Jablonski mostrando as etapas envolvidas após o processo de excitação eletrônica por meio da incidência de luz de uma molécula.....	22
Figura 3: Estrutura química de apixabana	24
Figura 4: Identificação dos grupamentos funcionais da molécula de Apixabana.....	24
Figura 5: Padrões de degradação propostos para o apixabana em condições de estresse. *Drug: Fármaco; Degradation Product (DP): Produto de Degradação (PD).	27
Figura 6: Reação de hidrólise do grupo funcional amida	28
Figura 7: Gráfico de contorno de dissolução em função dos parâmetros 1 e 2, com demonstração do Design Space (DS) por meio da região em branco, onde pode-se obter resultados de desejabilidade (maior que 80%). *Parameter – Parâmetro; Dissolution – Dissolução.....	34
Figura 8: Gráfico de contorno de friabilidade em função dos parâmetros 1 e 2, com demonstração do Design Space (DS) por meio da região em branco, onde pode-se obter resultados de desejabilidade (menor que 2%).*Parameter – Parâmetro; Friability - Friabilidade.....	35
Figura 9: Design Space (DS) proposto, composto pela região de sobreposição das faixas de valores desejáveis dos parâmetros 1 e 2 da etapa de granulação para friabilidade e dissolução. *Parameter – Parâmetro; Dissolution – Dissolução; Friabilidade – Friabilidade; Design Space – Espaço de Trabalho	36
Figura 10: Estrutura química das impurezas específicas Impureza C (A), Impureza B (B), Impureza A (C), Impureza F (D), Impureza D (E), Impureza E (F) e Impureza AIX-4.....	42
Figura 10: Cromatograma da solução amostra impurezas controle para o estudo de degradação da molécula	44
Figura 11: Cromatogramas do estudo fatorial (testes 1-8) em meio ácido.....	48
Figura 12: Cromatogramas do ponto central (testes 9-11) em meio ácido.....	48
Figura 13: Cromatogramas dos pontos axiais do estudo fatorial (testes 12-17) em meio ácido	49
Figura 14: Pontos influentes identificados via gráfico para o teste 15 (a) e para o teste 16 (b). *Assay – Teor; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura	51
Figura 15: ANOVA (a), modelos adequados (b) e modelo matemático (c) propostos para a correlação do estresse com o doseamento	52
Figura 16: Gráficos de normalidade, outliers, correlação reais vs preditos e dependência nas observações para a resposta de doseamento.....	53
Figura 17: Superfície de resposta para o doseamento em 6h(a), 15h(b) e 24h(c)	54
Figura 18: ANOVA (a) e modelo matemático proposto (b) para a resposta de impurezas totais	55

Figura 19: Gráficos de normalidade, outliers, correlação reais vs preditos e dependência nas observações para a resposta de impurezas totais.....	56
Figura 20: Superfície de resposta para impurezas totais em 6h(a), 15h(b) e 24h(c)	57
Figura 21: ANOVA (a) e modelo matemático proposto (b) para a resposta de balanço de massas	58
Figura 22: Análise gráfica da estatística para o termo do balanço de massas	58
Figura 23: Heat map de resposta para balanço de massas em 6 h (a), 15 h (b) e 24 h (c)	60
Figura 24: Heat map das melhores respostas frente ao heat map de desejabilidade no tempo de 24 h de estresse.....	62
Figura 25: Otimização gráfica do design space para a degradação ácida em 6 h (a), 15 h (b) e 24 h (c). *Overlay Plot – Sobreposição Gráfica; Concentration – Concentração; Temperature – Temperatura.	64
Figura 26: Sobreposição dos cromatogramas das impurezas específicas C (Apixabana Anel Aberto Amida), B (Apixabana Aminoácido) e A (Apixabana Ácido Carboxílico).....	66
Figura 27: Sobreposição dos cromatogramas das solução amostra impurezas – controle e da solução amostra impurezas – EDF ácido (Experimento 8)	66
Figura 28: Sobreposição dos cromatogramas das Solução amostra impurezas – EDF ácido (Experimento 8) e das impurezas específicas	67
Figura 29: Estrutura química da impureza C (Apixabana Anel Aberto Amida) (a) e estrutura química da impureza B (Apixabana Aminoácido) (b)	68
Figura 30: Espectro de varredura para a Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	70
Figura 31: Espectro de fragmentação para a Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando m/z de 460 e uma tensão elétrica de 20 V	71
Figura 32: Cromatograma da Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$	71
Figura 33: Identificação do pico da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (a), identificação do pico da impureza B com TR em 7,33 minutos (b), espectro de varredura da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (c) e espectro de varredura da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (d)	73
Figura 34: Identificação do pico da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (a), identificação do pico da impureza B com TR em 7,33 minutos (b), perfil de fragmentação em m/z 479 da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (c) e perfil de fragmentação em m/z 478 da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (d)	75
Figura 35: Proposta de fragmentação da impureza B (DP-4).....	77
Figura 36: Proposta de estruturas químicas para a impureza desconhecida com TR em 5,82 (RRT 0,33) a partir da hidrólise da impureza B em meio ácido	79

APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL NO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA EM MEIO ÁCIDO DA MATÉRIA-PRIMA DE APIXABANA

Igor Natã Fagundes Rodrigues

RESUMO

Este trabalho teve como proposta aplicar a abordagem de planejamento fatorial completo, com pontos centrais e pontos axiais para avaliar a influência de fatores temperatura, concentração do degradante e tempo sobre a reação de degradação ácida da molécula de apixabana matéria-prima. A partir da metodologia de análise estatística empregada na avaliação dos resultados experimentais, utilizando ANOVA, gráficos de superfície resposta e função de desejabilidade, verificou-se que o teste 8 (HCl 1 mol L⁻¹, 60 °C e 24 h) apresentou os maiores resultados para decaimento de teor e formação de impurezas e balanço de massa próximo de 100%. Também foi possível gerar um gráfico de *Design Space*, que ofereceu uma visualização do espaço de trabalho onde as condições dos fatores são ideais para a degradação ácida da molécula de apixabana PA.

Palavras-chave: Análise multivariada; Indicativo de estabilidade; Cromatografia líquida; Desenvolvimento de métodos analíticos; Espectrometria de massas.

APPLICATION OF FACTORIAL DESIGN IN THE STUDY OF FORCED DEGRADATION IN ACID MEDIUM OF APIXABANA RAW MATERIAL

Igor Natã Fagundes Rodrigues

ABSTRACT

This work aimed to apply the full factorial design approach, including central and axial points, to assess the influence of temperature, degradant concentration and time factors on the acid degradation reaction of the apixaban raw material molecule. Through the statistical analysis methodology employed in evaluating the experimental results, using ANOVA, response surface plots, and desirability function, it was found that test 8 (HCl 1 mol L⁻¹, 60 °C, and 24 h) yielded the highest results for content decay, impurity formation, and mass balance close to 100%. It was also possible to generate a Design Space plot, providing a visualization of the working space where factor conditions are ideal for the acid degradation of the apixaban PA.

Key-words: Design of experiment; Forced degradation study; Liquid chromatography; Analytical methods; Apixaban.

1 - INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica desempenha um papel importante na saúde pública e é essencial para garantir a qualidade e segurança dos medicamentos disponíveis no mercado. Neste contexto, o desenvolvimento analítico desempenha um papel importante ao fornecer métodos robustos para identificação e quantificação precisa de substâncias em produtos farmacêuticos. A crescente complexidade das formulações e a busca por novos princípios ativos exigem abordagens analíticas avançadas. (1)

A aplicação de abordagens multivariadas no estudo de estresse desempenha um papel importante na compreensão dos processos de degradação de medicamentos. A complexidade das interações entre diferentes estressores físico-químicos requer a análise holística oferecida por abordagens multivariadas. Isto permite identificar padrões e tendências que passam despercebidos na análise univariada, levando a uma melhor compreensão dos mecanismos de degradação e ajudando a melhorar as formulações. (2, 3)

A cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography – HPLC) provou ser uma ferramenta indispensável na investigação da degradação forçada de medicamentos. Ao separar eficazmente os compostos alvo e os seus produtos de degradação, as alterações na composição ao longo do tempo podem ser avaliadas com precisão. Além disso, a sensibilidade e a seletividade da técnica de HPLC permitem a detecção até mesmo de impurezas com baixas concentrações, ajudando a determinar a estabilidade do medicamento e a definir parâmetros de armazenamento apropriados. (4)

Este projeto de mestrado explora a intersecção de dois pilares: estudo de degradação forçada de medicamento e abordagem multivariada, com aplicação da técnica de HPLC, para obtenção de uma predição na degradação da molécula de apixabana.

2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a degradação forçada em matéria-prima de apixabana, aplicando a abordagem de planejamento fatorial (do inglês, *design of experiment* – DoE)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar um estudo teórico das possíveis vias de degradação da estrutura química de apixabana;

Aplicar a abordagem de planejamento fatorial completo, com ponto central e pontos axiais para cálculo das estimativas dos efeitos principais e as interações;

Realizar o estudo de degradação forçada (EDF) em condições ácidas, acompanhando a formação de produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência;

Analisar estatisticamente os resultados experimentais do planejamento fatorial aplicado no EDF;

Obter condições otimizadas por meio do gráfico de *Design Space* (DS).

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Buscou-se na literatura referencial teórico para desenvolver assuntos relacionados ao tema desse estudo. As bases de dados utilizadas foram *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) e *National Library of Medicine* (PUBMED). As palavras – chaves utilizadas nas buscas foram: Planejamento experimental; Estudo de degradação forçada; Cromatografia líquida; Métodos analíticos; Apixabana. Foram utilizados o operador booleano OR e AND. A seleção dos artigos foi realizada através dos cruzamentos dos descritores citados, procedendo então com a leitura do título, resumo dos artigos e aquelas que responderam aos critérios de seleção foram incluídas para comporem este trabalho. Foram apresentados três assuntos relevantes: primeiramente, o estudo de degradação forçada de medicamentos, em seguida, a avaliação da estrutura química de apixabana, e por último, sobre planejamento fatorial.

3.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE MEDICAMENTOS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divide o mundo em quatro diferentes zonas climáticas: zona I, zona II, zona III e zona IV-A e IV-B. As quatro zonas climáticas foram definidas por meio de cálculos de temperatura cinética média e de umidade relativa dos países. A OMS estabelece que os medicamentos devem apresentar uma vida útil de pelo menos 12 meses na zona climática onde forem fabricados, e o acompanhamento do estudo de estabilidade de longa duração deve ser feito a cada três meses no primeiro ano e a cada 6 meses no segundo ano. (5)

A OMS classifica o Brasil como sendo um país de zona IV-B, pois, em média o Brasil apresenta temperatura de 30 °C e 75 % de umidade relativa. Na Tabela 1 pode-se observar com maiores detalhes os critérios de estudo de longa duração para cada tipo de zona climática. (5)

Tabela 1: Critérios propostos e condições de testes de longo prazo.

Zona climática	Definição	Condições de estudo de longa duração
I	Temperatura climática	21°C / 45% UR ¹
II	Clima mediterrâneo e subtropical	25°C / 60% UR
III	Clima quente e seco	25°C / 60% UR
IV-A	Clima quente e úmido	30°C / 65% UR

¹UR: Umidade relativa.

Fonte: Adaptada de World Health Organization (5)

Com base nas condições ambientais da zona climática IV-B, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que as indústrias farmacêuticas que comercializam medicamentos em solo brasileiro, devem comprovar estabilidade em temperatura média de 30°C e umidade relativa média de 75%. (6)

De acordo com o Guia Q1A(R2) do Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (do inglês, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*), o objetivo do teste de estabilidade é fornecer um prazo de validade e as condições de armazenamento para o medicamento, de forma que a sua segurança, eficácia e qualidade sejam atendidas sob influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz. (7)

A avaliação da estabilidade do medicamento em estudo de estabilidade é realizada através da obtenção do seu perfil de degradação, isto é, dos produtos de degradação formados ao longo tempo, sendo que, é necessário identificá-los e quantificá-los através de um método analítico indicativo de estabilidade.(8)

No Guia nº 4 versão 01 de dezembro de 2015 da ANVISA, o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade deve ser realizado por meio de um estudo de degradação forçada, também conhecido como estudo de estresse, a fim de se obter um perfil de degradação de maior escala quando comparado ao perfil de degradação obtido no estudo de estabilidade. Por esse motivo, o estudo de degradação forçada de medicamento realizado no desenvolvimento de método analítico é definido como uma ferramenta preditiva do perfil de degradação que será observado durante o estudo de estabilidade do medicamento, que é definido como um estudo real. (8)

De acordo com o Guia nº 4, o estudo de degradação forçada apresenta um perfil potencial de degradação, contendo o perfil real. A Figura 1 apresenta a relação do estudo de degradação forçada com os testes de estabilidade. (8)

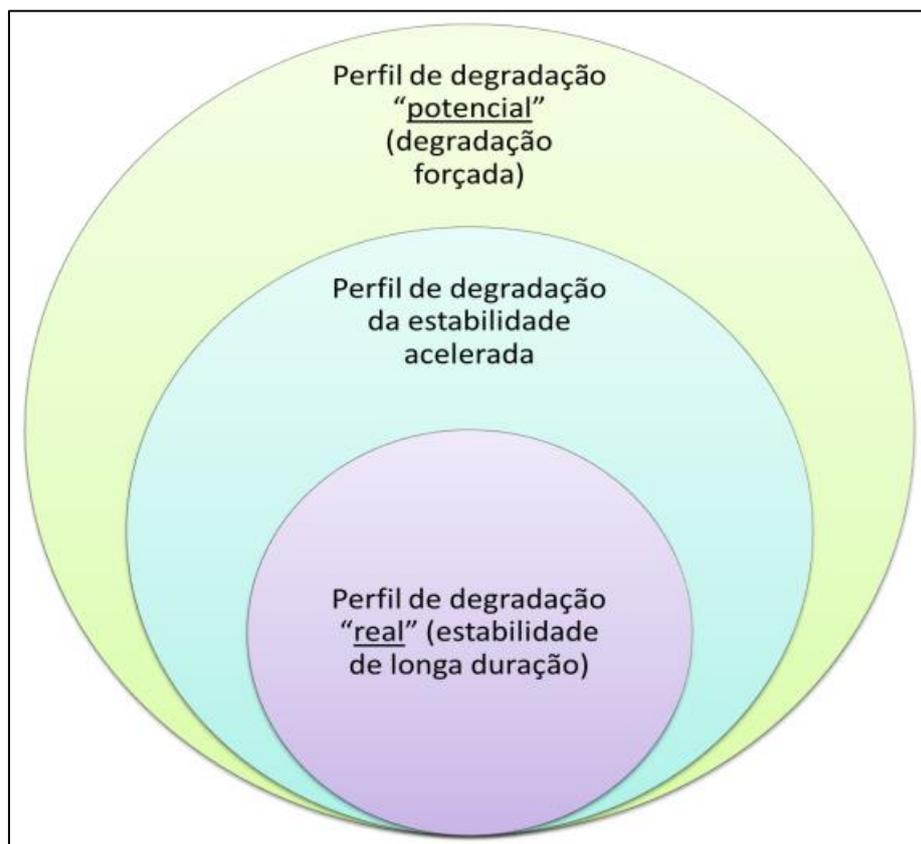


Figura 1: Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração.

Fonte: ANVISA (8)

A condução do estudo de degradação potencial pode beneficiar os estudos de estabilidade, devido a sua característica indicativa de estabilidade, promovendo uma avaliação mais aprofundada da formação de produtos de degradação, taxas de degradação, impactos da embalagem e estabelecimento do prazo de validade. É que com base nesse racional, que o estudo de degradação potencial pode ser definido como uma abordagem respaldada pela sólida fundamentação científica empregada durante a fase de desenvolvimento do método analítico. (3)

A chave do sucesso para se realizar um estudo de degradação realmente preditivo, é compreender a estabilidade intrínseca da molécula de interesse. De acordo com Baertschi, Alsante e Reed (3), o estudo de degradação forçada é uma etapa de investigação da estabilidade química da molécula medicamentosa. Para tal processo investigativo ocorrer, sugere-se explorar quatro critérios:

- Condições de degradação;
- Cinética de degradação;
- Orientação para avaliação dos principais produtos de degradação;
- Compreensão das vias de degradação, isto é, dos grupos funcionais presentes na molécula susceptíveis à degradação.

3.1.1 Condições de Degradação

As orientações para a definição das condições de degradação no estudo de degradação forçada estão descritas em guias internacionais e em guias nacionais.

No cenário internacional, o ICH orienta que as condições de degradações a serem realizadas, são: degradação por temperatura (com temperaturas de pelo menos 10°C acima da temperatura utilizada no estudo de estabilidade acelerado), degradação por umidade, degradação fotolítica, degradação por oxidação e degradação hidrolítica (com soluções ácidas e básicas). (7)

No cenário nacional, a ANVISA, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº53 de 04 de dezembro 2015, descreve as condições de degradação forçada que as indústrias farmacêuticas devem realizar: degradação por aquecimento, degradação por umidade, degradação fotolítica, degradação por oxidação, degradação hidrolítica (com soluções ácidas e básicas) e degradação por íons metálicos. (9)

Implementando –se as condições de degradações forçadas, os resultados gerados podem ser compilados para formar um “espaço de conhecimento” com todos os possíveis produtos de degradação que podem surgir no estudo real. Ou seja, os produtos de degradação reais, devem estar contidos no “espaço de conhecimento” obtido no estudo de degradação forçada. (3)

Condições de degradação mal planejadas podem gerar um “espaço de conhecimento” incompleto, isto é, pode conter muita informação desnecessária, e/ou pode deixar de apresentar muita informação importante. A consequência será observada quando o método analítico for aplicado aos estudos de estabilidade. Assim, pode ocorrer o surgimento de um produto de degradação, acima da especificação, que não foi identificado no “espaço de conhecimento” obtido no estudo de degradação forçada, e com isso, o método analítico poderá não ser capaz de detectá-lo, separá-lo e/ou quantificá-lo corretamente, dessa forma, a segurança e qualidade do medicamento estarão comprometidas, sendo necessário um novo desenvolvimento de método analítico para o medicamento. É com base nesse tipo de situação que as condições de degradações forçadas devem ser planejadas com base no conhecimento químico da molécula. (3)

A seguir, serão apresentados os principais mecanismos de degradação aplicados aos produtos farmacêuticos.

3.1.1.1 Degradação Termolítica

A degradação termolítica é o tipo de reação influenciada por temperaturas suficientemente altas para promover a quebra da ligação covalente, também conhecido como pirólise ou termólise (3). No contexto de degradação de fármacos, o ICH sugere avaliar o efeito da temperatura em incrementos de 10 °C acima da temperatura utilizada no estudo de estabilidade acelerado (40 °C), isto é, 50 °C ou 60 °C, (7). O motivo de se realizar degradação de fármacos, principalmente no estado sólido, com temperaturas acima de 40 °C, é compreender se algum mecanismo de reação é dependente do aumento de temperatura. (3)

Uma forma de avaliar a degradação termolítica em fármacos é por meio da equação de Arrhenius. Se um fármaco apresenta degradação que pode ser explicada pela equação de Arrhenius, então, é possível calcular o efeito da temperatura na taxa de decomposição do fármaco, desde que a sua energia de ativação (E_a) seja conhecida (3). A seguir foi apresentada a equação de Arrhenius.

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

k = taxa de reação;

A = fator de frequência;

E_a = energia de ativação;

R = constante de gás (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹);

T = temperatura absoluta (K).

Alguns estudos foram realizados com a finalidade de conhecer a E_a de compostos com potencial farmacêutico. No trabalho de MacFaul, Ruston e Wood (10), foi medido a E_a de reações químicas de mais de 166 moléculas farmacêuticas, em solução, que apresentaram decomposição seguindo a equação de Arrhenius usando temperaturas de até 90 °C. Os resultados obtidos demonstraram uma E_a média de 23,6 kcal mol⁻¹, uma mediana de 22,6 kcal mol⁻¹, um valor mínimo de 11,9 kcal mol⁻¹ e um valor máximo de 47,2 kcal mol⁻¹. A faixa obtida de E_a de 11,9 kcal mol⁻¹ – 47,2 kcal mol⁻¹ no trabalho de MacFaul, Ruston e Wood (10) está de acordo com outras referências, como: Connors, Amidon e Stella (11) que propuseram uma faixa de E_a para os compostos farmacêuticos de 12 kcal mol⁻¹ – 24 kcal mol⁻¹; Kennon (12) encontrou um valor médio de 19,8 kcal mol⁻¹ para vários fármacos; no Capítulo Geral 1150 da Farmacopeia dos Estados Unidos (em inglês, *United States Pharmacopeia – USP*), a E_a média citada para a realização de uma cinética de degradação de moléculas farmacêuticas sob temperatura de 15 – 30 °C, foi de 19,9 kcal mol⁻¹ (13); de acordo com a pesquisa feita por Yang e Roy (14), quando compostos farmacêuticos submetidos ao estresse de estabilidade acelerado (temperatura de 40 °C a 75% umidade relativa por três meses)

apresentam E_a de 25,8 kcal mol⁻¹ para reação de decomposição, essa condição pode ser correspondente ao estudo de estabilidade de longa duração (temperatura de 30 °C a 75% umidade relativa por 24 meses).

É de fundamental importância em uma degradação termolítica, ter conhecimento dos efeitos gerados pela temperatura e da E_a , pois, os esses dois fatores influenciam na taxa de reação de degradação, no número de impurezas que podem ser formadas e a quantidade de cada impureza formada. Na Tabela 2 pode-se observar o efeito da temperatura na taxa de degradação, em cada E_a . (3)

Tabela 2: Taxas de Reação de Degradação (Relativas a 25 °C) assumindo cinética de Arrhenius (relação entre a taxa de reação química e a temperatura) e Energias de Ativação (E_a) de 12, 17, 19,8, 25,8 e 29,8 kcal.mol⁻¹, conforme apresentado por Baertschi, Alsante e Reed (3).

Temperatura (°C)	Taxa Relativa				
	$E_a = 12$ kcal mol ⁻¹ (50,2 kJ.mol ⁻¹)	$E_a = 17$ kcal mol ⁻¹ (71 kJ.mol ⁻¹)	$E_a = 19,8$ kcal mol ⁻¹ (82,8 kJ.mol ⁻¹ 1)	$E_a = 25,8$ kcal mol ⁻¹ (107,8 kJ.mol ⁻¹)	$E_a = 29,8$ kcal mol ⁻¹ (124,6 kJ.mol ⁻¹)
25	1	1	1	1	1
30	1,4	1,6	1,7	2,1	2,3
40	2,6	4,0	5,0	8,1	11,2
50	4,8	9,2	13,3	29,2	49,3
60	8,4	20,4	33,7	97,7	198,9
70	14,3	43,2	80,6	304,8	739,8
80	23,6	86,6	183,6	891,2	2554,7

Fonte: Adaptada de Baertschi, Alsante e Reed (3)

Na Tabela 2, o aumento na taxa de reação depende da E_a , em que, uma baixa energia de ativação resulta em um aumento menos drástico na taxa de reação à medida que a temperatura aumenta.

A partir das informações apresentadas na Tabela 3, pode-se utilizá-las para calcular os dias necessários para simular o estudo de degradação de longa duração (24 meses / 25 °C / 75% umidade relativa) usando a equação de Arrhenius (3). Logo abaixo, na Tabela 3, pode-se observar os valores preditos, levando em consideração diferentes temperaturas e energias de ativação.

Tabela 3: Número de dias estimados para simular um estudo de degradação de 24 meses a 25°C usando a cinética de Arrhenius e diferentes energias de ativação.

Temperatura (°C)	<i>Ea</i> = 12	<i>Ea</i> = 17	<i>Ea</i> = 19,8	<i>Ea</i> = 25,8	<i>Ea</i> = 29,8
	kcal/mol (50,2 kJ/mol)	kcal/mol (71 kJ/mol)	kcal/mol (82,8 kJ/mol)	kcal/mol (107,8 kJ/mol)	kcal/mol (124,6 kJ/mol)
40	280,8	182,5	146,0	90,1	65,2
50	152,1	79,3	54,9	25,0	14,8
60	86,9	35,8	21,7	7,5	3,7
70	51,0	16,9	9,1	2,4	1,0

Fonte: Adaptada de Baertschi, Alsante e Reed (3)

A cinética de Arrhenius se manifesta em reações de decomposição de substâncias medicamentosas tanto no estado sólido quanto em solução, quando submetidas a temperaturas de até 70°C e quando os níveis de degradação são aproximadamente 5%. Entretanto, fármacos com níveis de degradação superiores a 10% podem exibir taxas de decomposição que não seguem a cinética de Arrhenius, devido estes apresentarem possíveis reações autocatalíticas. Além disso, as vias de degradação podem diferir consideravelmente entre os estados sólido e em solução, resultando em valores que são desafiadores de se prever por meio da equação de Arrhenius. (3)

3.1.1.2 Degradação Hidrolítica

A reação de degradação por via de hidrólise de uma molécula envolve a quebra de uma ligação química provocada pela reação com a água. (15)

No contexto da indústria farmacêutica, qualquer medicamento pode entrar em contato com a água, seja na forma de solvente, por meio da umidade presente no ambiente, por meio de alguns excipientes que podem apresentar alguma forma de água e a própria molécula farmacêutica que pode estar na forma hidratada. Dessa forma, a hidrólise oferece um risco evidente na estabilidade de muitos fármacos. (15)

A reação de hidrólise é comum de ser observada em fármacos, devido a isso, o ICH e a ANVISA, exigem uma avaliação da susceptibilidade de degradação de fármacos em soluções ácidas e básicas, com o objetivo de identificar, quantificar e controlar os produtos de degradação primários por meio de métodos analíticos cromatográficos, na etapa de estudo de degradação forçada, com o

objetivo final de avaliar a presença desses produtos de degradação primários nas amostras no estudo de estabilidade. (7, 9, 15)

No trabalho realizado por Waterman *et al.* (15), foram apresentadas, algumas recomendações sobre as condições de degradação hidrolítica:

- Concentração da amostra do fármaco/medicamento: 1 mg mL⁻¹
- Concentração das soluções ácida e básica: 1 mol L⁻¹
- Tempo de degradação: até a degradação atingir de 10 – 20%, caso a degradação não atinja essa faixa, a reação hidrolítica deve ser realizada por até uma semana a 70 °C. Condições mais drásticas podem apresentar valores de degradação e produtos de degradação não preditivos para o estudo real (estudo de estabilidade).

Outras recomendações de condições de degradação hidrolítica para matéria-prima (insumo farmacêutico ativo) do fármaco e para o medicamento do fármaco (produto acabado) foram apresentadas no projeto de Baertschi, Alsante e Reed (3), e podem ser observadas nas Tabela 4 e Tabela 5.

Tabela 4: Condições recomendadas para degradação ácida e básica em insumo farmacêutico ativo/matéria-prima.

Concentração do ativo	0,1 – 1 mg mL ⁻¹
pH – 1 a 13	HCl 0,1 mol/L e NaOH ou KOH 0,1 mol. L ⁻¹
pH 2 - 12	Tampão fosfato 50 mmol L ⁻¹ , ajuste de pH com HCl ou NaOH/KOH, conforme necessário
Cossolventes	Preferencialmente Acetonitrila, por ser um solvente mais neutro
Temperatura	70 °C
Duração	5 – 20% degradação em até uma semana
Neutralização	Não recomendado: alto risco de reações secundárias.
Recipientes	Frascos de vidro Flint ou borossilicato com fechamentos herméticos para minimizar a evaporação do solvente.

Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (3)

Tabela 5: Condições recomendadas para degradação ácida e básica em medicamento/produto acabado.

Concentração do ativo	Dependente da formulação
Faixa de pH	+/- 2 unidades de pH ao redor do pH-alvo

Temperatura

70 °C

Duração

Degradação de $5 \pm 20\%$ ou no máximo 1 - 3
semanas

Fonte: Adaptada de Baertschi, Alsante e Reed (3)

3.1.1.3 Degradação Oxidativa

A degradação oxidativa é uma das reações que mais ocorrem em medicamentos, devido ao principal oxidante (oxigênio) estar presente em grande quantidade na atmosfera, cerca de 21% da composição em termos volumétricos. Todavia, mesmo a degradação oxidativa sendo definida como uma via de degradação muito comum em medicamentos, algumas vias de degradação oxidativa que ocorrem ainda não possuem elucidação em seus mecanismos de reação, por esse motivo, que a decomposição por oxidação é considerada uma via de degradação complexa para se prever os principais produtos de degradação. (16)

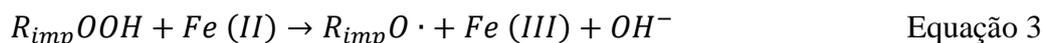
São consideradas as principais vias de degradação oxidativa em fármacos a autooxidação, a oxidação por peróxido e oxidação por transferência de elétrons, conforme relatado por Baertschi, Alsante e Reed (3)

Abaixo são explicadas com mais detalhe as principais vias de degradação oxidativa a fim de melhor entender as particularidades de cada via de oxidativa.

3.1.1.3.1 Autooxidação

A autooxidação é um mecanismo de degradação que ocorre através de radicais. As fontes de geração mais comuns de radicais são: radiação, temperatura, metal catalisador e/ou a clivagem de uma ligação homolítica de peróxidos. O mecanismo de autooxidação acontece em três etapas: iniciação, propagação e terminação. No entanto, as três etapas são antecedidas pela etapa de formação de radicais, que pode ser observado nas Equação 2 e Equação 3. O caminho reacional obtido por meio dessas três etapas dificilmente segue a equação de Arrhenius (17). A seguir foram apresentadas as etapas de autooxidação:

Etapas de iniciação:



Etapa de propagação:



Etapa de terminação:



Fonte: Adaptada de Boccardi e Harmon (17)

A via de degradação oxidativa por autooxidação pode ser considerada uma reação “espontânea”, pois o processo reacional ocorre por meio da ativação do oxigênio molecular em seu estado fundamental. E ainda, outras moléculas podem atuar como fontes de oxigênio como: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical de ânion superóxido (O₂⁻), radical hidroxil (OH·) e oxigênio singlete (O₂), podendo atuar como agentes oxidantes. Essas espécies reativas são geradas por processos como a degradação de compostos orgânicos, radicais livres formados durante reações químicas, e a interação do oxigênio molecular com energia externa, como radiação ou calor, que promove a formação de radicais e peróxidos (16)

O entendimento dos efeitos gerados pelas variáveis envolvidas no processo de autooxidação dos fármacos é um grande desafio, consequentemente, a aplicação da equação de Arrhenius no modelo reacional oxidativo pode se tornar um grande obstáculo. Considerando os medicamentos no estado sólido, as variáveis que podem ser responsáveis pelos desvios na cinética de Arrhenius são: primeiramente, a falta de mobilidade apresentada pode dificultar o acontecimento da etapa de propagação, gerando falta de precisão no seguimento do caminho reacional esperado; e a segunda causa que gera desvio, que é a mais comum de acontecer, os produtos intermediários oxidativos serem termicamente instáveis, ocorrendo a decomposição desses produtos intermediários em diferentes etapas durante uma reação, se tornando praticamente impossível de controlar o ambiente reacional.

Já em solução, a reação de autooxidação provavelmente não seguirá o modelo matemático apresentado por Arrhenius. (3)

Uma maneira de se estudar a autooxidação de fármacos, é utilizar algum composto como um iniciador de radical e adicionar uma pequena percentagem de metanol no diluente para evitar a formação de radical alcoxila, a fim, de se ter um controle maior da reação e maior previsibilidade dos produtos oxidativos que possam ser formados. O metanol atua como um diluente que, ao se misturar com o sistema reacional, reduz a concentração de radicais livres formados durante a autooxidação, evitando a formação de radicais alcoxila ($R-O\cdot$) por meio da sua capacidade de se inserir nas reações de transferência de hidrogênio ou de eliminar radicais que poderiam iniciar essa formação, promovendo assim um ambiente mais controlado e previsível para o estudo da oxidação do fármaco. (17)

3.1.1.3.2 Oxidação por peróxido

O estudo da oxidação por peróxido em medicamentos é muito importante, pois, alguns excipientes presentes na formulação podem apresentar resíduos de peróxidos. Os excipientes mais comuns em encontrar concentrações de peróxidos são: polissorbatos, polietilenoglicol, povidona e hidroxipropilcelulose. Dessa forma, é necessário realizar o estresse oxidativo por peróxido nas moléculas farmacêuticas, por meio da adição de solução diluída de peróxido de hidrogênio sob temperatura ambiente, com o objetivo de obter resultados robustos e com maior capacidade preditiva para o planejamento experimental executado. (3)

Na Tabela 6, estão apresentadas as condições de degradação oxidativa por peróxido de hidrogênio recomendadas por Baertschi, Alsante e Reed (3).

Tabela 6: Condições recomendadas para o estudo de degradação oxidativo com peróxido de hidrogênio.

	Concentração do reagente	0,3 – 3%
	Concentração do ativo	0,1 – 1 mg mL ⁻¹
Peróxido de hidrogênio	Temperatura	30°C
	Duração	5 – 20% de degradação ou máximo de sete dias

Fonte: Adaptada de Baertschi, Alsante e Reed (3)

3.1.1.3.3 Oxidação por transferência de elétrons

A oxidação por transferência de elétrons é uma via de degradação catalisada por metais de transição, sendo os mais importantes o ferro (III) e o cobre (II). A participação dos íons metálicos na oxidação, envolve a retirada de um elétron de um grupo funcional da molécula do fármaco. Após a remoção do elétron, o íon metálico é reduzido e o fármaco é oxidado. No estado de oxidação, o fármaco estará disponível para reagir com o oxigênio presente no meio para gerar produtos de degradação. (17). Na Tabela 7, estão apresentadas as condições de degradação oxidativa por transferência de elétrons recomendadas por Baertschi, Alsante e Reed (3).

Tabela 7: Condições recomendadas para o estudo de degradação oxidativo com metais de transição.

Metais	Concentração	Concentração do ativo	Temperatura	Duração
Cu (II) (CuCl ₂ ou CuSO ₄)	0,001 mol L ⁻¹	0,1 mg mL ⁻¹	30°C	5 – 20% de degradação
Fe (III) (FeCl ₃ ou Fe (II) (SO ₄) ₃)	0,005 mol L ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	40°C	Máximo de um dia

Fonte: Adaptada de Baertschi, Alsante e Reed (3)

3.1.1.4 Degradação Fotolítica

A degradação fotolítica de produtos farmacêuticos é definida como o processo de transformação química que uma molécula apresenta quando exposta à luz, seja durante a fabricação ou no armazenamento. A degradação química também pode ocorrer após o medicamento ser ingerido pelo paciente, e este, após a ingestão, estiver exposto à luz solar, fluorescente e/ou luz incandescente. Essa degradação química pode ocorrer quando medicamentos são administrados em formas que permitem a exposição à luz, como em soluções intravenosas ou em frascos transparentes, onde a luz solar, fluorescente ou incandescente pode ativar reações fotolíticas, resultando na decomposição do fármaco e potencialmente reduzindo sua eficácia ou gerando produtos tóxicos. A susceptibilidade do medicamento sob exposição à luz, pode apresentar efeitos de fototoxicidade e reações fotoalérgicas. A principal região de radiação emitida pelas fontes de luz, citadas anteriormente, responsável por gerar tais riscos, são os comprimentos de onda contidos na região ultravioleta (UV)-A (320 – 400 nm), especialmente entre 340 e 400 nm, devido esses serem capazes de penetrarem a pele. (17)

O ponto de partida da degradação fotoquímica inicia-se pela excitação dos elétrons da molécula do estado fundamental para o estado excitado. Uma molécula susceptível a reação fotoquímica é aquela que possui um grupo cromóforo ou grupos funcionais como carbonila e outros que apresentam ligações duplas, capaz de absorver alguns comprimentos de onda presentes na região de luz emitida pelas fontes de luz. Se essas características não forem observadas na molécula, o estado eletronicamente excitado pode voltar ao estado fundamental através da emissão de luz ou por relaxamento físico. (17). Na Figura 2 pode-se observar as etapas que ocorrem após o processo de fotoativação de uma molécula.

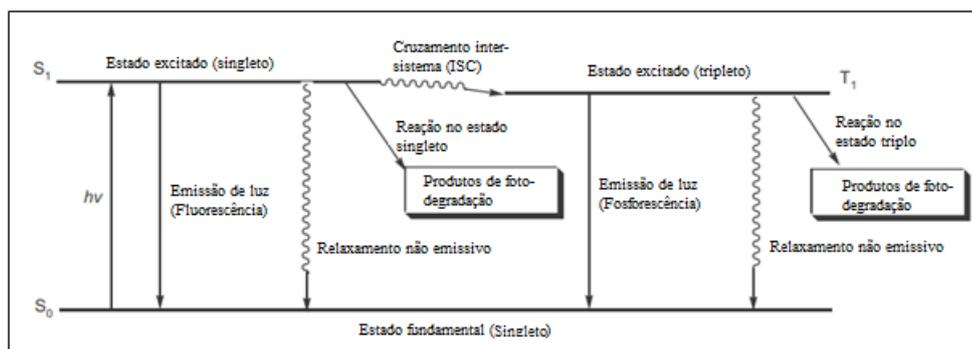


Figura 2: Diagrama de Jablonski mostrando as etapas envolvidas após o processo de excitação eletrônica por meio da incidência de luz de uma molécula

Fonte: Adaptada de Li (16)

A absorção de energia ($h\nu$) em uma molécula orgânica singlete no estado fundamental (S_0) provoca a excitação de um elétron presente no orbital molecular para o estado excitado de menor energia (S_1). O estado excitado S_1 voltará ao estado fundamental (S_0) devido ao processo de desativação que pode ocorrer por meio de três maneiras: primeiramente, por relaxamento vibracional, provocando a colisão com outras moléculas; (2) em segundo, por meio da emissão de luz na forma de fluorescência; e por último, o estado S_1 pode passar para o estado triplô (T_1). Tal transição entre S_1 e T_1 é conhecida como Cruzamento Intersistemas (do inglês, *Inter System Crossing* – ISC). O estado T_1 pode perder energia emitindo luz na forma de fosforescência e decair para o estado S_0 . Vale ressaltar que a reação fotoquímica só ocorrerá em uma molécula orgânica nos estados S_1 e T_1 , sendo que em S_1 é mais provável ocorrer a reação fotoquímica, pois é o estado excitado de menor energia em relação ao T_1 . (16)

3.1.2 Orientação para Avaliação dos Produtos de degradação Majoritários

Os produtos de degradação são impurezas formadas a partir da decomposição de alguns pontos específicos (grupos funcionais) da molécula do ativo. Conhecendo-se os possíveis produtos de degradação, pode-se compreender melhor a estabilidade intrínseca do ativo. (18)

Alsante *et al.* (18) definiram uma metodologia de avaliação para se escolher os produtos de degradação mais relevantes no estudo de degradação forçada. De maneira prática, a metodologia consiste na avaliação, em duas etapas, de uma amostra estressada que apresente degradação significativa. Em cima disso, inicialmente são estabelecidos os produtos de degradação principais, que são aqueles com área que represente pelo menos 10% da quantidade total de degradação em área do componente principal. Uma outra forma de avaliação, é a observação dos produtos de degradação com área que represente pelo menos 25% da área obtida para o maior produto de degradação.

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE APIXABANA PARA O ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA (EDF)

A avaliação da estrutura da molécula é uma etapa essencial dentro do Estudo de Degradação Forçada (EDF), pois, consiste numa análise teórica para entender os possíveis mecanismos de degradação para a molécula do fármaco.

Por meio da avaliação teórica da molécula de apixabana será possível descrever as interações dos grupos funcionais com as principais rotas de degradação e propor as possíveis impurezas que podem ser formadas com base em estresse ácido.

A apixabana (*1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil]-4,5-dihidropirazolo[3,4-c]piridina-3-carboxamida*) (19), comercializado no Brasil sob o nome de Eliquis® pela empresa Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda, apresenta-se na forma de comprimido revestido. O medicamento é um inibidor do fator Xa sendo utilizado para prevenção de tromboembolismo venoso em cirurgias de quadril e joelho. Adicionalmente pode ser utilizado para prevenção de acidente vascular cerebral (AVC) e embolia sistêmica em pacientes portadores de fibrilação atrial não valvular (20). A estrutura da molécula pode ser observada na Figura 3.

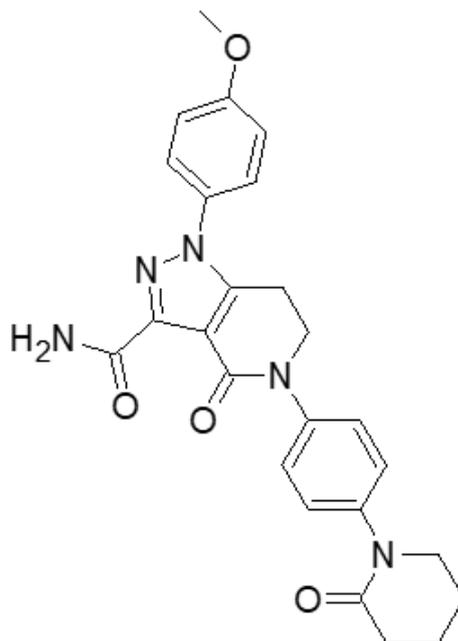


Figura 3: Estrutura química de apixabana

Fonte: O Autor (2023)

A apixabana (Figura 4) apresenta 3 grupos funcionais de relevância a considerar durante o estudo preditivo: amidas, éter aromático e pirazol. Conforme relatado por Clayden, Greeves e Warren (21), o anel aromático não foi sinalizado devido ao mesmo possuir características de alta estabilidade frente a reações e agir somente como coadjuvante com o efeito indutivo e/ou estabilizante dos intermediários de reação.

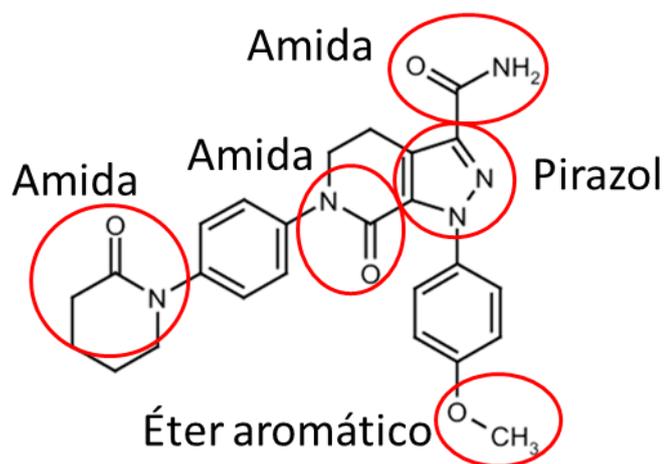


Figura 4: Identificação dos grupamentos funcionais da molécula de Apixabana

Fonte: O autor (2023)

Para entender os possíveis produtos de degradação é necessário entender a reatividade química individual de cada grupo funcional considerando ainda reações cruzadas entre a própria molécula. Uma das ferramentas que pode ser utilizada para a predição destas impurezas é o estudo laboratorial

com exposição a diversos agentes químicos para forçar a reação (hidrólise ácida e básica, oxidação por peróxido e por íons metálicos, redução, termólise seca, termólise úmida e fotólise).

Com o objetivo de entender os possíveis produtos de degradação por hidrólise ácida da molécula de apixabana, Al-Ani *et al.* (22) fizeram o estudo mais abrangente observando a formação de uma impureza significativa em meio ácido. Esta impureza não foi identificada dentro das impurezas conhecidas, mas mostrou que a degradação da molécula de apixabana em meio ácido leva a formação dessa impureza. Já para o meio básico foram encontradas várias impurezas minoritárias sem uma impureza principal. Essa diferença no perfil de degradação da molécula de apixabana por mecanismo de hidrólise em meio ácido e básico está relacionada com a força do nucleófilo em que, no meio básico, há uma espécie carregada negativamente altamente reativa e no meio ácido uma espécie neutra (água). Nas demais condições não foram observadas quedas de teor significativas nem aumento na quantidade de impurezas, sendo o produto considerado estável.

Para Landge *et al.* (23) foram relatados resultados semelhantes nas hidrólises ácida e básica, porém os pesquisadores possuíam a informação do tempo de retenção de alguns compostos relacionados. Segundo o autor supracitado o tempo de retenção de compostos em cromatografia é o intervalo entre a injeção da amostra e o momento em que o composto é detectado. Ele é influenciado por fatores como a interação do composto com a fase estacionária e a fase móvel, além de sua polaridade e tamanho molecular. Esse tempo é fundamental para a identificação e separação de diferentes substâncias. Dentre os compostos conhecidos foi observada a formação da impureza A – um dos compostos previstos pelos mecanismos de degradação apresentados neste documento. Neste mesmo artigo foi avaliado um estresse mais severo sendo observadas mais impurezas no meio ácido e básico, indicando que para o estudo real em laboratório existe uma necessidade de cuidado com as condições de degradação escolhidas, uma vez que estas têm a tendência de levar a impurezas secundárias.

No estudo de Secrétan *et al.* (24) foi evidenciado somente a via hidrolítica levando a uma degradação. Adicionalmente as estruturas dos produtos propostos foram identificadas utilizando a espectrometria de massas. A via de degradação e os produtos apresentados no artigo podem ser encontrados na Figura 5. Os produtos de relevância para o estudo de degradação e, conseqüentemente, para a estabilidade do produto acabado, são os compostos primários. Desta forma os produtos de degradação (PD, em inglês degradation product – DP) DP 3, DP 5 e DP 7 foram originados de etapas mais avançadas e são impurezas que não serão esperadas no estudo. O DP 6 é um produto de transesterificação que só será possível se existir metanol residual no produto acabado. Os DP 2 e DP 4 identificados, correspondem aos produtos de degradação formados a partir das hidrólises dos grupamentos amidas, e se referem respectivamente as impurezas A e B apresentadas no método analítico utilizado nesse documento. Também é possível confirmar que o DP formado em via ácida, que antecede a reação de transesterificação para a formação do DP 6, também corresponde ao DP 2.

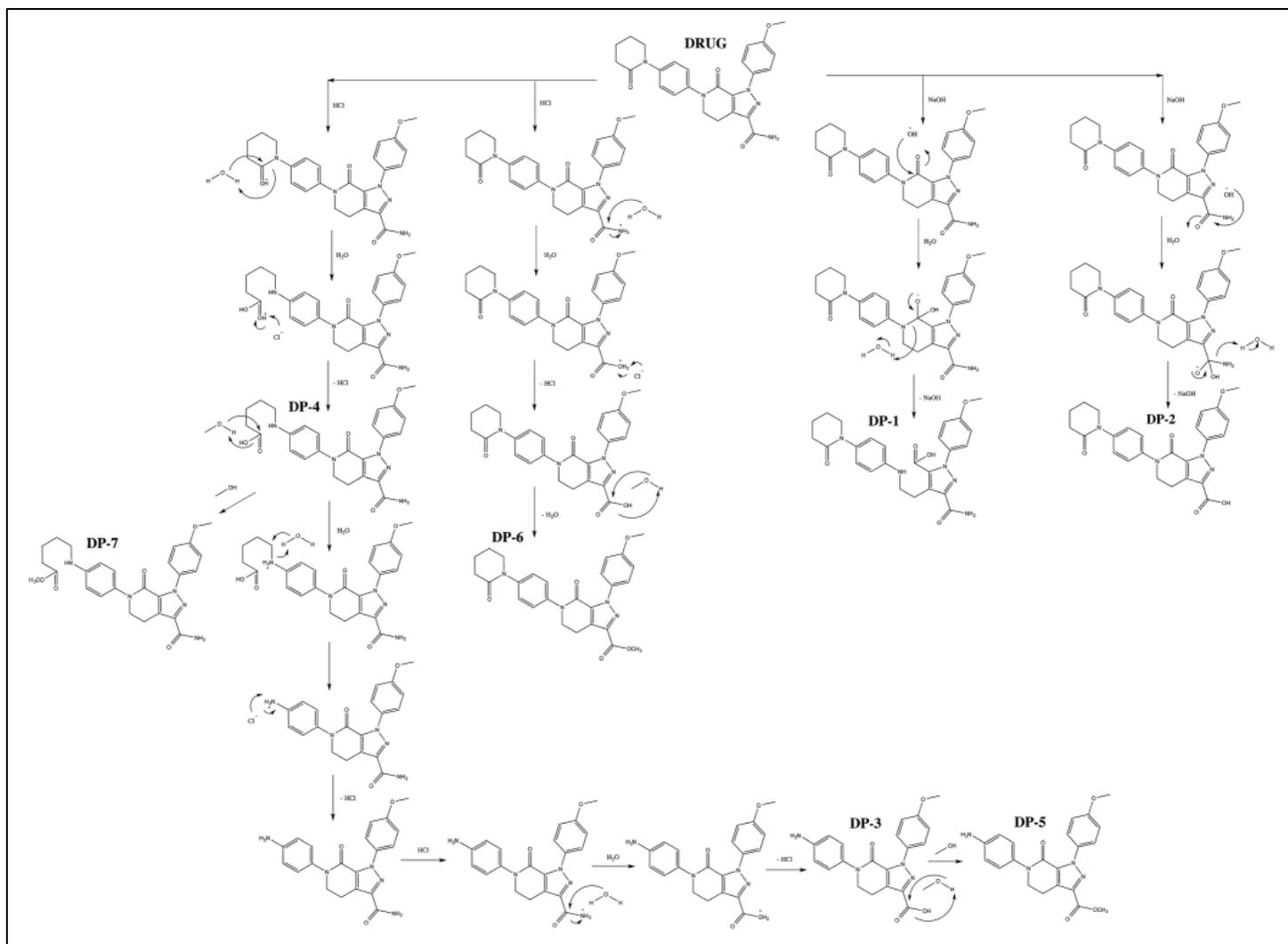


Figura 5: Padrões de degradação propostos para o apixabana em condições de estresse. *Drug: Fármaco; Degradation Product (DP): Produto de Degradação (PD).

Fonte: Secrétan *et al.* (24)

A partir da identificação dos principais grupos funcionais da estrutura química de apixabana e dos estudos de degradação forçada relatados na literatura, foi apresentada uma avaliação individual de susceptibilidade de degradação por hidrólise ácida para cada grupo funcional presente na estrutura química de apixabana.

3.2.1.1 Hidrólise ácida do grupo amida

De acordo com Baertschi, Alsante e Reed (3), moléculas farmacêuticas com grupo funcional amida apresentam susceptibilidade de hidrólise quando armazenadas por longos períodos durante o estudo de estabilidade, devido a presença de alta umidade relativa e temperatura.

Sabe-se que o grupo funcional amida pode sofrer decomposição na presença de umidade catalisada por um agente ácido. E ainda, que a reação de hidrólise pode ocorrer mais rapidamente com o aumento da temperatura. Na Figura 6 foi apresentada a reação global de hidrólise do grupo funcional amida, seguido pela formação dos produtos: um ácido carboxílico e uma amina. (3)

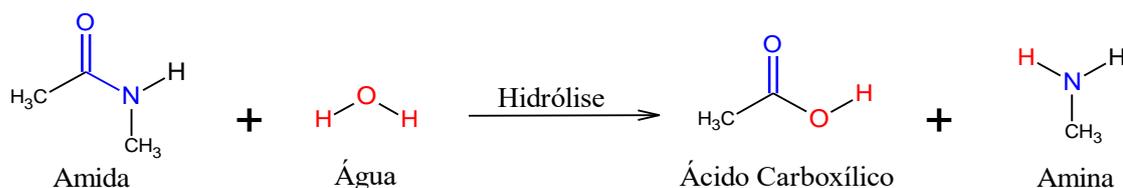


Figura 6: Reação de hidrólise do grupo funcional amida

Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (3)

De acordo com os mecanismos de hidrólise ácida do grupo amida e com os dados da literatura, espera-se que as amidas presentes na molécula de apixabana possam reagir e formar as impurezas DP 2 e DP 4.

3.2.1.2 Hidrólise ácida do grupo éter e do pirazol

O grupo éter é considerado estável, porém, ele pode reagir em meio ácido. Para que um grupo éter sofra clivagem ácida é necessário que a temperatura do meio seja superior a 120°C (3).

Avaliando-se as condições necessárias para promover a clivagem ácida do grupo éter, pode-se afirmar que tais condições não são viáveis de se realizar no estudo de degradação forçada nesse projeto, pois elas não permitem realizar uma análise preditiva da degradação da molécula de apixabana ao longo do estudo de estabilidade.

O anel pirazol apresenta geometria planar, que possibilita ataque nucleofílico por cima ou por baixo, todavia, as ligações π presentes apresentam grande densidade eletrônica, que por consequência, promove a repulsão eletrostática de nucleófilos e/ou promove o efeito de conjugação por efeito de ressonância. Portanto, espera-se que esta porção da molécula não contribua ativamente para as degradações. (30, 31).

A partir das informações sobre a estabilidade dos grupos funcionais éter e pirazol, espera-se que não apareçam impurezas de degradação a partir da clivagem ácida.

3.3 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS

A abordagem de planejamento fatorial de experimentos (do inglês, *Design of Experiments* - DoE) permite entender e avaliar os efeitos apresentados em uma resposta de interesse (variável dependente) a partir das variações na condição de cada um dos fatores (variáveis independentes) e por meio das interações que podem ser observadas entre os fatores presentes em um processo. O DoE ocorre através da alteração proposital dos valores (níveis) dos fatores que possam influenciar no comportamento de uma certa variável resposta de interesse. (32)

O DoE foi desenvolvido por Ronald Aylmer Fisher, na Inglaterra, na década de 1920 (33). Com o surgimento do DoE houve uma mudança no método científico, pois, ao invés de se variar apenas uma variável por vez, passou-se realizar uma avaliação multivariável, com o objetivo de se identificar os efeitos gerados pelas interações de maneira econômica. (32)

A abordagem DoE pode ser definida como um teste onde são realizadas alterações propositalmente nas variáveis de entrada de um processo, com o objetivo de se observar e identificar os motivos para as mudanças que podem ocorrer na resposta (34)

3.3.1 Principais Modelos Experimentais: Com Foco na Abordagem DoE

Existem duas abordagens de planejamento experimental: univariada e multivariada. A abordagem univariada consiste em variar um fator de cada vez (do inglês, *One Factor at a Time – OFAT*), enquanto os outros fatores envolvidos no processo permanecem constantes. Nessa abordagem, não são avaliadas as interações entre os fatores, devido não serem variados simultaneamente. (35)

Na abordagem multivariada, a avaliação dos efeitos dos fatores nas respostas de interesse é realizada simultaneamente, permitindo a verificação dos efeitos gerados pelas interações entre os fatores. Além disso, um planejamento experimental fundamentado no conceito multivariado, é realizado de acordo com um número de experimentos pré-determinados, garantindo um racional científico organizado. (35)

Um dos principais modelos experimentais multifatoriais de otimização, *Modelo com Composto Central e com Pontos Axiais*. Esse modelo é amplamente utilizado para otimização, isto é, de conhecer melhor a relação entre fatores e resposta, permitindo modelar superfícies de resposta complexas. (35)

O modelo experimental *Modelo com Composto Central e com Pontos Axiais* é frequentemente preferido, pois utilizam até 5 níveis de cada fator com menos experimentos em comparação ao *Modelo Fatorial Completo de Três Níveis*. O *Modelo com Composto Central e com Pontos Axiais* é composto por pontos do desenho fatorial, pontos axiais e o ponto central, e sua representação espacial tridimensional é útil para análise. (2)

Tabela 8 pode ser observado a estrutura do modelo experimental multifatorial de otimização *Modelo com Composto Central e com Pontos Axiais*.

Tabela 8: Modelo experimental fatorial Modelo com Composto Central e com Pontos

Axiais.

N ^o experimentos	Fator A	Fator B	Fator C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	-1	0	0
13	1	0	0
14	0	0	-1
15	0	0	1
16	0	-1	0
17	0	1	0

3.3.2 Aplicação da Metodologia de Superfície Resposta no Planejamento Fatorial

A Metodologia de Superfície de Resposta (do inglês, *Response Surface Methodology* - RSM), é uma ferramenta constituída principalmente de mecanismos matemáticos e estatísticos que teve origem por volta da metade do século 20 (36). A criação da RSM, foi idealizada por seus criadores para ser uma ferramenta inteligente capaz de ajustar e otimizar processos complexos, isto é, processos com muitas variáveis envolvidas (37). Isso é possível, pois na execução da RSM são utilizados modelos matemáticos que demonstram como diferentes fatores (variáveis independentes) afetam um resultado que nos interessa (variável dependente ou variável resposta). (38)

A RSM tem como alvo central melhorar processos na indústria, como fabricar produtos de maior qualidade e tornar processos mais eficientes (36). Além disso, a RSM tem alguns objetivos

principais. Um deles é descobrir as melhores combinações de fatores que afetam um resultado importante, seja para fazer o resultado ser o maior possível ou o menor possível. Também serve para entender como esses fatores interagem entre si e com o resultado. Outro objetivo é evitar perder tempo e recursos efetuando experimentos desnecessários, então a RSM ajuda a escolher os experimentos mais significativos (39). E ainda, consegue obter modelos matemáticos que podem descrever o comportamento das respostas em condições diferentes dentro da sua faixa de validade (40)

A otimização de processos por meio da RSM pode ser estruturada em três fases distintas. Inicialmente, é conduzido o estágio preliminar, no qual ocorre a definição dos parâmetros independentes e seus respectivos níveis. Subsequentemente, no segundo estágio, ocorre a escolha de um modelo de planejamento fatorial, juntamente com a elaboração, previsão e validação da equação do modelo desenvolvida. Finalmente, no terceiro e último estágio, são gerados os gráficos da superfície de resposta e dos contornos, os quais demonstram a variação da resposta em função das variáveis independentes, além da identificação dos pontos ótimos de operação. (36)

A RSM pode ser aplicada principalmente como uma etapa importante dentro da abordagem de Planejamento Fatorial (do inglês, *Design of Experiments - DoE*). Os gráficos de superfície resposta podem ser utilizados na representação dos resultados obtidos por meio dos modelos de otimização da abordagem *DoE*, para que possam ser realizadas as etapas de verificação do comportamento de uma variável resposta em relação as mudanças observadas nas variáveis independentes e a observação das melhores condições testadas das variáveis independentes. (2, 36)

3.3.3 Aplicação da Função de Desejabilidade no Planejamento Fatorial

A "Função de Desejabilidade" surge como um marco significativo na otimização de múltiplas respostas em processos complexos, tendo sido apresentada inicialmente em 1965. Essa abordagem, introduzida por Harrington, tinha o propósito de aprimorar a busca pelo equilíbrio entre os fatores (variáveis de entrada) e as várias medições (variáveis de saída) de um processo. Ao longo dos anos, especialmente por volta de 1980, Derringer e Suich refinaram essa ideia, expandindo-a para converter uma gama diversificada de respostas em uma única medida padronizada, conhecida como "desejabilidade composta", ao aplicar pesos a essas respostas. A relevância dessa função é notável devido à sua habilidade em simplificar e unificar respostas distintas em uma única escala, solidificando-se como uma ferramenta de otimização valiosa com aplicabilidade abrangente em diversas áreas de atuação. (41)

A ideia de função de desejabilidade, proposta por Derringer e Suich, baseia-se na aplicação da RSM para elaborar uma equação matemática que possa descrever o comportamento da variável

resposta de interesse em relação as alterações apresentadas nos fatores. Após a aplicação da RSM, a variável resposta é estimada (Y_i), e em seguida é transformada em uma variável resposta de desejabilidade (d_i).

Para se avaliar a magnitude da desejabilidade da variável resposta, é necessária a definição de uma faixa de controle para a variável Y_i , isto é, um valor mínimo aceitável (Y_{i*}) e um valor máximo aceitável ($Y_{máx.}$). Por último, a variável d_i é avaliada em uma escala contínua de 0 a 1 em relação aos valores dos fatores testados. Onde $d_i = 0$ significa que o valor da variável Y_i está fora da faixa de controle ($Y_i < Y_{mín.}$ ou $Y_i > Y_{máx.}$), portanto, os valores dos fatores testados não produzem resultados desejáveis ou otimizados. Se $d_i = 1$ significa que o valor da variável Y_i está dentro da faixa de controle ($Y_i \geq Y_{mín.}$ ou $Y_i \leq Y_{máx.}$), portanto, os valores dos fatores testados produzem resultados desejáveis ou otimizados. (41)

Essa função de desejabilidade permite transformar várias variáveis de resposta em um único valor que seus usuários finais podem considerar em seu processo de tomada de decisão. Outra vantagem é que a abordagem baseada na desejabilidade é fácil de entender e flexível o suficiente para incluir pesos individuais para vários fatores. Também é interessante escolher entre diferentes combinações desses elementos. As funções de desejabilidade também fornecem valores de resposta compostos que simplificam as comparações entre os itens. Além disso, a função de desejabilidade é uma ferramenta de implementação computacional útil. Também pode ser desenvolvido ainda mais facilmente em software. (42)

3.3.4 Aplicação de Design Space (DS) no Planejamento Fatorial

O conceito de Design Space (DS) ou Espaço de Trabalho foi mais bem definido por meio do guia “Pharmaceutical Development Q8 (R2)”, publicado em agosto de 2009 pelo Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (do inglês, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH*). (43)

De acordo com o guia “Pharmaceutical Development Q8 (R2)”, o DS é definido como um espaço de trabalho que contém várias variáveis de entrada (variáveis independentes ou fatores) de um processo ou de um método analítico, e ao mesmo tempo, o DS permite avaliar o impacto das variáveis de entrada nas variáveis de saída (variáveis respostas ou variáveis dependentes) críticas de um processo ou de um método analítico. A metodologia do DS consiste na avaliação dos riscos envolvidos, na realização de experimentos multivariados e análise de interações entre as variáveis de entrada, para elaborar espaços de trabalho onde a qualidade consistente pode ser alcançada. (43)

A metodologia apresentada pelo DS é considerada uma forma sistemática de se chegar em produto ou método que apresente qualidade, segurança e eficácia, pois, consiste em determinar uma região ótima de trabalho fundamentada no conhecimento (2). As vantagens do DS por ser uma abordagem sistemática, são a obtenção de flexibilidade de operação e de flexibilidade regulatória (2, 43). A flexibilidade de operação, se deve ao fato de o DS apresentar um espaço seguro de trabalho, ou seja, é possível prever resultados satisfatórios trabalhando-se com faixas de valores para as variáveis independentes. E a flexibilidade regulatória está relacionada com o espaço seguro de trabalho, demonstrando a magnitude da robustez e o domínio do conhecimento em relação ao processo ou ao método analítico. (43)

Nas Figura 7 e Figura 8 as variáveis resposta de dissolução e friabilidade foram apresentadas por meio dos gráficos de contorno em função dos parâmetros 1 e 2, respectivamente. Os parâmetros 1 e 2 são fatores da etapa de granulação (por exemplo, quantidade água, tamanho do grânulo, característica de um excipiente) que podem afetar a taxa de dissolução e a performance de friabilidade de um comprimido. Pode-se observar no gráfico de contorno de dissolução e no gráfico de contorno de friabilidade a demonstração do DS em comum para cada variável resposta por meio de uma região branca, que foi definida por uma combinação não linear das faixas dos parâmetros 1 e 2, que proporciona dissolução desejada (maior que 80%) e friabilidade desejada (menor que 2%). (43)

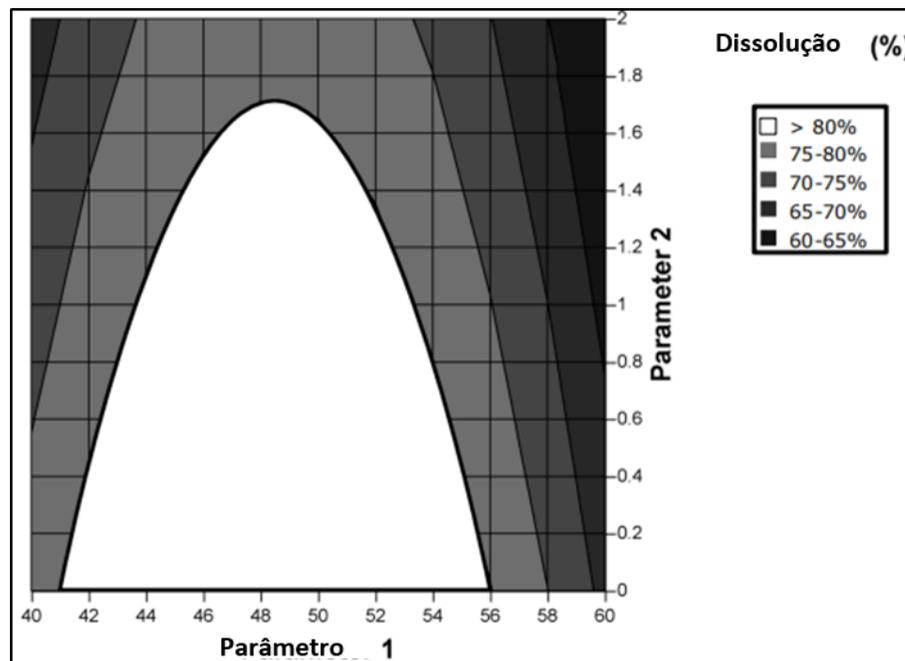


Figura 7: Gráfico de contorno de dissolução em função dos parâmetros 1 e 2, com demonstração do Design Space (DS) por meio da região em branco, onde pode-se obter resultados de deseabilidade (maior que 80%). *Parameter – Parâmetro; Dissolution – Dissolução

Fonte: International Conference on Harmonization (43)

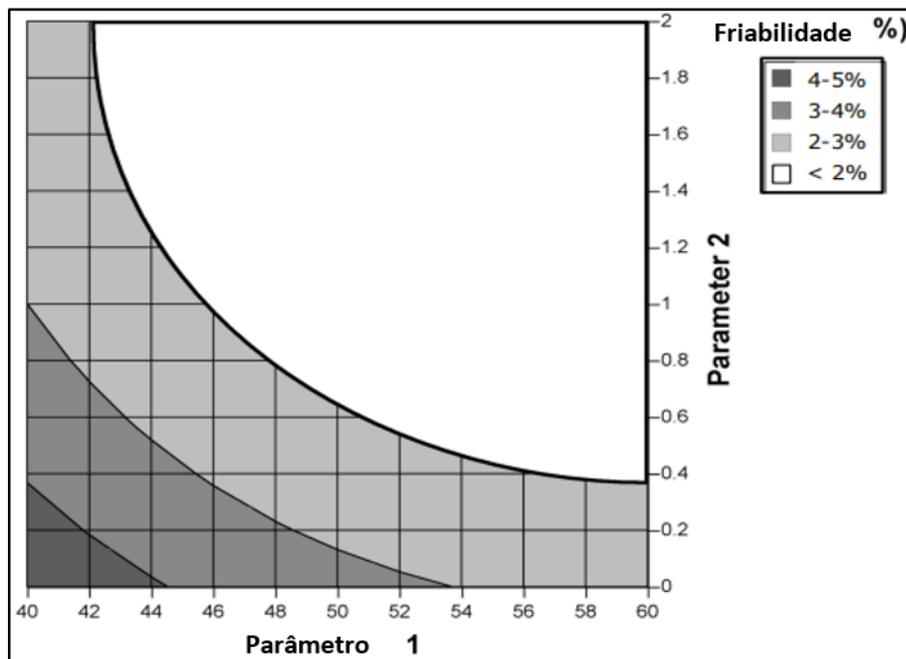


Figura 8: Gráfico de contorno de friabilidade em função dos parâmetros 1 e 2, com demonstração do Design Space (DS) por meio da região em branco, onde pode-se obter resultados de desejabilidade (menor que 2%).*Parameter – Parâmetro; Friability - Friabilidade

Fonte: International Conference on Harmonization (43)

Na Figura 9 pode-se observar o DS que foi definido a partir da sobreposição do DS de dissolução e do DS de friabilidade. Por meio do DS da Figura 9 é possível trabalhar com faixas de valores para os parâmetros 1 e 2 da etapa de granulação de maneira que a desejabilidade de dissolução e a desejabilidade de friabilidade sejam alcançadas conjuntamente. (43)

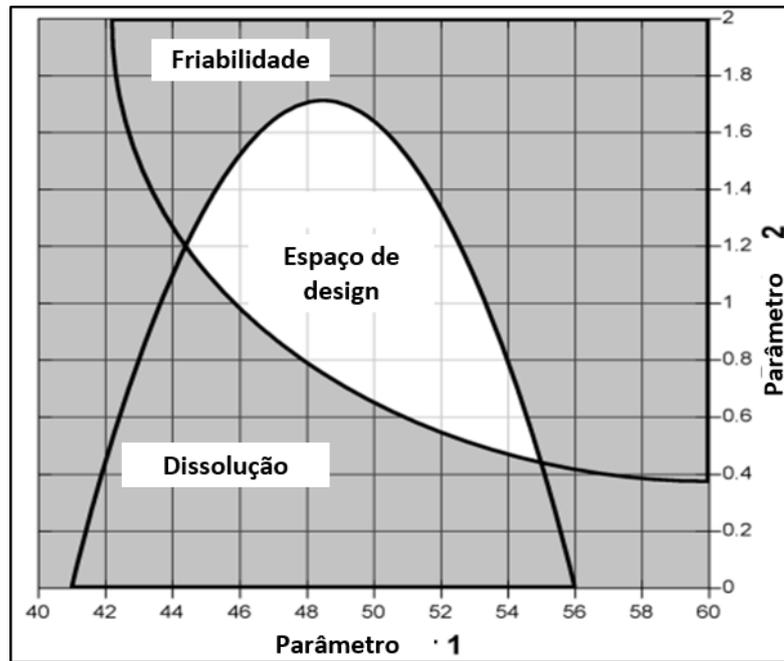


Figura 9: Design Space (DS) proposto, composto pela região de sobreposição das faixas de valores desejáveis dos parâmetros 1 e 2 da etapa de granulação para friabilidade e dissolução.
 *Parameter – Parâmetro; Dissolution – Dissolução; Friabilidade – Friabilidade; Design Space – Espaço de Trabalho

Fonte: International Conference on Harmonization (43)

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

Como contribuição dessa pesquisa, o trabalho foi realizado nas dependências em laboratório adequado com o uso de todos os recursos cabíveis para a elaboração deste projeto.

4.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram: um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu modelo LC-2030 acoplado com detector de arranjo fotodiodos Ultravioleta-Visível (UV-Vis), utilizando o software Waters Empower™ 3; uma incubadora orbital; uma estufa para manter temperatura constante durante os experimentos; para a avaliação estatística de todo planejamento experimental, foi utilizada uma versão de teste do software Design Expert versão 13; e um Purificador de água de laboratório Milli-Q® Advantage A10.

4.2 PADRÃO, AMOSTRA, REAGENTES E SOLVENTES

Foi utilizado um padrão caracterizado de Apixabana do fornecedor Synthetica, de pureza 99,5% e com data de validade em 18/11/2024; a amostra de Apixabana utilizada foi uma matéria prima do fornecedor Haishing CO PTE LTD e com data de validade em 20/11/2026. O reagente estressante utilizado foi o ácido clorídrico 37% Grau PA. Os solventes utilizados foram acetonitrila, metanol, ácido trifluoroacético, ambos de Grau HPLC da marca Merck, e água purificada do Tipo I.

4.3 METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia analítica foi realizada em três etapas: preparo das soluções, estudo de degradação forçada e sistema cromatográfico.

4.3.1 Preparo das soluções utilizadas no Estudo de Degradação Forçada

As soluções utilizadas no estudo de degradação forçada foram: Ácido trifluoroacético 0,1%, como Fase Móvel A; Acetonitrila, como Fase Móvel B; Acetonitrila 40%, como Diluente; Padrão de apixabana a $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, como Solução Padrão Estoque em duplicata (preparos independentes); Solução padrão estoque de apixabana diluída para $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, como Solução Padrão Doseamento 1 e 2; Solução padrão estoque de apixabana diluída para $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, como Solução padrão impurezas 1 e 2; Matéria-prima de apixabana a $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, Solução amostra impurezas; Solução Amostra Impurezas diluída para $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diluente, como Solução amostra doseamento; Solução Branco sendo o próprio diluente.

4.3.2 Estudo de Degradação Forçada – Planejamento Fatorial

O estudo de degradação forçada foi explorado de forma a entender os efeitos das variáveis independentes (concentração, tempo e temperatura) nas variáveis dependentes (decaimento de teor, formação de impurezas e balanço de massa - BM) por meio da via de degradação ácida.

Equação do BM

O estudo foi conduzido por estudo fatorial completo variando concentração, tempo e temperatura. O estudo foi conduzido da seguinte maneira:

- 2^3 com pontos axiais nas faces ($\alpha = 1$) e triplicata no ponto central, totalizando 17 experimentos.

Para a realização do estudo de degradação forçada foi utilizada a solução HCl 1 mol L^{-1} como solução de estresse. Na Tabela 9 estão apresentadas as condições experimentais para a realização da análise multivariada. Todas as soluções amostras impurezas utilizadas na análise multivariada apresentaram concentração de apixabana de $750 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As soluções para análise multivariada foram preparadas, misturando água com HCl 1 mol L^{-1} a fim de se obter as concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl para alguns dos testes apresentados na Tabela 9. Após o tempo de degradação, foi adicionado quantidade de NaOH 1 mol L^{-1} para neutralizar as soluções. Após a neutralização, foi adicionado quantidade volumétrica de diluente para se obter 10 mL de solução. Foi realizado as diluições das soluções amostras impurezas para obter soluções amostras doseamento a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diluente.

Tabela 9: Condições experimentais do planejamento fatorial 2³ para o estudo de degradação ácida.

Testes	Níveis – Tempo	Níveis - Temperatura	Níveis – Concentração	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Água (mL)	HCl 1 Mol L ⁻¹ (mL)	HCl (Mol L ⁻¹)	NaOH 1 Mol L ⁻¹ (mL)	Diluyente (mL)
1	-1	-1	-1	6	30	0,9	0,1	0,1	0,1	8,9
2	-1	-1	+1	6	30	0	1	1	1	8
3	-1	+1	-1	6	60	0,9	0,1	0,1	0,1	8,9
4	-1	+1	+1	6	60	0	1	1	1	8
5	+1	-1	-1	24	30	0,9	0,1	0,1	0,1	8,9
6	+1	-1	+1	24	30	0	1	1	1	8
7	+1	+1	-1	24	60	0,9	0,1	0,1	0,1	8,9
8	+1	+1	+1	24	60	0	1	1	1	8
9	0	0	0	15	45	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
10	0	0	0	15	45	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
11	0	0	0	15	45	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
12	0	0	-1	15	45	0,9	0,1	0,1	0,1	8,9
13	0	0	1	15	45	0	1	1	1	8
14	0	-1	0	15	30	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
15	0	+1	0	15	60	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
16	-1	0	0	6	45	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5
17	+1	0	0	24	45	0,5	0,5	0,5	0,5	8,5

4.3.3 Sistema Cromatográfico

Foi utilizado o método analítico do fornecedor Micro Labs, um fabricante de matéria-prima da apixabana, para quantificar as impurezas e o teor de apixabana nas soluções amostras sem degradação e com degradação forçada. Foi escolhido este método analítico, devido a quantidade de impurezas específicas que são controladas, sendo 7 no total: Impurezas A, B, C, D, E, F e AIX – 4.

Na Tabela 10 foram descritos os parâmetros cromatográficos do sistema cromatográfico.

Tabela 10: Parâmetros do sistema cromatográfico.

Fase móvel	Gradiente conforme Tabela 11
Solução limpeza da coluna cromatográfica	Acetonitrila 10%
Solução limpeza do injetor	Acetonitrila 70%
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Coluna cromatográfica	Zorbax SB C8 250 mmol L ⁻¹ x 4,6 mmol L ⁻¹ x 5 µm
Temperatura do forno da coluna	25°C ou ambiente
Detector UV/Vis	Comprimento de onda de 280 nm
Tempo de corrida	50 minutos
Tempo de retenção de Apixabana	Aproximadamente 16,4 minutos
Tempo de retenção relativo das impurezas específicas em relação a Apixabana	Impureza C: 0,28
	Impureza B: 0,38
	Impureza A: 0,85
	Impureza F: 1,21
	Impureza D: 1,28
	Impureza E: 1,33
	Impureza AIX-4: 1,47

Na Tabela 11 contém as informações do método de gradiente utilizado.

Tabela 11: Gradiente de teste conforme método de fabricante.

Tempo (min)	Ácido trifluoroacético 0,1% (%)	Acetonitrila (%)
0	70	30
10	70	30
30	30	70
35	30	70
40	70	30
50	70	30

Na Figura 10 foram apresentadas as estruturas químicas de cada impureza específica de apixabana.

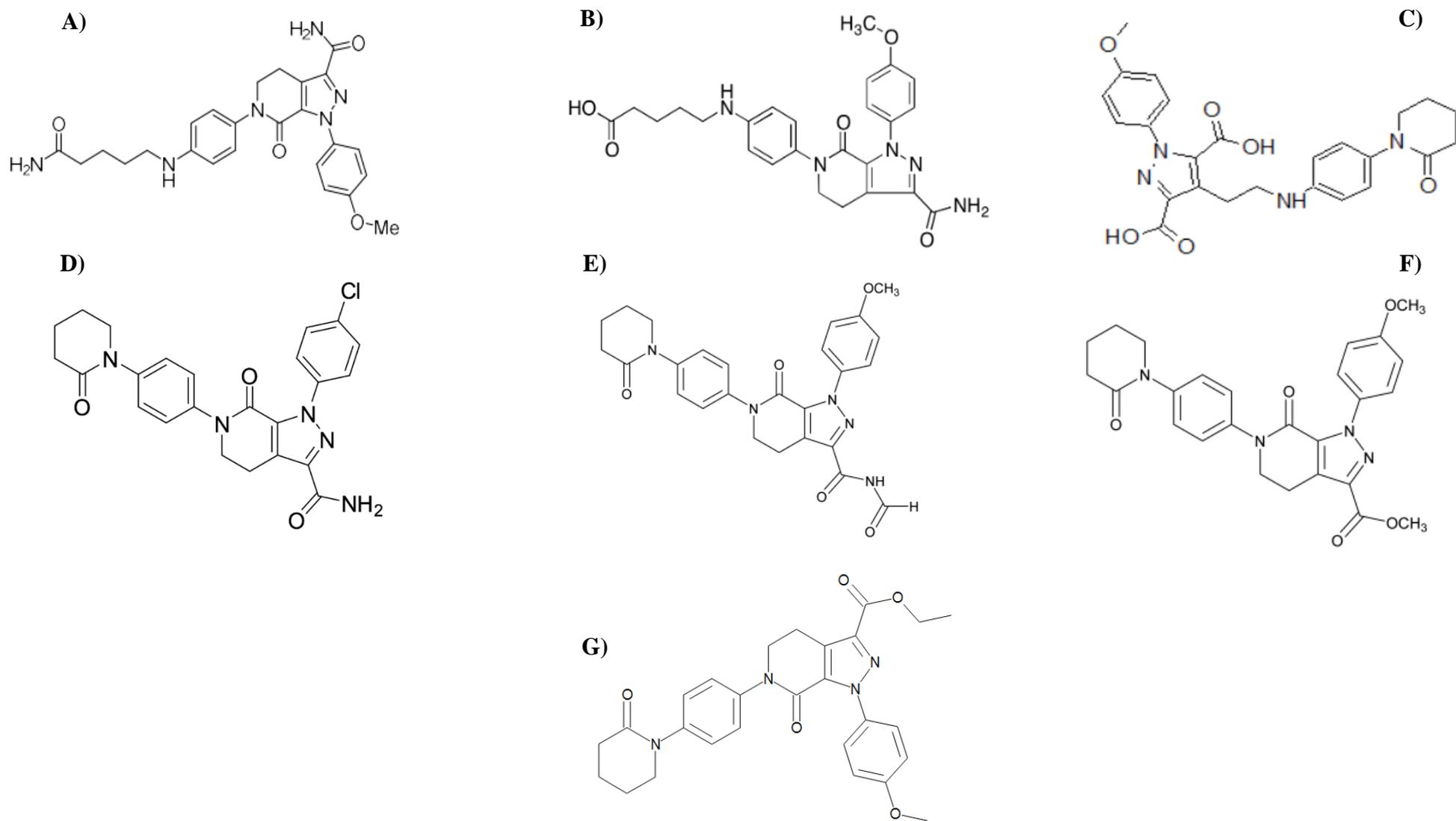


Figura 10: Estrutura química das impurezas específicas Impureza C (A), Impureza B (B), Impureza A (C), Impureza F (D), Impureza D (E), Impureza E (F) e Impureza AIX-4

Fonte: O Autor (2024)

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de resultados foi realizada em dois momentos. No primeiro momento, foram avaliados os resultados obtidos de impurezas e de teor nas soluções amostras impurezas e doseamento, respectivamente. Após essa avaliação, foi realizada avaliação das amostras submetidas ao estudo de degradação forçada.

5.1 AVALIAÇÃO DA AMOSTRA CONTROLE

Para os testes foi preparado uma amostra controle, isto é, uma amostra sem ser submetida a degradação forçada, para fins comparativos e para o cálculo de balanço de massas. Na Figura 11 pode-se observar o perfil cromatográfico da amostra controle. Nota-se que todos os picos cromatográficos foram separados adequadamente, demonstrando que o método analítico é seletivo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 12, o resultado de teor foi satisfatório, pois ficou próximo de 100%, e os resultados de impurezas ficaram abaixo de limite de desconsideração ($\leq 0,05\%$). Dessa forma, a amostra controle foi aprovada. (Figura 10).

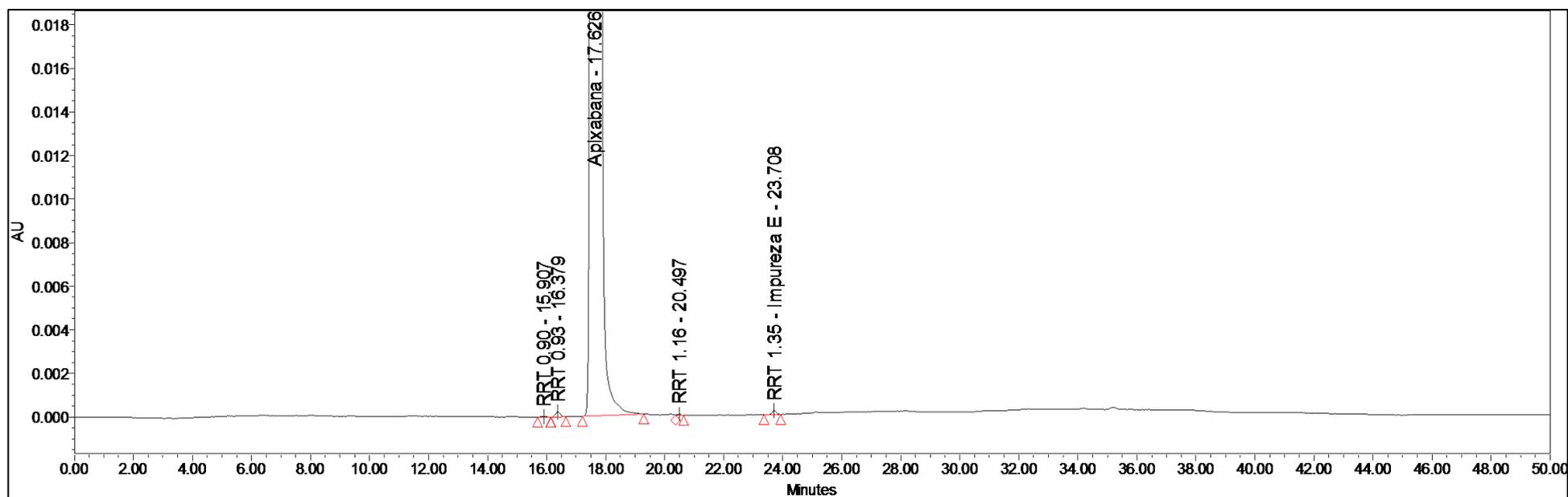


Figura 11: Cromatograma da solução amostra impurezas controle para o estudo de degradação da molécula

Fonte: O Autor (2023)

Tabela 12: Dados quantitativos da solução amostra controle utilizada no estudo de degradação forçada

Identificação	Teor (%)	RRT 0,9 (%)	RRT 0,93 (%)	RRT 1,16 (%)	RRT 1,35 (%)	Totais RRT (%)
Amostra controle	101,573	0,005	0,019	0,003	0,013	0,040

RRT: Relative Retention Time. Limite de desconsideração $\leq 0,05\%$.

5.2 DEGRADAÇÃO ÁCIDA

5.2.1 Resultados

Os resultados parciais do estudo de degradação forçada em meio ácido foram apresentados na Tabela 13 e na Tabela 14. Os cromatogramas referentes a este estudo foram subdivididos no estudo fatorial, pontos centrais e axiais sendo apresentados nas Figura 12 a Figura 14, respectivamente.

Tabela 13: Resultados do estudo de estresse em meio ácido para os experimentos de 1 a 8 (planejamento fatorial completo em dois níveis).

Identificação	Teor (%)	RRT	Totais													
		0,33 (%)	0,34 (%)	0,40 (%)	0,43 (%)	0,83 (%)	0,90 (%)	0,93 (%)	1,15 (%)	0,16 (%)	1,30 (%)	1,35 (%)	1,43 (%)	2,00 (%)	TRR (%)	BM (%)
Teste 1	98,827	-	-	-	-	-	0,006	0,020	-	-	0,002	0,012	0,005	-	0,045	97,299
Teste 2	99,554	-	-	0,068	0,017	-	0,026	0,018	-	-	0,005	0,014	0,003	-	0,151	98,118
Teste 3	98,509	-	-	0,089	-	-	0,021	0,018	-	-	-	0,014	-	-	0,142	97,081
Teste 4	97,268	0,101	-	1,014	0,021	-	0,244	0,013	-	-	-	0,012	-	-	1,405	97,103
Teste 5	101,456	-	-	0,003	-	-	0,005	0,020	0,003	0,003	-	0,015	-	-	0,049	99,890
Teste 6	101,647	-	-	0,105	0,020	-	0,033	0,018	-	0,003	-	0,014	-	0,016	0,209	100,235
Teste 7	100,146	0,013	-	0,359	-	-	0,073	0,017	-	-	-	-	-	-	0,462	99,007
Teste 8	96,184	1,389	-	2,928	0,009	-	0,615	0,011	-	0,003	-	0,013	-	0,015	4,983	99,557

RRT: Relative Retention Time; BM: Balanço de Massa.

Tabela 14: Resultados do estudo de estresse em meio ácido para os experimentos 9 a 17 (ponto central e pontos axiais).

Identificação	Teor (%)	RRT	Totais													
		0,33 (%)	0,34 (%)	0,40 (%)	0,43 (%)	0,83 (%)	0,90 (%)	0,93 (%)	1,15 (%)	0,16 (%)	1,30 (%)	1,35 (%)	1,43 (%)	2,00 (%)	TRR (%)	BM (%)
Teste 9	100,050	0,007	-	0,273	0,010	-	0,058	0,017	0,003	0,003	-	0,013	-	0,017	0,401	98,853
Teste 10	100,564	0,005	-	0,249	0,013	-	0,054	0,018	-	0,005	-	0,013	-	0,017	0,374	99,332
Teste 11	100,115	0,006	0,004	0,219	0,013	0,006	0,056	0,018	0,003	0,005	-	0,013	-	0,017	0,360	98,876
Teste 12	101,245	-	-	0,050	-	-	0,014	0,020	0,003	0,004	0,004	0,013	-	0,016	0,124	99,756
Teste 13	99,709	0,033	-	0,630	0,037	-	0,150	0,016	-	0,004	0,007	0,016	-	0,016	0,909	99,017
Teste 14	100,586	-	-	0,063	0,015	-	0,024	0,019	-	0,004	-	0,013	-	0,017	0,155	99,138
Teste 15	101,247	0,243	-	1,451	0,011	-	0,304	0,014	-	0,004	-	0,014	-	0,019	2,060	101,663
Teste 16	102,404	-	-	0,158	0,013	-	0,039	0,018	-	-	-	0,012	-	-	0,240	101,011
Teste 17	100,336	0,012	-	0,380	0,016	-	0,080	0,017	-	0,004	-	0,013	-	0,018	0,540	99,271

RRT: Relative Retention Time; BM: Balanço de Massa.

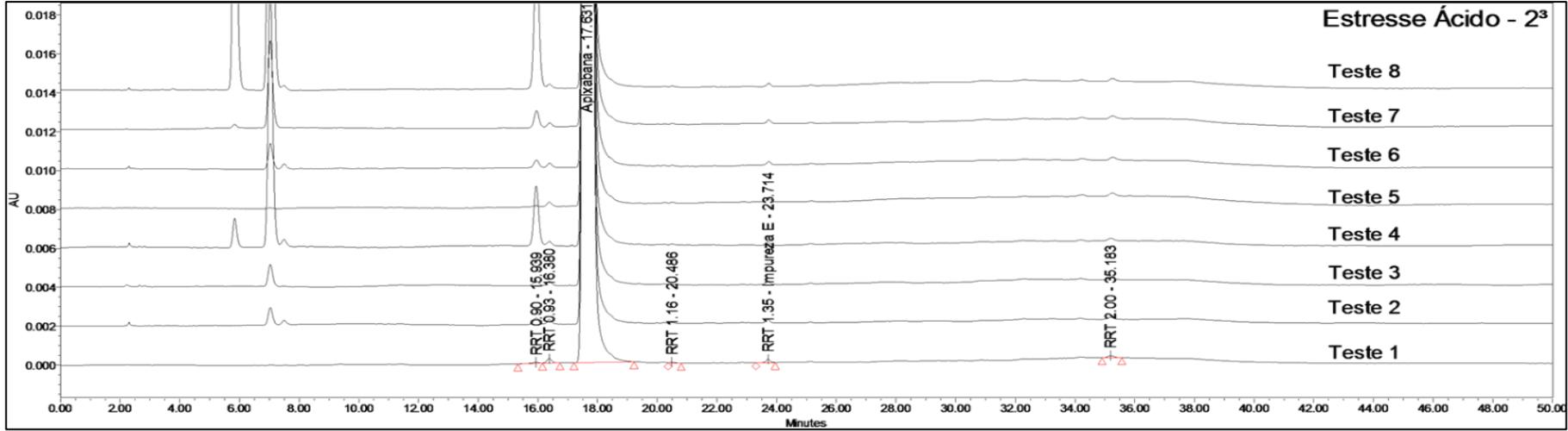


Figura 12: Cromatogramas do estudo fatorial (testes 1-8) em meio ácido

Fonte: O Autor (2023)

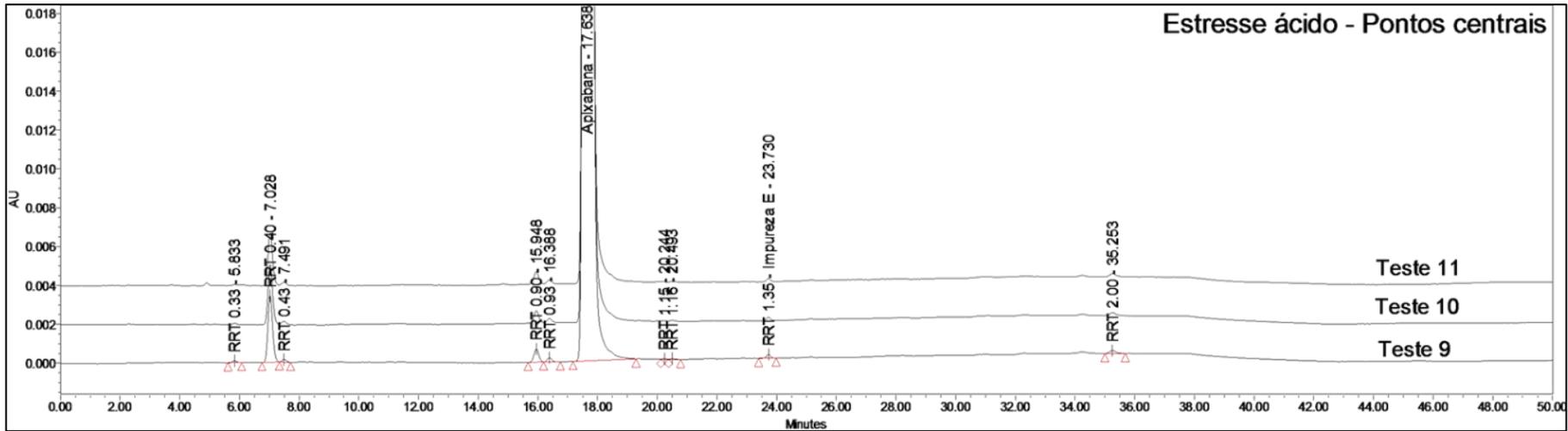


Figura 13: Cromatogramas do ponto central (testes 9-11) em meio ácido

Fonte: O Autor (2023)

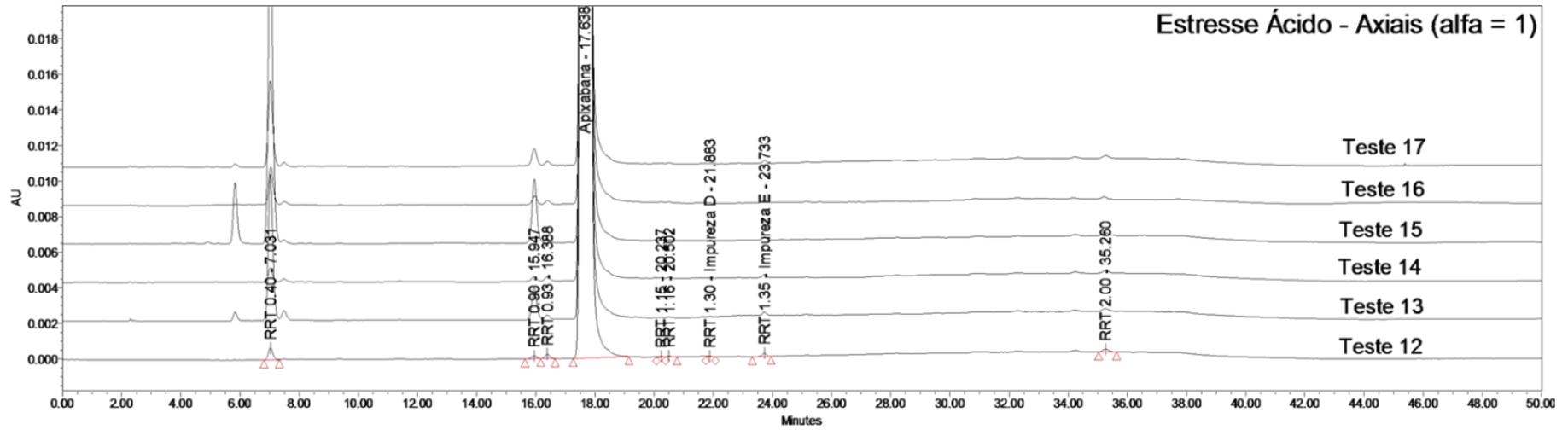


Figura 14: Cromatogramas dos pontos axiais do estudo fatorial (testes 12-17) em meio ácido

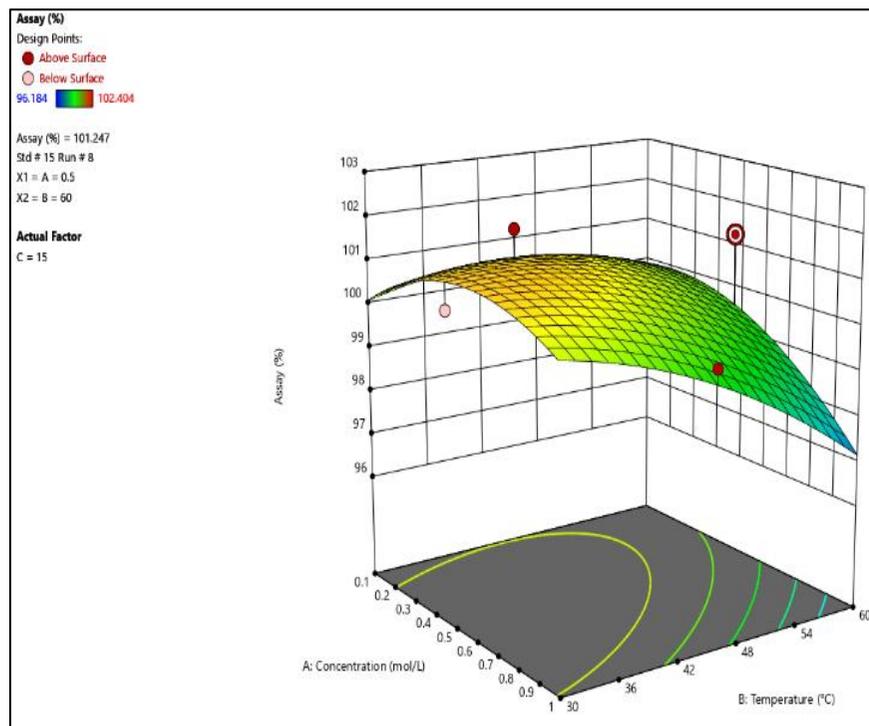
Fonte: O Autor (2023)

Em uma análise preliminar foi possível verificar que a molécula foi sensível a esta condição sendo observado alguns produtos de degradação que se destacam frente aos demais, sendo o RRT 0,33, RRT 0,40 e RRT 0,90 os três produtos de degradação mais evidentes. Correlacionando o método analítico que foi utilizado para a primeira avaliação temos que a impureza B (RRT 0,38) e a impureza A (RRT 0,85) poderiam ser as impurezas RRT 0,40 e RRT 0,90 devido à proximidade das retenções relativas. Estas duas impurezas foram relatadas pelo fabricante como sendo de degradação, e foram posteriormente caracterizadas, o que corrobora a observação feita nesse estudo. Outro fator que ajuda a confirmar a identidade das impurezas foi a via de obtenção, sendo as duas impurezas produto de hidrólise, conforme previsto no tópico Avaliação da estrutura química de Apixabana para o Estudo de Degradação Forçada (EDF).

Em relação a impureza RRT 0,33 pode ser estimado que seja um produto de degradação secundário devido as duas posições diferentes da molécula estarem disponíveis a hidrólise. Pelo observado o RRT 0,40 forma primeiro e, conforme há o andamento da reação ocorre a formação do RRT 0,90, também conhecido. No entanto, se faz necessário realizar um estudo de caracterização para a impureza RRT 0,33 para confirmação de que se trata de uma impureza de degradação por via hidrolítica.

Em relação aos dados quantitativos, estes dados foram avaliados de forma estatística a fim de se obter um modelo matemático para a descrição do comportamento de degradação. Adicionalmente foi proposta uma eventual condição ótima onde tanto o decaimento, formação de impurezas e balanço de massas sejam satisfatórios. Inicialmente foram verificados o modelo sugerido e a adequação dos dados a superfície de resposta. Neste gráfico (Figura 15) foram identificados pontos que foram muito influentes no cálculo de obtenção do modelo. Ao serem retirados da proposição do modelo houve um melhor ajuste tanto na superfície de resposta quanto da predição dos dados e a sua respectiva robustez (*design space*), garantindo que o modelo responda melhor às variações dos dados. Assim, a exclusão desses pontos aumentou a qualidade geral do modelo e suas predições.

(a)



(b)

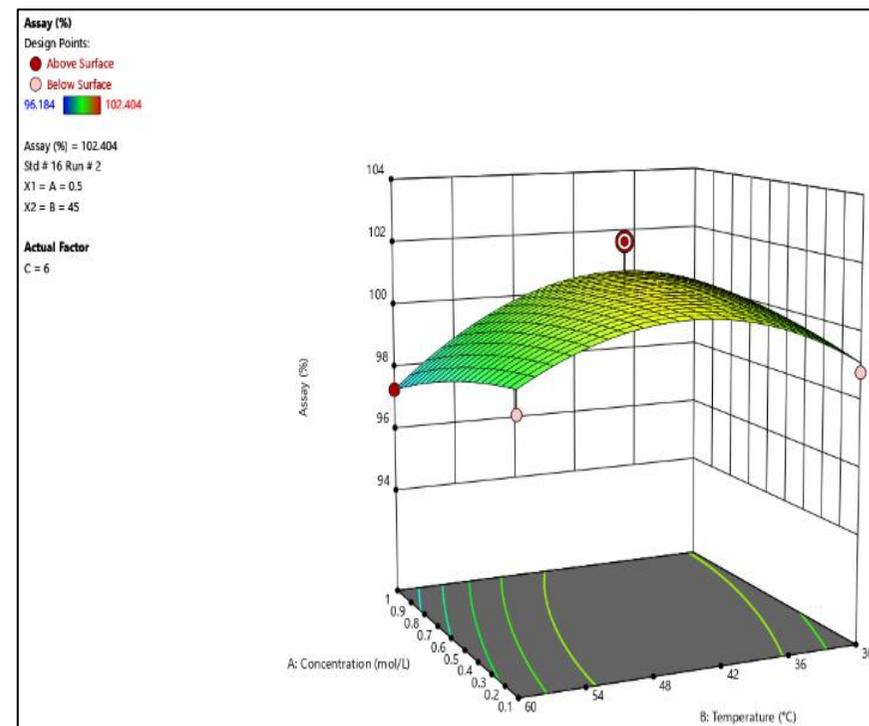


Figura 15: Pontos influentes identificados via gráfico para o teste 15 (a) e para o teste 16 (b). *Assay – Teor; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura

Fonte: O Autor (2023)

Após desconsiderados os níveis influentes no cálculo foi dada sequência a avaliação estatística. A Figura 16b apresentou a recomendação de avaliação quadrática do modelo. Este modelo apresentou o maior R² ajustado para o modelo multivariado. Dessa forma foi seguido para a ferramenta de Análise de variância (ANOVA) conforme Figura 16a. Os dados de falta de ajuste apresentados não foram significantes considerando 95% de confiança, sendo possível fazer inferências sobre o conjunto de dados.

(a)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	31.30	9	3.48	20.67	0.0019	significant
A-Concentration	3.39	1	3.39	20.14	0.0065	
B-Temperature	11.28	1	11.28	67.06	0.0004	
C-Time	3.56	1	3.56	21.16	0.0058	
AB	4.69	1	4.69	27.86	0.0032	
AC	1.32	1	1.32	7.87	0.0377	
BC	2.17	1	2.17	12.91	0.0157	
A ²	0.2005	1	0.2005	1.19	0.3248	
B ²	0.7261	1	0.7261	4.32	0.0924	
C ²	0.4807	1	0.4807	2.86	0.1518	
Residual	0.8413	5	0.1683			
Lack of Fit	0.6846	3	0.2282	2.91	0.2659	not significant
Pure Error	0.1567	2	0.0783			
Cor Total	32.14	14				

(b)

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.0152	0.0535	0.4890	0.0420	
2FI	0.0362	0.0969	0.7446	-0.2686	
Quadratic	0.0259	0.2659	0.9267	0.2523	Suggested
Cubic	0.2659		0.9659		Aliased

(c)

Assay	=
+89.52450	
+3.55495 * Concentration	
+0.326707 * Temperature	
+0.516255 * Time	
-0.113390 * Concentration * Temperature	
-0.100462 * Concentration * Time	
-0.003860 * Temperature * Time	
+1.60087 * Concentration ²	
-0.003160 * Temperature ²	
-0.007143 * Time ²	

Figura 16: ANOVA (a), modelos adequados (b) e modelo matemático (c) propostos para a correlação do estresse com o doseamento

Fonte: O Autor (2023)

Todos os termos primários foram significativos mostrando que a otimização do parâmetro vai ser muito afetada pelas condições experimentais que forem definidas para o estudo de estresse. Além disso, todos os termos de interação binárias foram significativos sendo a mais crítica a interação da concentração com a temperatura que, conforme esperado, era o que favoreceria a maior formação de impurezas sendo modulado pela quantidade de tempo que o ativo seria exposto. Os termos quadráticos na equação foram mantidos para explicar algumas das variações não lineares, porém, de baixa significância para o modelo. A equação que foi gerada foi apresentada na Figura 16c.

Na sequência das avaliações estatísticas foi verificado que os resíduos foram normais, sem *outliers* (resíduos acima de 3 desvios padrões) e a curva dos valores preditos vs os reais estavam bem correlacionados como mostra a Figura 17. Desta forma há um maior indicativo de que o modelo proposto foi adequado e passível de ser levado a inferências de otimização.

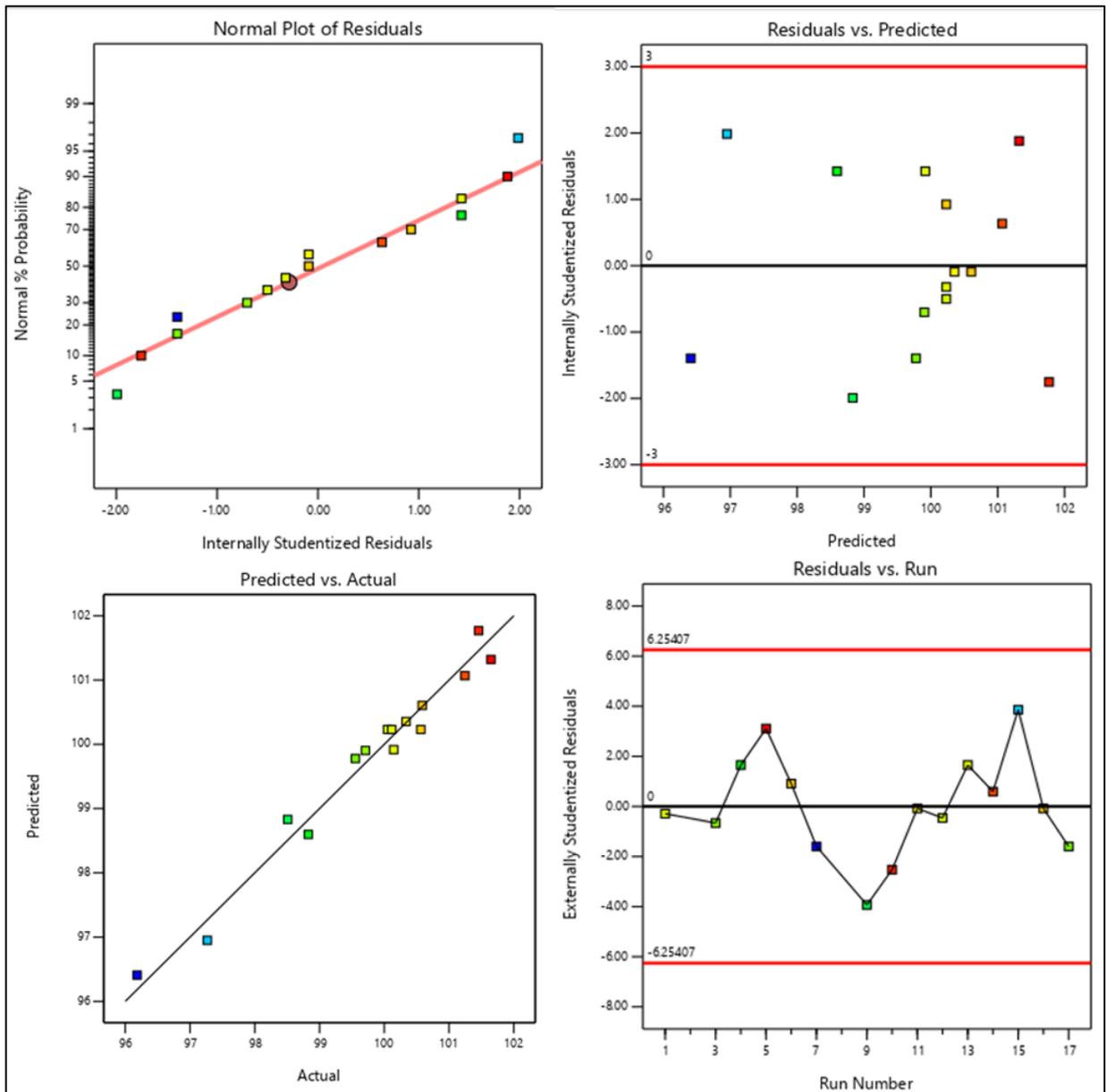
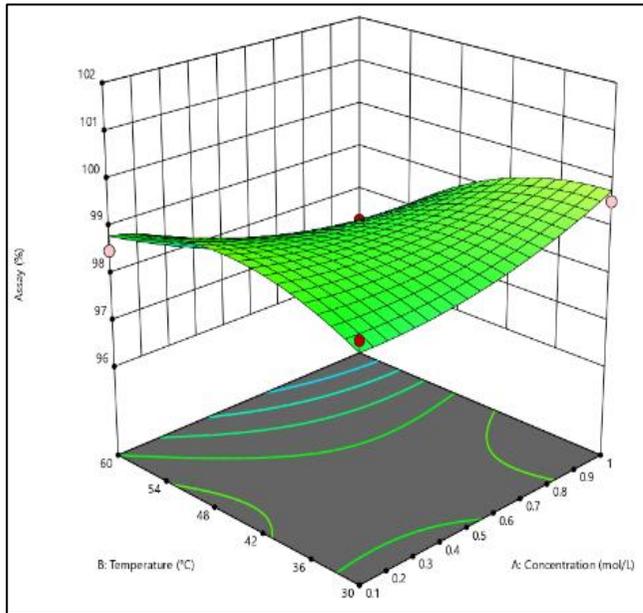


Figura 17: Gráficos de normalidade, outliers, correlação reais vs preditos e dependência nas observações para a resposta de doseamento

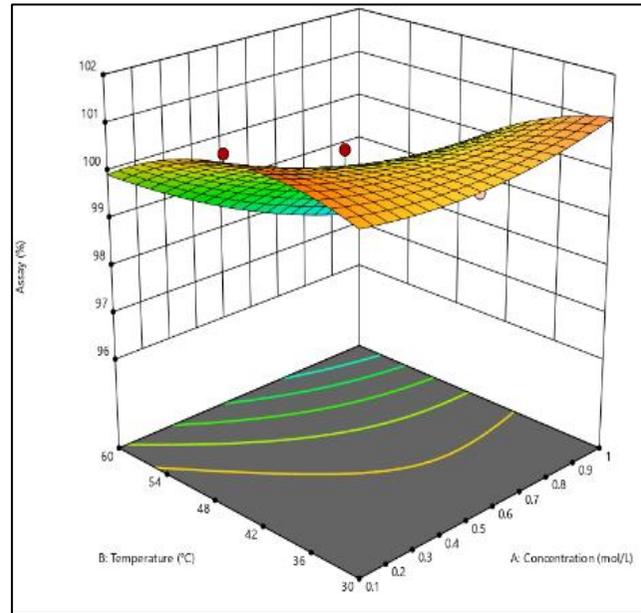
Fonte: O Autor (2023)

A partir dos dados do modelo matemático foi construída a curva de superfície de resposta conforme Figura 18. Como foi possível observar a queda no teor ocorreu em condições de maior severidade do tratamento de apixabana de forma mais pronunciada. Estando de acordo com os valores previstos.

(A)



(B)



(C)

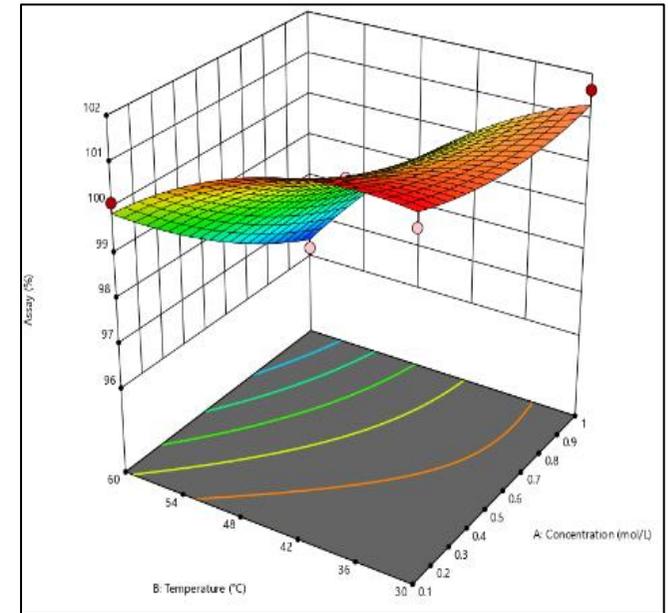


Figura 18: Superfície de resposta para o doseamento em 6h(a), 15h(b) e 24h(c)

Fonte: O Autor (2023)

Para o tratamento de impurezas totais foi verificado que o modelo sugerido foi somente com fatores primários e secundários e o resultado da ANOVA foi apresentado na Figura 19. Como foi possível observar houve uma falta de ajuste. Isso ocorre devido à baixa determinação do erro puro. Nessa situação foi continuado a análise, pois pode estar relacionado com a baixa variabilidade inerente das determinações. Novamente os 3 fatores primários foram significativos com destaque para o tempo, que esteve no limite da aceitação, indicando que este pode ter baixa relevância para o estudo podendo ser controlado com tempo fixo dentro do *design space* trabalhado.

(a)

Response 2: Total Impurities							
	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	19.14	6	3.19	10.34	0.0021	significant
	A-Concentration	4.86	1	4.86	15.76	0.0041	
	B-Temperature	5.59	1	5.59	18.10	0.0028	
	C-Time	1.67	1	1.67	5.40	0.0486	
	AB	3.84	1	3.84	12.45	0.0077	
	AC	1.42	1	1.42	4.60	0.0643	
	BC	1.84	1	1.84	5.96	0.0405	
	Residual	2.47	8	0.3086			
	Lack of Fit	2.47	6	0.4113	947.00	0.0011	significant
	Pure Error	0.0009	2	0.0004			
	Cor Total	21.61	14				

(b)

	Total Impurities	=
	+2.58638	
	-4.63032	* Concentration
	-0.056996	* Temperature
	-0.168990	* Time
	+0.102620	* Concentration * Temperature
	+0.103947	* Concentration * Time
	+0.003552	* Temperature * Time

Figura 19: ANOVA (a) e modelo matemático proposto (b) para a resposta de impurezas totais

Fonte: O Autor (2023)

Na sequência das avaliações estatísticas foi verificado que os resíduos foram normais, sem *outliers* (resíduos acima de 3 desvios padrões) e a curva dos valores preditos vs os reais estavam bem correlacionados, sendo essa uma confirmação que a falta de ajuste não foi relevante para a inferência do modelo, conforme Figura 20. Desta forma, foi possível fazer previsões de resposta.

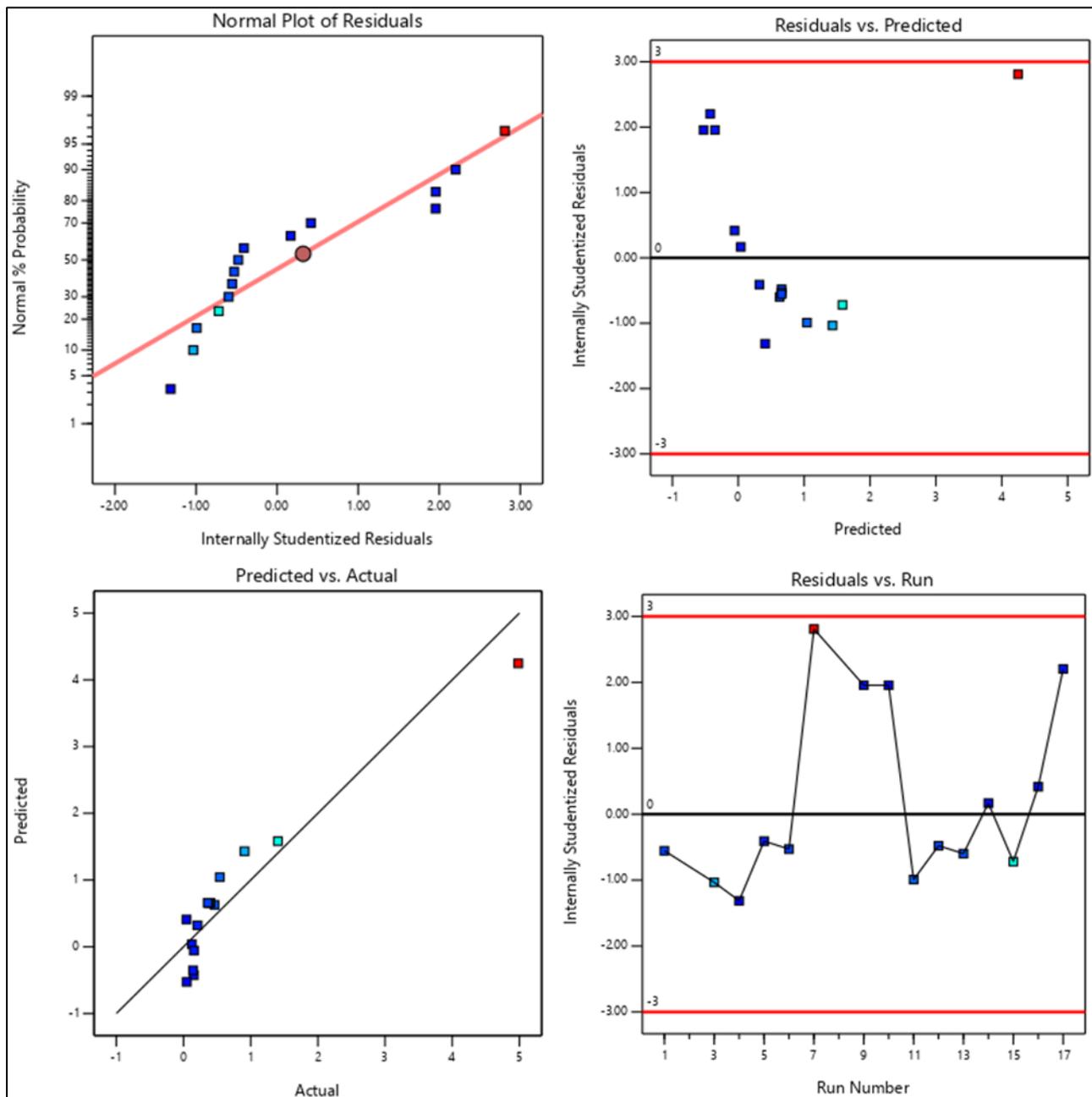
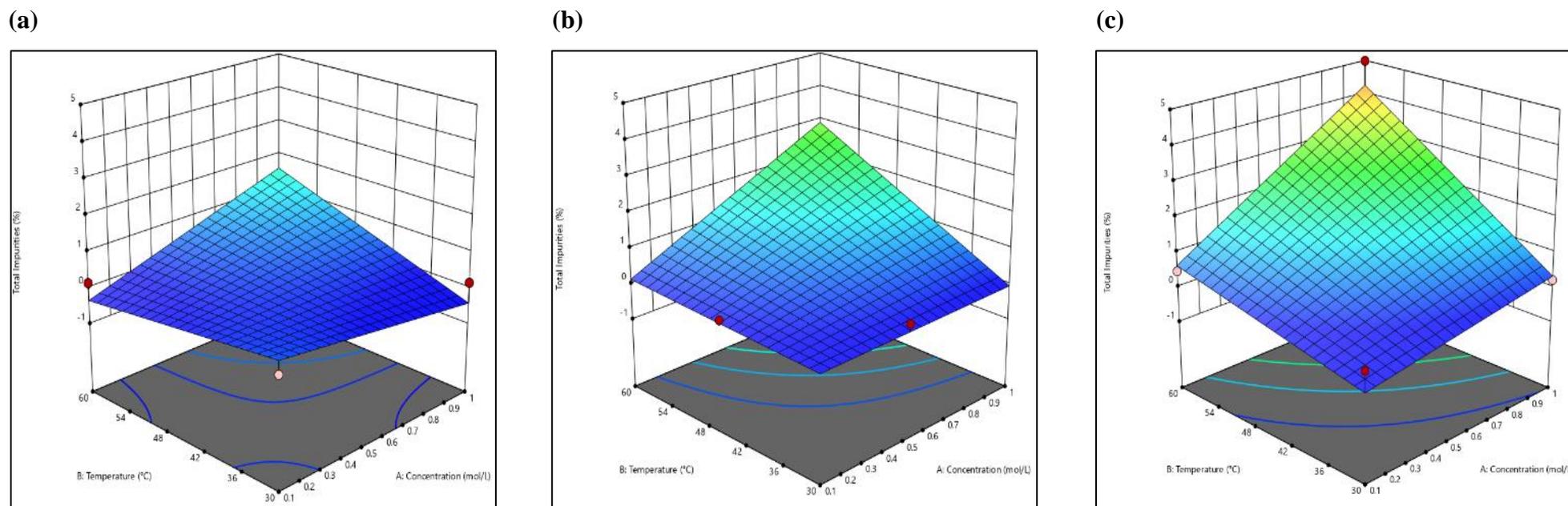


Figura 20: Gráficos de normalidade, outliers, correlação reais vs preditos e dependência nas observações para a resposta de impurezas totais

Fonte: O Autor (2023)

A partir dos dados do modelo matemático foi construída a curva de superfície de resposta, conforme a *Total impurities – Impurezas Totais; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura

Figura 21. Como esperado formação das impurezas ocorreu de forma mais eficiente em condições de maior severidade do tratamento de apixabana.



*Total impurities – Impurezas Totais; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura

Figura 21: Superfície de resposta para impurezas totais em 6h(a), 15h(b) e 24h(c)

Fonte: O Autor (2023)

Para o balanço de massa foi realizado o tratamento estatístico e encontrado uma correlação linear dos dados, sem a interação de maior ordem.

(a)

Response 3: Mass Balance							
	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
	Model	11.37	3	3.79	15.92	0.0003	significant
	A-Concentration	0.0917	1	0.0917	0.3854	0.5474	
	B-Temperature	1.13	1	1.13	4.74	0.0522	
	C-Time	10.22	1	10.22	42.91	< 0.0001	
	Residual	2.62	11	0.2381			
	Lack of Fit	2.47	9	0.2748	3.77	0.2274	not significant
	Pure Error	0.1459	2	0.0730			
	Cor Total	13.99	14				

(b)

Mass Balance	=	
+97.91084		
+0.212432	*	Concentration
-0.023691	*	Temperature
+0.118832	*	Time

Figura 22: ANOVA (a) e modelo matemático proposto (b) para a resposta de balanço de massas

Fonte: O Autor (2023)

Na sequência foram realizadas as avaliações gráficas, conforme Figura 23, e verificou-se que os resíduos foram normais, sem *outliers* (resíduos acima de 3 desvios padrões) e a curva dos valores preditos vs os reais não estiveram bem correlacionados. Isso prejudica a modelagem para a predição teórica. Entretanto, a previsão sempre esteve próxima do 100% sendo essa a condição de trabalho esperada. Portanto, por mais que a previsão não seja a mais adequada o sistema como um todo tende para os valores próximos a 100%. Isso pode ter ocorrido devido a dependência dessa resposta tanto das impurezas totais quanto do doseamento.

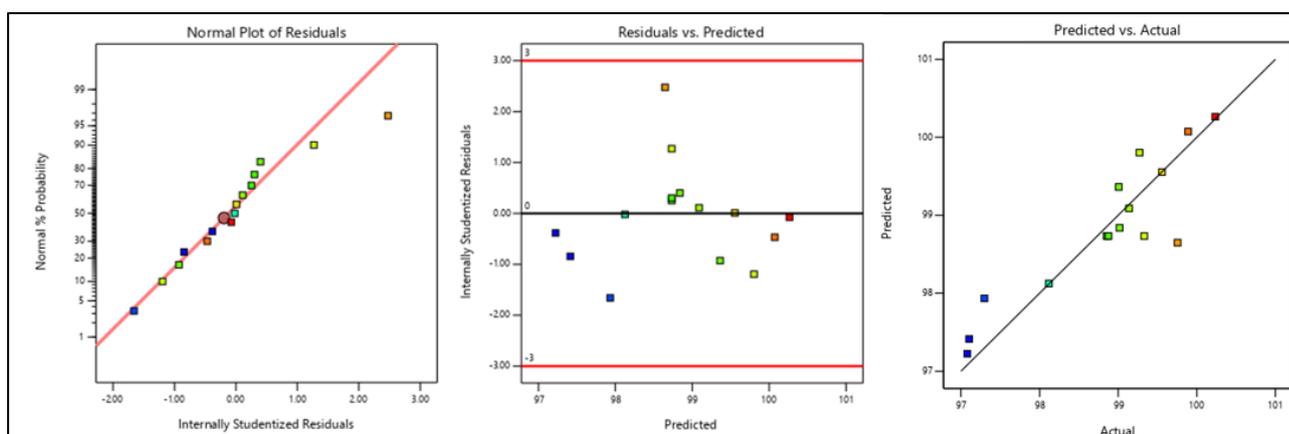
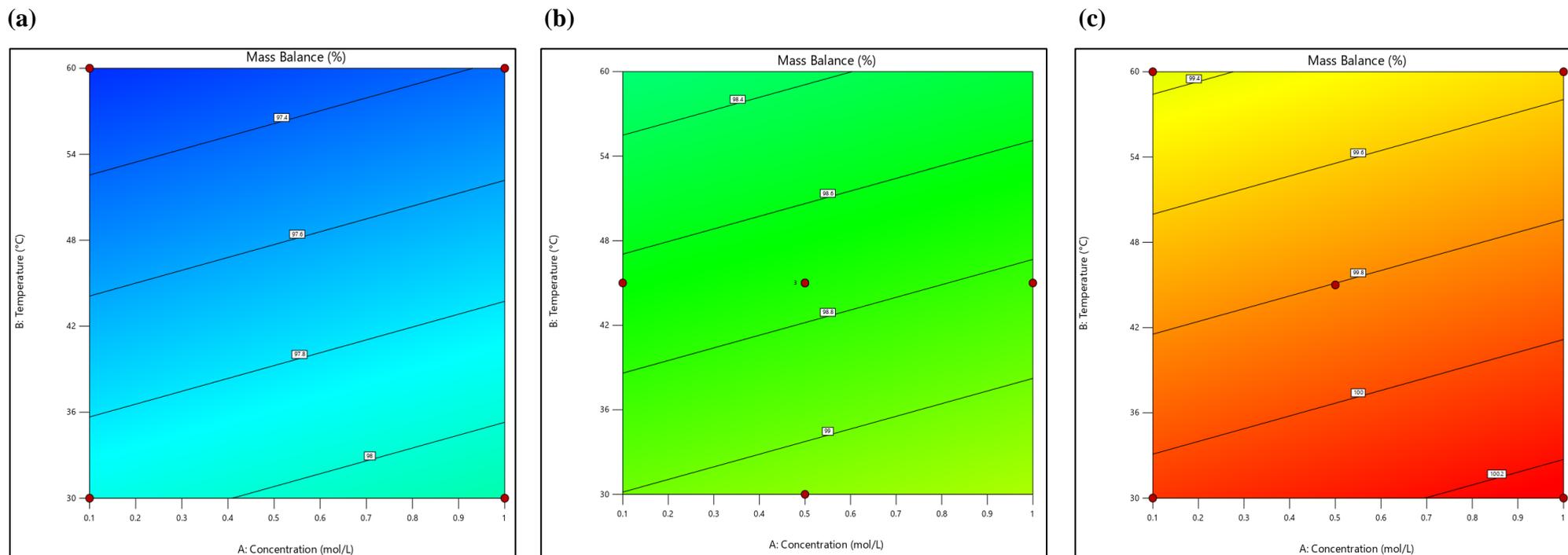


Figura 23: Análise gráfica da estatística para o termo do balanço de massas

Fonte: O Autor (2023)

Como o ajuste da superfície não foi o mais adequado, foi apresentado o *heat map* (* Mass Balance – Balanço de Massa; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura

Figura 24) do balanço de massas mostrando que no tempo de 24 h foi obtido as melhores respostas.



* Mass Balance – Balanço de Massa; Concentration – Concentração; Temperature - Temperatura

Figura 24: Heat map de resposta para balanço de massas em 6 h (a), 15 h (b) e 24 h (c)

Fonte: O Autor (2023)

Como os produtos de degradação obtidos estiveram de acordo com o previsto no tópico Avaliação da estrutura química de Apixabana para o Estudo de Degradação Forçada (EDF), pode ser considerado que o *design space* empregado foi suficiente para explicar todas as interações entre concentração, tempo e temperatura. Para fins de demonstração de seletividade do método analítico em etapas posteriores, seja em validação de matéria prima ou produto acabado, pode-se utilizar uma condição otimizada dentro dos parâmetros estudados. Para a otimização foi colocado como objetivo:

- Minimizar o teor (maximizando a queda);
- Maximizar a formação de impurezas;
- Colocar o mínimo aceitável de balanço de massas como 98% até o limite superior referente ao experimento 6.

Dessa forma, foi construído o *heat map* das 3 respostas junto do mapa de desejabilidade sendo 0 não atende aos critérios e 1 atende a todos sendo o resultado apresentado na Figura 25. Como foi possível verificar há um crescimento claro na desejabilidade com o aumento da concentração de HCl, na temperatura de 60°C no tempo de 24 h. Essa observação foi mais bem observada no gráfico em 3D da desejabilidade.

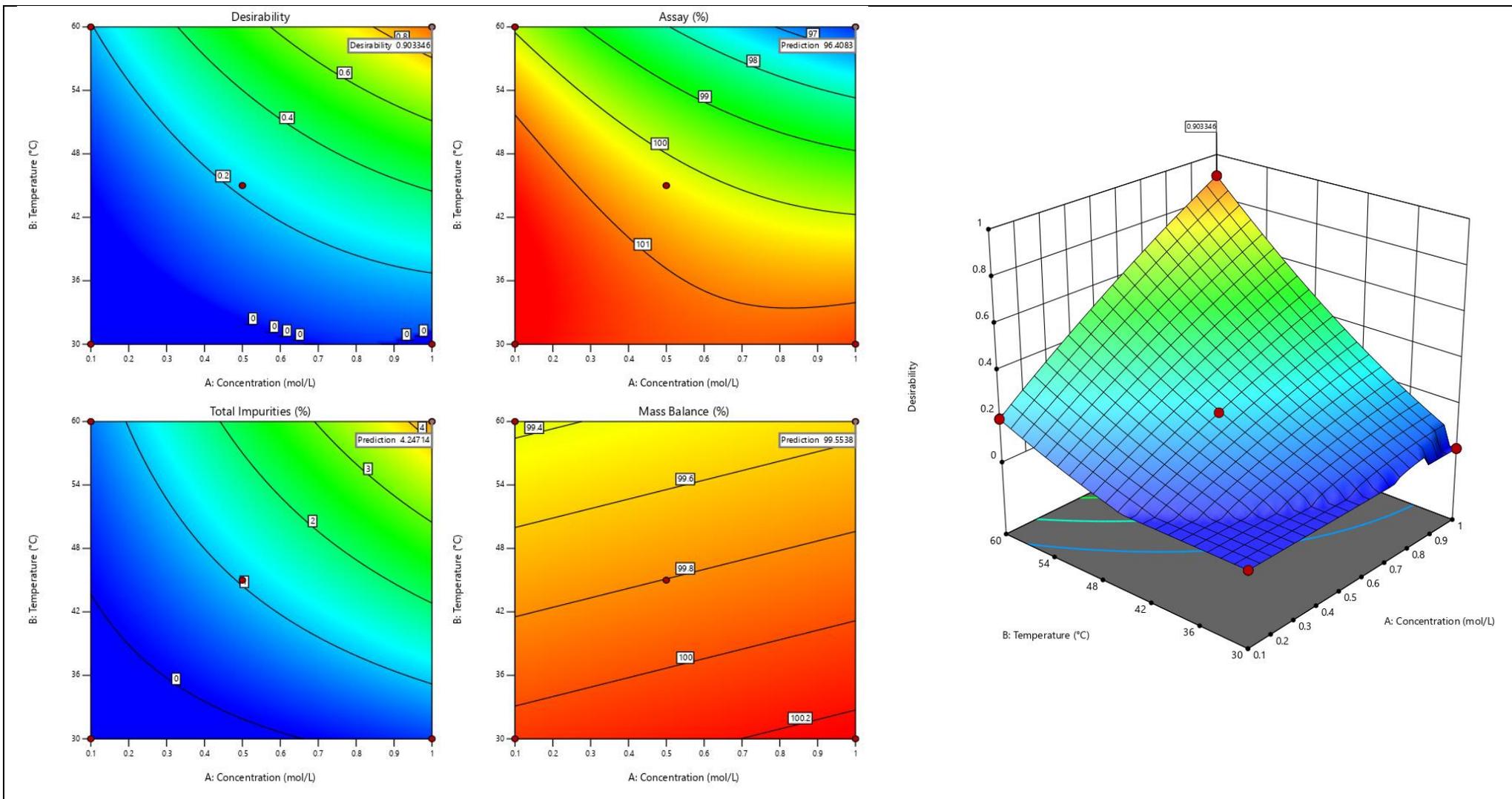
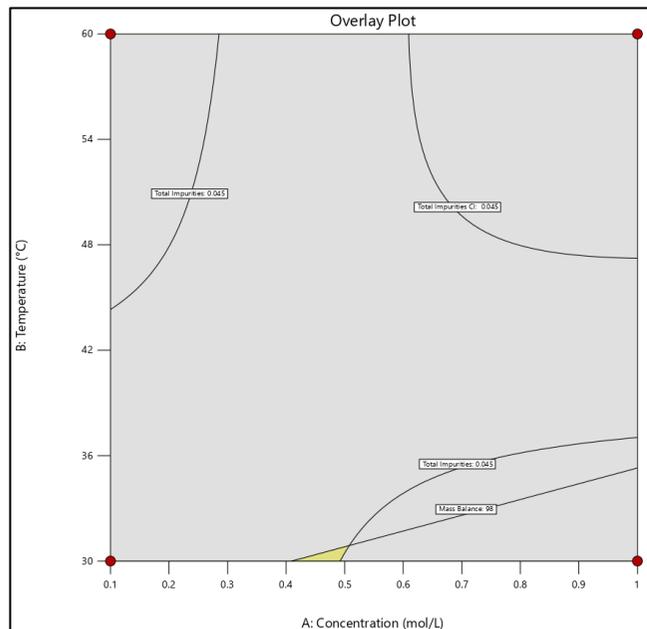


Figura 25: Heat map das melhores respostas frente ao heat map de desejabilidade no tempo de 24 h de estresse

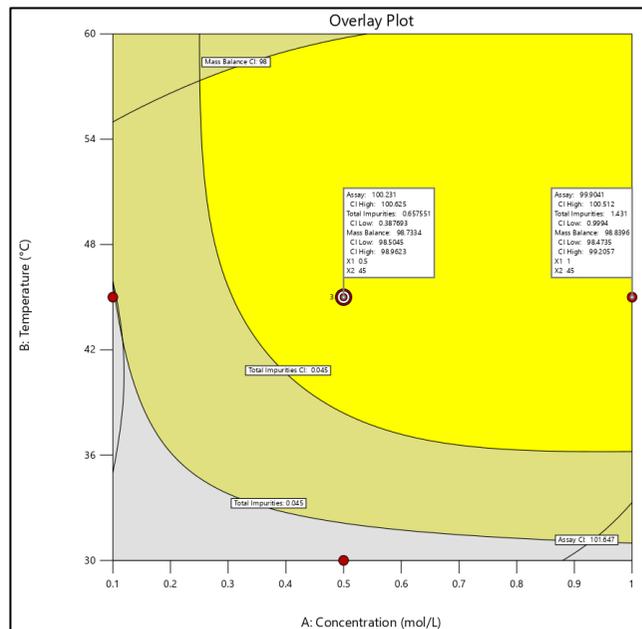
Fonte: O Autor (2023)

Adicionalmente a verificação de desejabilidade, foi verificado a otimização gráfica apresentada na Figura 26. Como foi possível observar, a região em cinza foi onde não houve atendimento dos critérios; na região em amarelo fosco compreende as incertezas das medições; e a do amarelo a região de *design space* robusto as condições informadas. Nessa região do conhecimento existem experimentos já realizados que atendem aos critérios numéricos de otimização: Teste 8, teste 9-11 (pontos centrais), teste 13 e teste 17. Pela avaliação estatística todos estes pontos já testados seriam opções de condições otimizadas para apresentação do perfil de degradação.

(A)



(B)



(C)

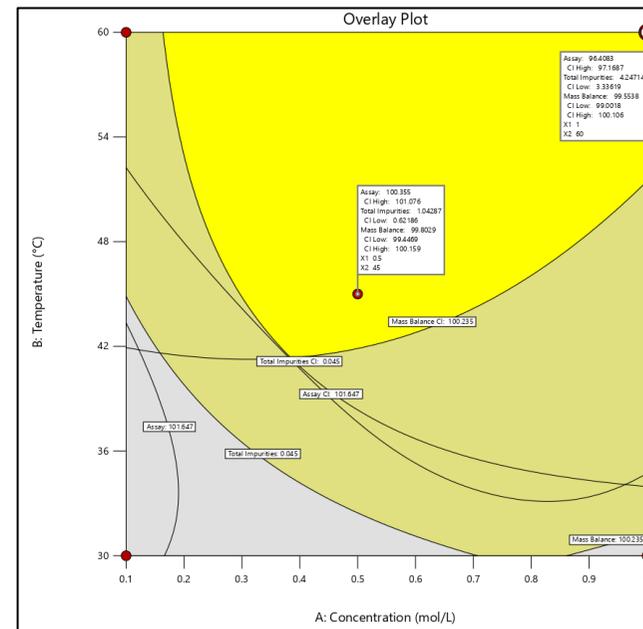


Figura 26: Otimização gráfica do *design space* para a degradação ácida em 6 h (a), 15 h (b) e 24 h (c). *Overlay Plot – Sobreposição Gráfica; Concentration – Concentração; Temperature – Temperatura.

Fonte: O Autor (2023)

Quando comparados a região sinalizada pela otimização matemática frente aos testes já realizados, foi verificado que em todos aparecem os marcadores principais da condição com o balanço de massas dentro do esperado. De acordo com as condições de desejabilidade, a melhor condição de degradação foi a do teste 8 onde foi encontrado a maior quantidade de impurezas, um decaimento de teor alinhado com a formação de impurezas e um valor de balanço de massa próximo de 100%.

Por fim, o método empregado mostrou-se seletivo de forma suficiente a suprir a necessidade de separação das impurezas no meio ácido.

5.3 INJEÇÃO DOS PADRÕES DAS IMPUREZAS RRT 0,40 E RRT 0,90

De acordo com os resultados de degradação forçada em meio ácido, principalmente no experimento 8, foi possível observar três principais produtos de degradação: RRT 0,33, RRT 0,40 e RRT 0,90. Os produtos de degradação apresentaram tempo de retenção relativo muito próximos da impureza C ou Apixabana Anel Aberto Amida (RRT 0,28), impureza B ou Apixabana Aminoácido (RRT 0,38) e impureza A ou Apixabana Ácido Carboxílico (RRT 0,85) do método utilizado do fornecedor Micro Labs.

Com o objetivo de confirmar a identidade dos principais produtos de degradação do experimento 8, foram realizadas as injeções dos padrões das impurezas C, B e A e da solução amostra impurezas submetida ao estresse ácido conforme condições do experimento 8 (Figura 27 a Figura 29), para comparação dos tempos de retenção.

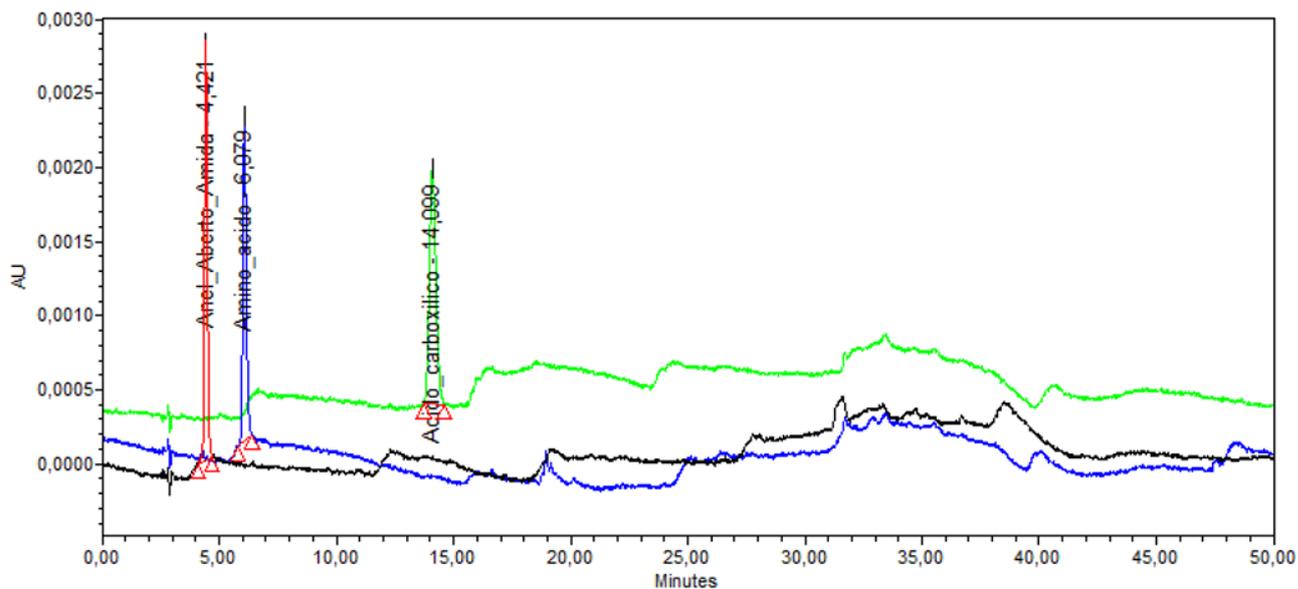


Figura 27: Sobreposição dos cromatogramas das impurezas específicas C (Apixabana Anel Aberto Amida), B (Apixabana Aminoácido) e A (Apixabana Ácido Carboxílico)

Fonte: O Autor (2024)

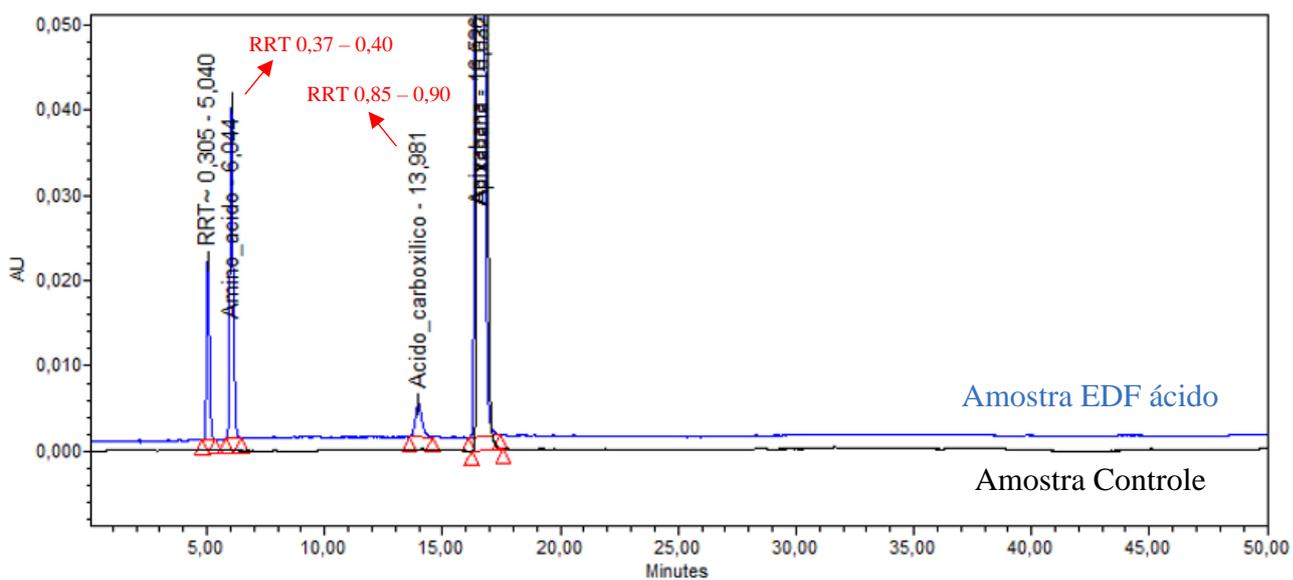


Figura 28: Sobreposição dos cromatogramas da solução amostra impurezas – controle e da solução amostra impurezas – EDF ácido (Experimento 8)

Fonte: O Autor (2024)

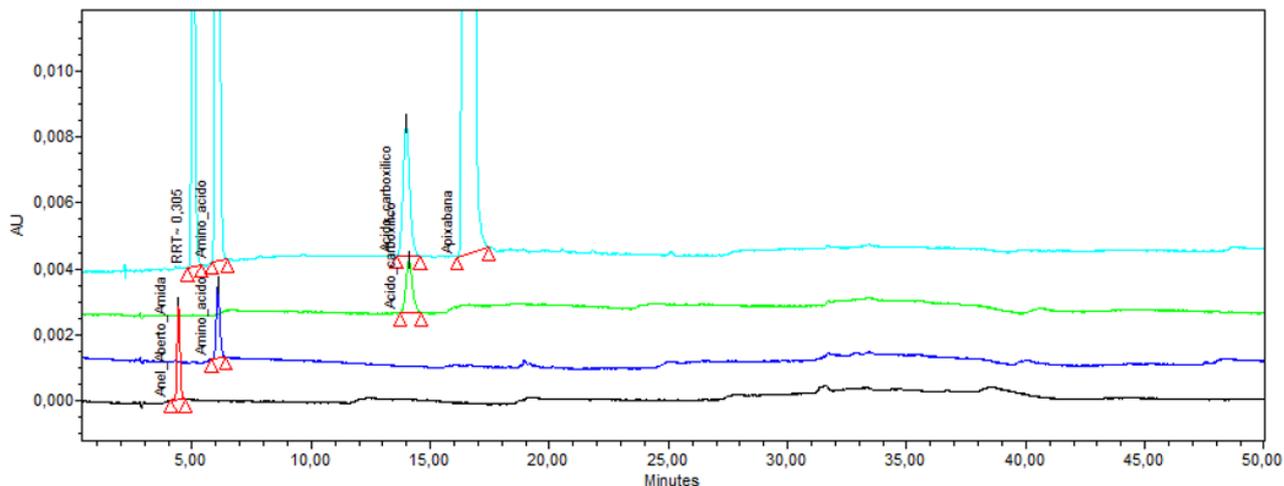


Figura 29: Sobreposição dos cromatogramas das Solução amostra impurezas – EDF ácido (Experimento 8) e das impurezas específicas

Fonte: O Autor (2024)

As Figura 27 a Figura 29 demonstraram que os produtos de degradação RRT 0,37 – 0,40 e RRT 0,85 – 0,90 apresentaram mesmo tempo de retenção das impurezas específicas B (Apixabana Aminoácido) e A (Apixabana Ácido Carboxílico), respectivamente.

De acordo com o estudo de Secrétan *et al.* (24) os produtos de degradação DP 2 e DP 4 formados em meio ácido, correspondem as impurezas específicas A (RRT 0,85) e B (RRT 0,38) do método analítico do fornecedor Micro Labs, respectivamente. Dessa forma, foi possível afirmar que o produto de degradação RRT 0,37 – 0,40 corresponde ao DP 4 e o produto de degradação RRT 0,85 – 0,90 corresponde ao DP 2.

A partir da Figura 29, for observado que o produto de degradação RRT 0,305 – 0,33 não apresentou o mesmo tempo de retenção da impureza específica C – RRT 0,28 (Apixabana Anel Aberto Amida). Essa informação contribuiu com a afirmação descrita anteriormente nos resultados parciais, onde o produto de degradação RRT 0,305 – 0,33 poderia ser um produto de degradação secundário, isto é, uma degradação dos produtos de degradação RRT 0,37 – 0,40 e RRT 0,85 – 0,90.

De acordo com a estrutura química da impureza C (Figura 30), pode-se afirmar que sua estrutura é muito parecida com a estrutura da impureza B. No entanto, a impureza C apresenta um grupo amida no lugar do grupo ácido carboxílico da impureza B, envolvendo um processo de amidação para que essa substituição ocorra. Todavia, a formação da impureza C em meio ácido, não foi apresentada no estudo de Secrétan *et al.* (24), dessa forma, foi possível afirmar que o produto de degradação RRT 0,305 – 0,33 não corresponde a impureza C.

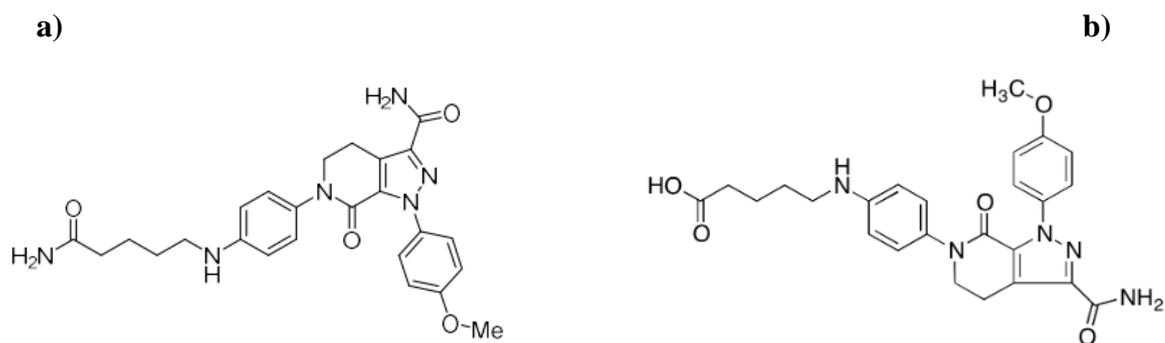


Figura 30: Estrutura química da impureza C (Apixabana Anel Aberto Amida) (a) e estrutura química da impureza B (Apixabana Aminoácido) (b)

Fonte: O Autor (2024)

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA IMPUREZA RRT 0,33 POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A fim de identificar a estrutura química produto de degradação RRT 0,305 – 0,33, realizou-se a caracterização dessa impureza por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês, Ultra-high Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Inicialmente foi realizado o estudo do perfil de fragmentação de apixabana, por meio de uma varredura de 0 – 1000 m/z para solução padrão de apixabana a 0,5 µg mL⁻¹. Os espectros obtidos foram utilizados para entender a estrutura molecular do composto e fornece informações sobre produtos de fragmentação. Com isso, foi possível observar que o principal pico, de m/z 460,1, representa o íon molecular da apixabana ([M⁺H]⁺), que corresponde à massa molecular do composto acrescida de um próton (característica da ionização positiva), conforme apresentado na Figura 31. Esse pico é crucial para a identificação do composto e serve como base para analisar sua fragmentação, pois sua intensidade relativa em relação a outros fragmentos indica que o íon molecular é o mais estável entre as espécies ionizadas detectadas.

Ainda sobre a Figura 31, diante da ampla presença de sinais de intensidades relativas, é possível analisar os picos de fragmentação, pois permite uma visão detalhada sobre a estrutura molecular e as regiões mais suscetíveis à fragmentação. Dentre os picos, destaca-se o m/z 149,1, pois pode estar relacionado a um grupo aromático ou uma subestrutura presente na molécula da apixabana, já os fragmentos menores como este correspondem na maioria das vezes a grupos funcionais ou anéis aromáticos clivados. Destaca-se também os picos m/z 279,2 e 282,4, que são intermediários e podem indicar subestruturas da apixabana que se formam por clivagem de ligações específicas, sugerindo que a apixabana possui regiões suscetíveis a esse tipo de fragmentação. Além

disso, a proximidade desses dos íons m/z 369,4 e 370,4 sugere fragmentos com massas muito semelhantes, o que pode indicar perda de grupos mais complexos como a cadeia lateral ou um grupo aromático substituído, já a observação de picos similares em uma diferença de 1 Da pode também ser devida à presença de isótopos naturais.

Além disso, um fragmento maior como o m/z 498,1 indica uma parte significativa da estrutura molecular, possivelmente uma variante do íon molecular com um ganho de massa, sugerindo uma possível adição ou interação com outro átomo ou molécula. Por outro lado, os picos m/z 625,3 e 957,1, mesmo que estejam com intensidades relativamente menores, podem estar relacionados a produtos de adução ou fragmentos complexos formados por interações intermoleculares, possivelmente observáveis devido a forças intermoleculares entre moléculas da apixabana ou formação de íon secundários.

Portanto, este espectro fornece uma visão detalhada da estrutura da apixabana e de suas possíveis fragmentações. Assim, o pico em m/z 460,1 confirma a identidade da molécula, enquanto os fragmentos secundários identificam regiões suscetíveis à quebra (anéis aromáticos e os grupos heterocíclicos são mais estáveis, já as ligações e os grupos laterais são suscetíveis à quebra sob condições de ionização). Quando se trata de estudo de degradação e estresse químico, estes perfis de fragmentos secundários apresenta-se como uma excelente estratégia instrumental para analisar a qualidade, estabilidade e identificação de impurezas.

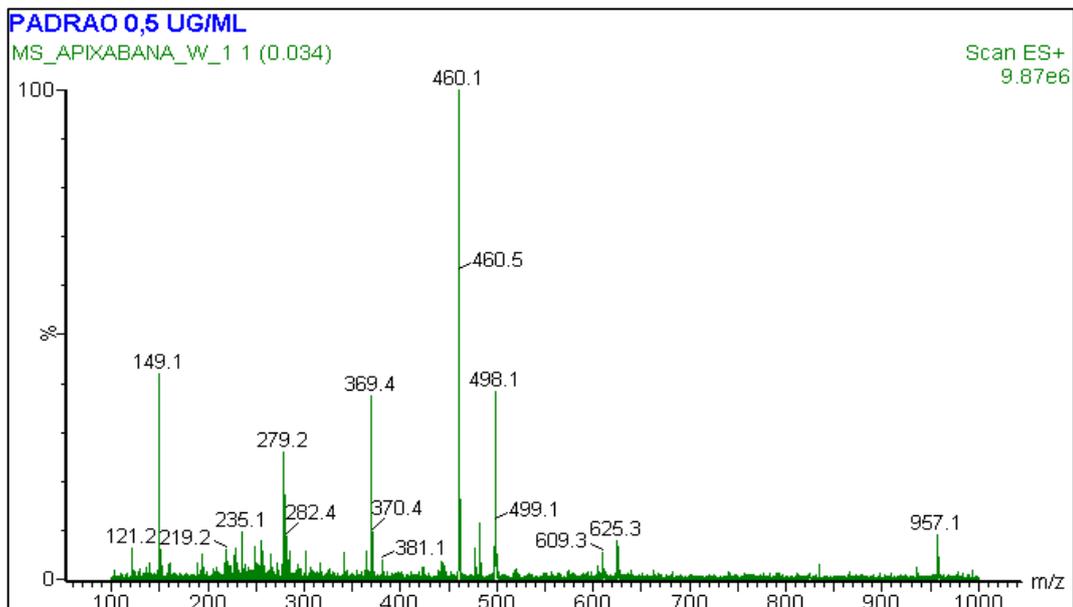


Figura 31: Espectro de varredura para a Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fonte: O Autor (2024)

A partir do espectro de varredura para a solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi realizada a análise de perfil de fragmentação. Para isso, foram selecionados uma m/z de 460,3 e uma tensão elétrica de 20 V. O resultado obtido foi a formação de um pico com m/z de 443,3, como pode ser visto na Figura 32. Este espectro revela informações importantes sobre a estabilidade estrutural e os possíveis mecanismos de fragmentação da apixabana. A aplicação de uma tensão de 20 V resultou em um fragmento predominante com m/z 443,3, indicando uma perda de aproximadamente 17 Da a partir do íon molecular. Essa perda é consistente com a eliminação de um grupo $-\text{NH}_2$ (17 Da), onde ocorre a eliminação do grupo funcional amina e a formação do íon *acylium*, conforme foi observado por Secrétan *et al.* (24). Esse grupo é estabilizado por ressonância e visto frequentemente como um fragmento estável pela técnica.

A obtenção de um fragmento único e significativo em m/z 443,3 com uma tensão relativamente baixa de 20 V indica que a estrutura da apixabana é, em grande parte, estável e que a fragmentação é controlada. Esse comportamento pode indicar que a molécula estudada possui uma estrutura rígida, pois a presença de um fragmento único, em vez de múltiplos picos de fragmentação, também aponta para uma resistência estrutural da molécula principal, o que indica sua vantagem em relação a aplicabilidade como fármaco.

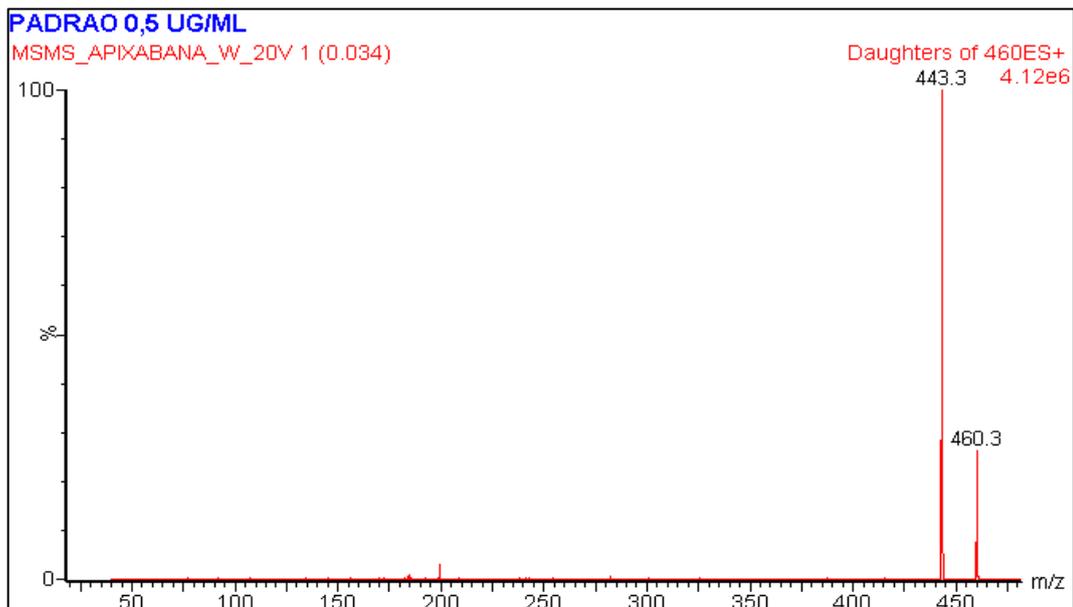


Figura 32: Espectro de fragmentação para a Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando m/z de 460 e uma tensão elétrica de 20 V.

Fonte: O Autor (2024)

Na Figura 33, observa-se o cromatograma de uma solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, cujo objetivo foi identificar o pico de apixabana por cromatografia. Verificou-se que o pico de apixabana apresentou tempo de retenção de 17,73 minutos. Esse tempo é característico da interação entre a estrutura química da apixabana e a fase estacionária da coluna sob as condições cromatográficas descritas no procedimento experimental. Dessa forma, o tempo de retenção em 17,73 minutos indica uma retenção moderada, sugerindo que a molécula possui uma certa afinidade pela fase estacionária, compatível com sua estrutura química relativamente apolar com grupos aromáticos e heterocíclicos, mas com polaridade suficiente para equilibrar a interação com a fase móvel.

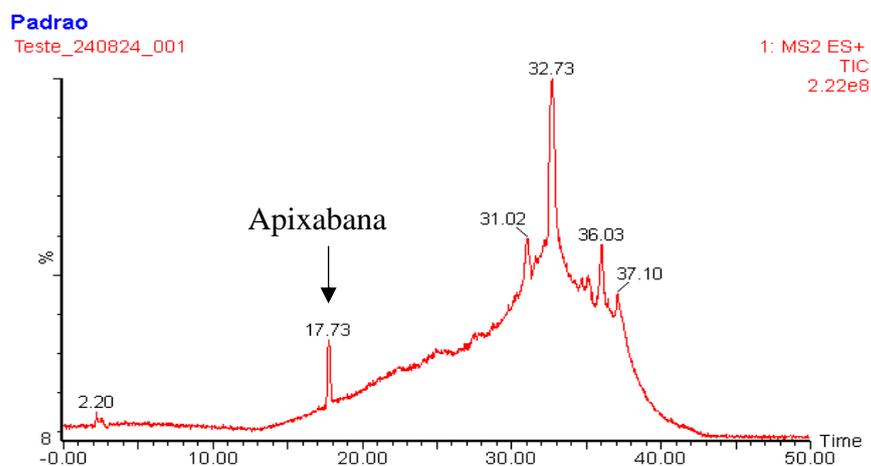
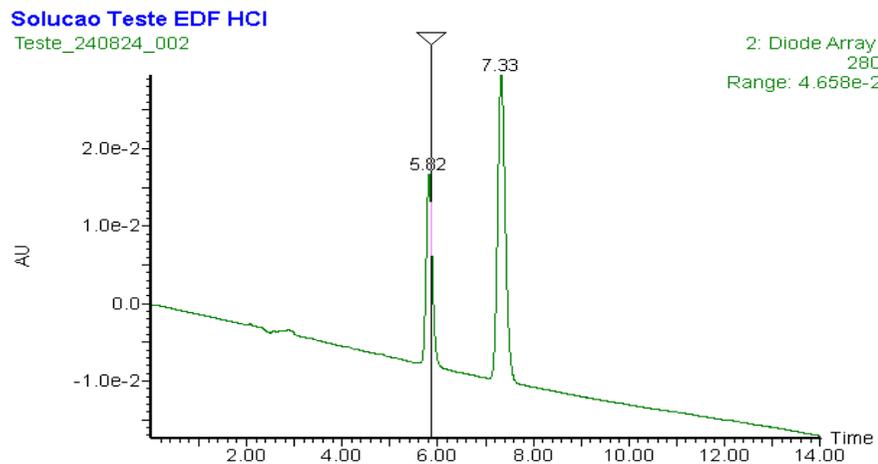


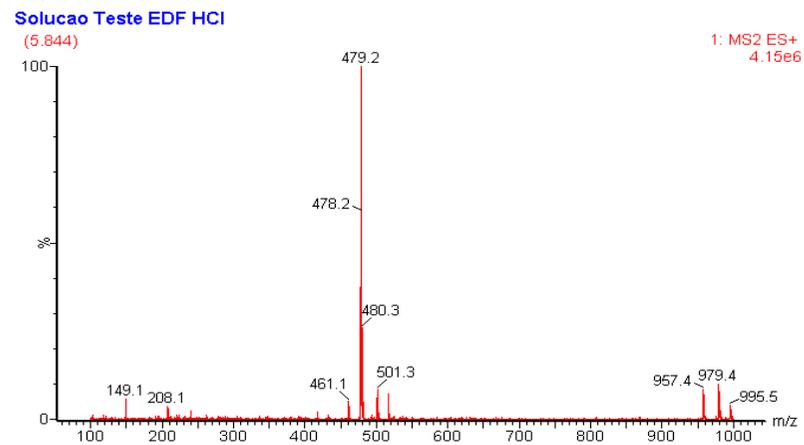
Figura 33: Cromatograma da Solução padrão de apixabana a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fonte: O Autor (2024)

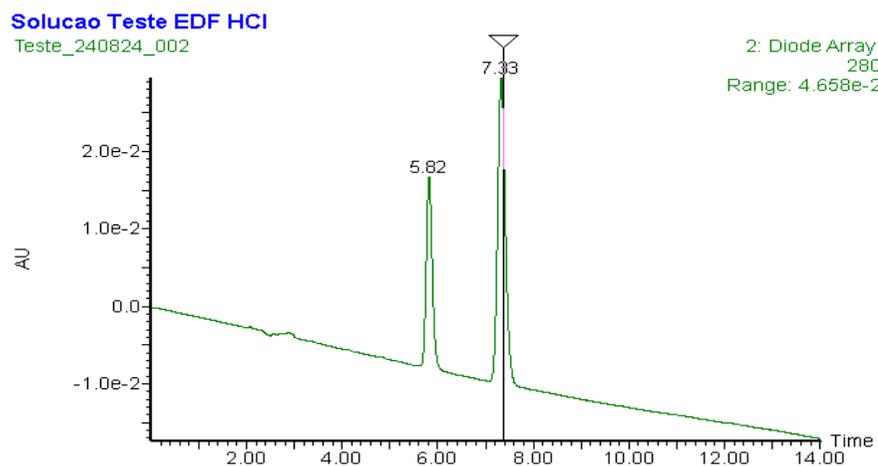
Em seguida, foi realizada a análise da amostra submetida ao estresse ácido, conforme as condições experimentais do experimento 8. Inicialmente, foi realizada a avaliação do espectro de varredura da solução degradada (Figura 34). É possível observar dois picos em tempos de retenção em aproximadamente 5,82 minutos e outro em 7,33 minutos. O primeiro pico pode ser um produto de degradação da apixabana gerado pela exposição ao ambiente ácido (um RRT 0,33 indica que uma impureza da apixabana elui aproximadamente em 5,85), já o segundo pico (7,33) apresenta um tempo de retenção relativo de 0,41 em relação ao pico da apixabana (Figura 32), confirmando que é um produto de degradação específico que corresponde ao PD - 4 (impureza B), como já era esperado para este TRR, devido esta impureza ser um marcador em condições ácidas, conforme foi relatada no trabalho de Secrétan *et al.* (24). O íon m/z 478,2 indica um aumento de 18 Da em relação à molécula de apixabana (m/z 460,1) que é consistente com a incorporação de uma molécula de água, uma modificação comum em ambientes ácidos que pode indicar uma hidratação ou formação de uma estrutura hidroxilada. Portanto, a apixabana não é considerada instável em condições normais, mas quando submetida em condições ácidas pode apresentar instabilidades.



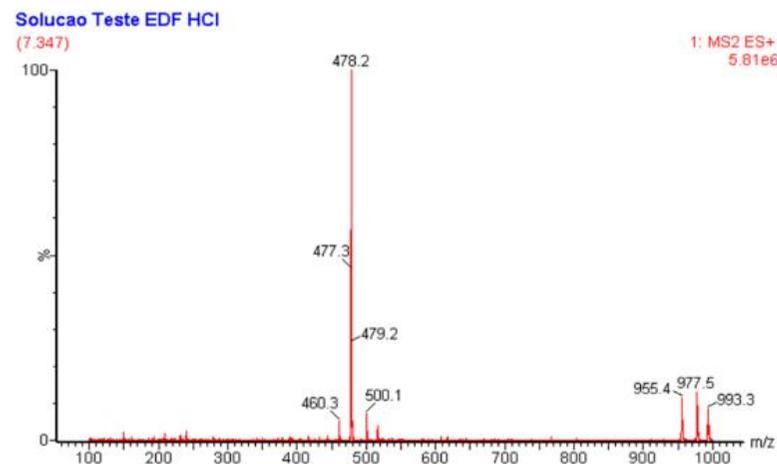
(a)



(c)



(b)



(d)

Figura 34: Identificação do pico da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (a), identificação do pico da impureza B com TR em 7,33 minutos (b), espectro de varredura da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (c) e espectro de varredura da impureza desconhecida com TR em 7,33 minutos (d)

Fonte: O Autor (2024)

A Figura 35 mostra cromatogramas e espectros de fragmentação para duas impurezas desconhecidas presentes em uma solução de teste de apixabana, sob condições de degradação com HCl. A primeira impureza, com o tempo de retenção relativo (RRT) 0,33 (5,82 minutos), apresenta um íon precursor em m/z 479, enquanto a segunda impureza, com RRT 0,42 (7,33 minutos), possui um íon precursor de m/z 478. Ambos os espectros foram obtidos no modo positivo com uma energia de 20V. Baseado no estudo realizado por Secrétan et al, é possível discutir possíveis interpretações observados nos espectros de fragmentação para cada impureza. Para a impureza com m/z 479 (5,82 min) tem-se que no espectro, o íon precursor de m/z 479 gera fragmentos com m/z 461, 417 e 392, entre outros. Dessa forma, a formação do íon em m/z 461 poderia estar associada à perda de H₂O ou NH₃, indicando uma possível modificação na estrutura inicial da apixabana, provavelmente devido a uma reação de hidrólise, conforme descrito na referência mencionada. Por outro lado, a presença de fragmentos como m/z 417 e 392 também sugere a fragmentação de ligações características da estrutura da apixabana. Na literatura, fragmentações similares são observadas em produtos de degradação sob condições ácidas, que tendem a afetar principalmente o grupo oxopiperidina. Portanto, esses dados são consistentes com a estabilidade da apixabana em meios ácidos, onde a degradação ocorre principalmente com a formação de produtos que envolvem a perda de grupos funcionais específicos e a modificação de anéis estruturais.

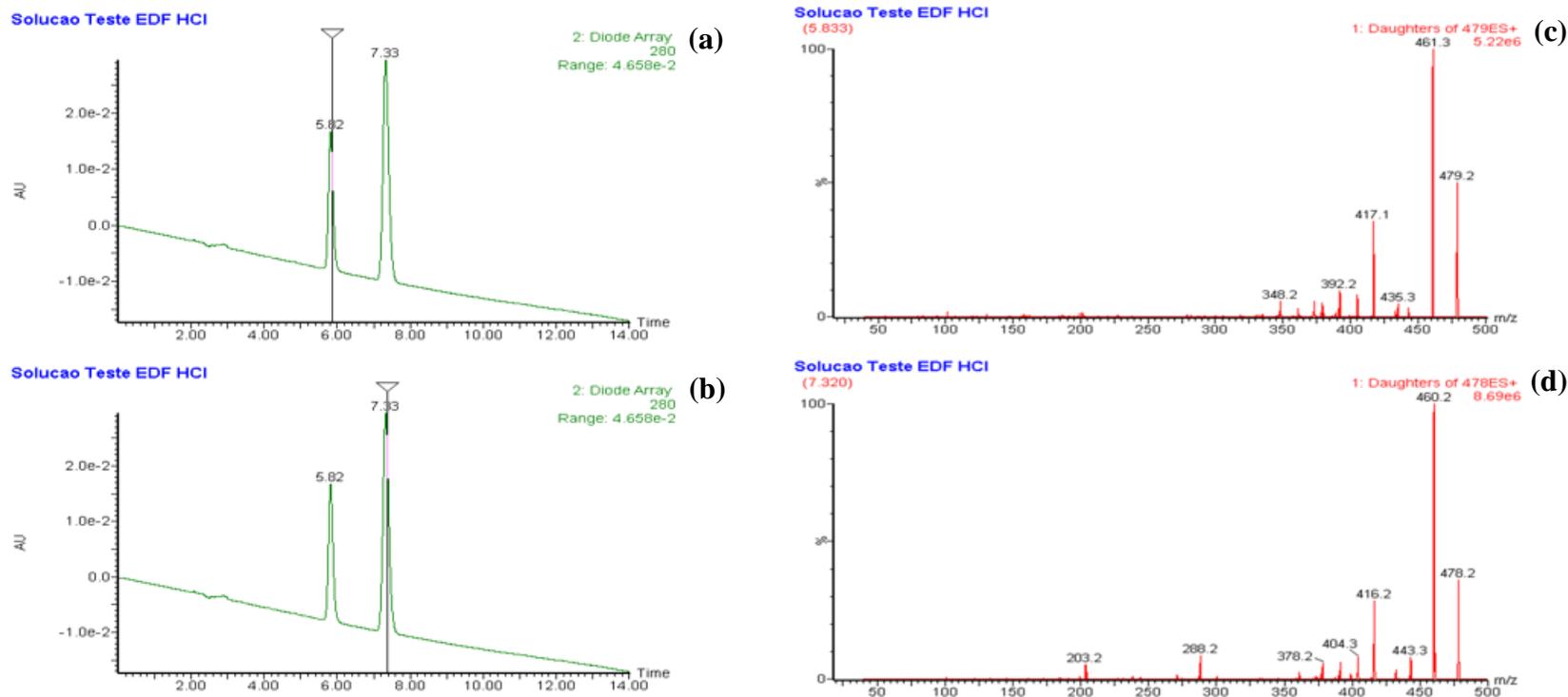


Figura 35: Identificação do pico da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (a), identificação do pico da impureza B com TR em 7,33 minutos (b), perfil de fragmentação em m/z 479 da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (c) e perfil de fragmentação em m/z 478 da impureza desconhecida com TR em 5,82 minutos (d)

A impureza B, identificada como DP-4, possui uma proposta detalhada de fragmentação, que ajuda a interpretar os íons presentes no espectro de massas associada ao m/z 478, registrado no espectro de fragmentação. conforme a proposta de fragmentação a baixo (Figura 36). Com base nessa proposta, é possível interpretar as m/z dos íons presentes no espectro de fragmentação. Com base na Figura 6 que destaca a rota de fragmentação do DP-4, pode-se interpretar alguns dos principais íons observados no espectro: m/z 461, 432, 416, 378, 333. O íon protonado $[M+H]^+$ em 460 corresponde a apixabana (1-(4-metoxifenil)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-il)fenil)-4,5-diidropirazo[5,4-c]piridina-3-carboxamida). A apixabana, sob condições ácidas, sofre hidrólise em uma das ligações amídicas, levando à formação do DP-4, cuja estrutura é 5-(4-(3-carbomoi-1-(4-metoxifenil)-7-oxo-4,5-diidro-1H-pirazol[3,4-c]piridina-6(7H)-il)fenilamino)pentanoato. Esse composto gera um íon precursor de m/z 478, que sofre uma série de fragmentações, resultando em produtos menores.

O íon 461 é formado pela perda de uma molécula de água ($H_2O = 18$ Da) a partir do íon precursor m/z 478, pois a eliminação de água é uma fragmentação comum em compostos com grupos amídicos ou carboxílicos, principalmente em condições de ionização positiva. Já o íon 432 é resultante da perda de monóxido de carbono (CO) que é típico em compostos que possuem grupos carbonílicos conjugados, resultando na eliminação do CO e na estabilização da estrutura, resultando em $C_{24}H_{26}N_5O_3^+$. Já o íon 416 foi gerado a partir do íon 432, envolvendo também a perda de um grupo monóxido, resultando em um fragmento mais leve e mais simples, $C_{23}H_{22}N_5O_3^+$. O íon 378 é formado diretamente a partir de DP-4 por um processo de N-dealquilação, onde uma das cadeias laterais contendo nitrogênio é removida, levando a redução significativa na massa molecular e indica uma perda de um grupo contendo nitrogênio, característico dos compostos com cadeias alifáticas ligadas a grupos aromáticos. Por último, um dos principais picos identificados foi o íon m/z 333 que é formado a partir de m/z 378 pela perda adicional de uma molécula de CO. Esse fragmento representa uma estrutura simplificada de DP-4, mantendo o núcleo aromático, mas com redução significativa de massa. Esse comportamento é comum em processos de fragmentação onde o sistema busca estabilização através da liberação de pequenas moléculas como as citadas. Portanto, a rota de fragmentação de DP-4 sob condições ácidas é denominada pela perda sequencial de água, monóxido de carbono e grupos contendo nitrogênio de N-alquilação, o que envolve rearranjos internos e transaminações que estabilizam os íons formados que podem contribuir para a formação de estruturas ressonantes e altamente estáveis, facilitando a clivagem de grupos funcionais e simplificam a estrutura à medida que a fragmentação progride.

Por meio dos resultados obtidos, a Impureza B (DP-4) é formada a partir da hidrólise da apixabana em meio ácido, indicando que o composto é suscetível à degradação por meio da quebra de ligações amídicas. Assim, em pH ácido, essas aminas podem hidrolisar, levando à formação de novas impurezas. A partir da estrutura da impureza B, considerando o processo de hidrólise, temos algumas possibilidades para as estruturas químicas das impurezas 1, 2 e 3 (Figura 37) com tempo de retenção em 5,82 minutos. A impureza 1, poderia resultar da clivagem da amida mais próxima do grupo piperidínico, gerando um composto com um grupo ácido carboxílico livre, mantendo parte do núcleo aromático e do anel heterocíclico. Já a impureza 2, provavelmente resulta de uma hidrólise adicional da segunda amida, formando um composto com dois grupos carboxílicos terminais. Com isso, a estrutura retém a configuração do núcleo da apixabana, mas com modificações significativas em suas cadeias laterais, aumentando sua polaridade e potencialmente seu tempo de retenção. Por fim, a impureza 3 provavelmente foi formada pela perda de uma das cadeias aromáticas ou metoxibenzila, mantendo um anel heterocíclico central. Essa estrutura é mais simplificada e possui menos grupos funcionais volumosos, o que pode alterar seu tempo de retenção. Portanto, essas possíveis estruturas sugerem uma sequência de hidrólise e rearranjos de ligações que ocorrem de maneira específica em pH ácido, contribuindo para a formação de impurezas detectadas, no qual essas sugestões corroboram com os estudos realizados anteriormente (Secrétan *et al*).

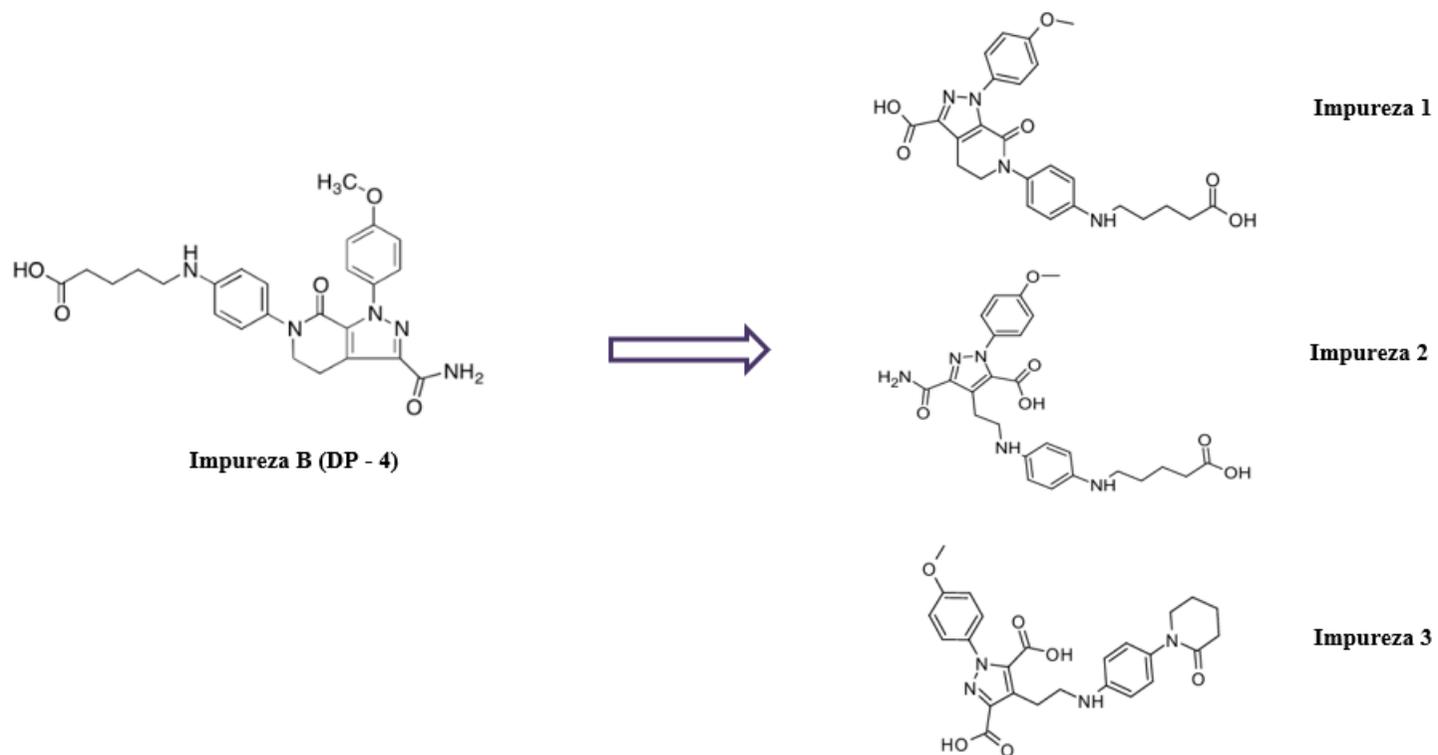


Figura 37: Proposta de estruturas químicas para a impureza desconhecida com TR em 5,82 (RRT 0,33) a partir da hidrólise da impureza B em meio ácido

Fonte: O Autor (2024)

Produto	Condições	[M+H] ⁺	Fórmula molecular	Produtos ionizados relevantes (m/z)
Apixabana	-	460	C ₂₅ H ₂₆ N ₅ O ₄ ⁺	443
Impureza B (7,33 min.)	EDF ácido	478	C ₂₅ H ₂₈ N ₅ O ₅ ⁺	460, 443, 416, 404, 378, 288 e 203
RRT 0,33 (5,82 min.)	EDF ácido	479	C ₂₅ H ₂₇ N ₄ O ₆ ⁺	461, 435, 417, 392 e 348

Tabela 15. Íons dos produtos de degradação de apixabana

De acordo com os resultados acima, o espectro de massas da apixabana revelou um íon m/z 460, o que é consistente com sua fórmula molecular. Por outro lado, o íon m/z 443 é observado como um produto de fragmentação, possivelmente relacionado a perda de NH₃. Assim, a impureza B, identificada com o tempo de retenção 7,33 minutos, apresenta um íon precursor em m/z 478, indicando um aumento de massa em relação à molécula original, o que sugere a adição de um grupo funcional, como uma hidroxila resultado de uma hidrólise. Enquanto os fragmentos observados m/z 460, 443, 416, 404, 378, 288 e 203 refletem um perfil de fragmentação compatível com um composto que mantém grande parte da estrutura da apixabana, mas com uma modificação na cadeia lateral.

Por outro lado, a impureza com RRT 0,33 apresenta um íon precursor em m/z 479, que corresponde a fórmula molecular C₂₅H₂₇N₄O₆⁺. Com isso, esse íon sugere uma modificação adicional em relação à impureza B, indicando a possibilidade de uma hidrólise mais avançada, onde ambas as amidas foram convertidas, no qual os íons de fragmentação com m/z 461, 435, 417, 392 e 348 também são consistentes com uma estrutura simplificada, com mais grupos funcionais polares. Dessa forma, a impureza com RRT 0,33 é atribuída à impureza 1 (Figura 37) devido à suscetibilidade dos grupamentos amidas que sofreram hidrólises em condições ácidas. A explicação de Secrétan *et al.* (24) corrobora com a identificação deste trabalho, pois menciona que o grupo amina de cadeia fechada (piperidina) é mais resistente em condições ácidas, enquanto as outras posições são mais suscetíveis à hidrólise, devido a necessidade de se ter um ataque nucleofílico mais efetivo devido ao impedimento estérico presente. Portanto, a impureza 1 provavelmente possui ambas as amidas hidrolisadas, resultando em dois grupos carboxílicos, o que explica o aumento da massa para m/z 479 e o tempo de retenção mais curto devido à maior polaridade.

6 - CONCLUSÃO

Como foi possível observar o ativo foi suscetível a degradação ácida, estando de acordo com os dados apresentados na literatura. Os produtos de degradação principais foram as impurezas A e B.

Por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês, Ultra-high Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry), propõem-se que o composto originalmente identificado como RRT 0,33 seja um produto secundário de interesse formado a partir da hidrólise ácida da impureza B. Também foi possível inferir, que a impureza desconhecida RRT 0,33 apresenta estrutura química conforme a proposta de estrutura para impureza 1 (Figura 37).

Para a condição ácida foi feito o tratamento estatístico dos dados obtidos sendo evidenciado toda região do conhecimento para a via. Os critérios de desejabilidade estabelecidos foram: aumentar a formação de impureza, minimizar o teor e garantir o fechamento adequado de balanço de massas sendo obtidas várias soluções que atendem ao critério. O teste 8 ($\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$, 60°C e 24 h) representa uma das soluções que melhor atende as condições impostas. Além disso, pode-se afirmar por meio do teste 8, que as condições mais extremas foram mais satisfatórias no estudo de degradação proposto fornecendo assim as condições mínimas para obter eficiência de degradação favorável (EDF).

Ressalta-se pela Avaliação da estrutura química de Apixabana para o Estudo de Degradação Forçada (EDF), foi previsto tal comportamento: ativo susceptível a degradação via hidrólise ácida nos grupamentos amidas. Desta forma os dados teóricos estiveram de acordo com as evidências experimentais adquiridas.

7 - REFERÊNCIAS

- [1] OLIVEIRA, E. A. d.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 11, 2006.
- [2] FUKUDA, I. M. et al. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, v. 54, p. 1-16, 2018.
- [3] BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. 2^a ed. Swarbrick J. (Ed.). Londres: Informa Healthcare, 2011. 612 p.
- [4] SAHU, P. K. et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Amsterdam, v. 147, p. 590-611, 2018.
- [5] WHO EXPERT COMM L-1^{OL}L-1^{ITTEE} ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. WHO Technical Report Series, No. 953, Annex 2. 2015. Disponível em:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44553/WHO_TRS_953_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y#page=101&zoom=auto,-480,691. Acesso em: 20 ago. 2023.
- [6] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. 2019. Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0318_06_11_2019.pdf. Acesso em: 15 ago. 2023.
- [7] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). 2003. Disponível em:
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf>. Acesso em: 10 maio 2023.
- [8] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia 4 para Obtenção do Perfil de Degradação, e Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos. 2015. Disponível em:
<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.0>. Acesso em: 10 maio 2023.
- [9] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 53. 2015. Disponível em:
https://bvs.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2015/2015/rdc0053_04_12_2015.pdf. Acesso em: 10 maio 2023.
- [10] MACFAUL, P. A.; RUSTON, L.; WOOD, M. Activation Energies for the Decomposition of Pharmaceuticals and their Application to Predicting Hydrolytic Stability in Drug Discovery. MedChemCommol L-1^{OL}L-1^{ITTEE}, v. 2, p. 140-2, 2010.
- [11] CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists. 2^a ed. Sons JWe (Ed.). Madison: Wiley-Interscience, 1986. 864 p.

- [12] KENNON, L. Use of Models in Determining Chemical Pharmaceutical Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, p. 815-8, 1964.
- [13] THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). *Pharmaceutical Stability*. 2012. Disponível em: http://uspbbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1150.html#:~:text=1150%20PHARMACEUTICAL%20STABILITY%20The%20term%20%E2%80%9Cstability%2C%E2%80%9D%20with%20respect,dosage%20unit%20to%20maintain%20protection%20against%20microbiological%20contamination. Acesso em: 15 maio 2023.
- [14] YANG, W-h.; ROY, S. B. Projection Of Tentative Expiry Date From One-Point Accelerated Stability Testing. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 6, p. 591-604, 1980.
- [15] WATERMAN, K. C. et al. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. *Pharm Dev Technol*, v. 7, n. 2, p. 113-46, 2002.
- [16] LI, M. *Organic Chemistry of Drug Degradation*. 1^a ed. Thurston D. (Ed.). UK: The Royal Society of Chemistry, 2012. 306 p.
- [17] BOCARDI, G.; HARMON, P. Oxidative Susceptibility Testing. In: BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. (Eds.). *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. Pharmaceutical Process Scale-Up, Sterile Drug Products: Formulations, Packaging, Manufacturing and Quality. Advanced Aseptic Processing Technology, Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical & Biological Products, Active Pharmaceutical Ingredients: Development, Manufacturing, and Regulation, Generic Drug Product Development: Specialty Dosage Forms, Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications*. 210. 2^a ed. ed. Londres: Informa Healthcare; 2011. p. 168-91.
- [18] ALSANTE, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 59, n. 1, p. 29-37, 2007.
- [19] KIM, S. et al. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D1373-D80, 2022.
- [20] WYETH INDÚSTRIA FARMACÊUTICO LTDA. Eliquis® - Apixabana. 2021. Disponível em: <https://www.prescrita.com.br/wp-content/uploads/2022/06/Bula-Eliquis.pdf>.
- [21] CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry*. OUP Oxford, 2012.
- [22] AL-ANI, I. et al. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STABILITY INDICATING RP-HPLC METHOD OF APIXABAN IN COMMOL L-1^{OL} L-1^{ERCIAL} DOSAGE FORM. *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH*, v. 12, n. 1, p. 241-51, 2021.
- [23] LANDGE, S. B. et al. Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method on Core Shell Column for Determination of Degradation and Process Related Impurities of Apixaban—An Anticoagulant Drug. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 06, p. 539-50, 2015.
- [24] SECRÉTAN, P.-H. et al. A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. *RSC Advances*, v. 5, n. 45, p. 35586-97, 2015.

- [25] ASHENHURST, J. Amide Hydrolysis. Nashville: Master Organic Chemistry, 2022. Disponível em: <https://www.masterorganicchemistry.com/2019/10/07/amide-hydrolysis/>.
- [26] ASHENHURST, J. Cleavage Of Ethers With Acid. Nashville: Master Organic Chemistry, 2023. Disponível em: <https://www.masterorganicchemistry.com/2014/11/19/ether-cleavage/>.
- [27] PRABHUNE, S. S. et al. Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Apixaban in the Presence of Degradation Products. *Sci Pharm*, v. 82, n. 4, p. 777-85, 2014.
- [28] DAMLE, M.; WAGHMARE, S.; SINHA, P. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING HPTLC METHOD FOR DETERMINATION OF APIXABAN AS BULK DRUG. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, p. 37-42, 2019.
- [29] JAIN, H.; NIKAM, V. FORMULATION DEVELOPMENT AND STABILITY INDICATING HPLC ASSAY OF TABLETS OF APIXABAN. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 24, 2017.
- [30] SIDIQUE, S. et al. Structure-activity relationship and improved hydrolytic stability of pyrazole derivatives that are allosteric inhibitors of West Nile Virus NS2B-NS3 proteinase. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 19, n. 19, p. 5773-7, 2009.
- [31] ELGUERO, J. Pyrazoles and their Benzo Derivatives. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, v. 5, p. 167-303, 1984.
- [32] AL-GHAMDI, K. A. Improving the Practice of Experimental Design in Manufacturing Engineering. Birmingham: University of Birmingham, 2011.
- [33] FISHER, R. A. The Design of Experiments. 9^a ed. Califórnia: Hafner Publishing Company, 1971. 256 p.
- [34] MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. 9^a ed. Arizona: John Wiley & Sons, 2017. 749 p.
- [35] CANDIOTI, L. V. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, v. 124, p. 123-38, 2014.
- [36] OLIVEIRA, L. G. et al. Response surface methodology for advanced manufacturing technology optimization: theoretical fundamentals, practical guidelines, and survey literature review. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, v. 104, n. 5, p. 1785-837, 2019.
- [37] BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. In: KOTZ, S.; JOHNSON, N. L. (Eds.). *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution*. New York, NY: Springer New York, 1992. p. 270-310.
- [38] YOLMEH, M.; JAFARI, S. M. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food and Bioprocess Technology*, v. 10, n. 3, p. 413-33, 2017.
- [39] BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 78, n. 3, p. 836-45, 2007.

[40] GHORBANNEZHAD, P. et al. Optimization of coagulation–flocculation process for medium density fiberboard (MDF) wastewater through response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*, v. 57, p. 26916-31, 2016.

[41] FULLER, D. N.; SCHERER, W. T. "The desirability function: underlying assumptions and application implications". *SMC'98 Conference Proceedings 1998 IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics (Cat No98CH36218)*, v. 4, p. 4016-21, 1998.

[42] MIRANDA DE SOUZA, A. et al. Application of the desirability function for the development of new composite eco-efficiency indicators for concrete. *Journal of building engineering*, v. 40, p. 102374, 2021.

[43] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. *Pharmaceutical Development Q8(R2)*. 2009. Disponível em:
<https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29%20Guideline.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2023.