



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Maryane Maria Barros de Farias Ferreira

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA FÁRMACOS DE BAIXA
SOLUBILIDADE: O CASO DA CLOFAZIMINA**

Recife
2024

Maryane Maria Barros de Farias Ferreira

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA FÁRMACOS DE BAIXA
SOLUBILIDADE: O CASO DA CLOFAZIMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia.

Orientadora:

Prof. Dra. Monica Felts de La Roca Soares

Coorientador:

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Ferreira, Maryane Maria Barros de Farias.

Estudo de degradação forçada para fármacos de baixa solubilidade: o caso da clofazimina / Maryane Maria Barros de Farias Ferreira. - Recife, 2024.

100 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Monica Felts de La Roca Soares.

Coorientação: José Lamartine Soares Sobrinho.

Inclui referências e apêndice.

1. Estudo de estabilidade; 2. Produtos de degradação; 3. Clofazimina; 4. CLAE-DAD. I. Soares, Monica Felts de La Roca. II. Soares Sobrinho, José Lamartine. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

Maryane Maria Barros de Farias Ferreira

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA FÁRMACO DE BAIXA
SOLUBILIDADE: O CASO DA CLOFAZIMINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em:

Documento assinado digitalmente
 **MONICA FELTS DE LA ROCA SOARES**
Data: 28/11/2024 22:33:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Monica Felts de La Roca Soares

Documento assinado digitalmente
 **LUISE LOPES CHAVES**
Data: 29/11/2024 12:26:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luise Lopes Chaves

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS JOSE DE ALENCAR DANDA**
Data: 29/11/2024 12:31:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas José de Alencar Danda

Recife

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por absolutamente tudo. Por Ele ter me conduzido até este momento e por me ajudar a amadurecer pessoalmente e profissionalmente no decorrer dessa jornada.

Ao meu amado marido Saulo, sem o qual este sonho não seria possível, por todo apoio, acolhimento, conversas, dias felizes em meio as dificuldades e pelo amor. A jornada ficou mais leve ao lado do meu melhor amigo.

À minha querida mãe, ao meu amado pai, a minha irmã e toda a minha família que sempre me impulsionaram para seguir meus sonhos e sempre acreditaram em mim, até mesmo quando eu não acreditei.

Aos meus padrinhos Maria do Carmo e Ednaldo (*in memoriam*) vocês são parte de todas as minhas conquistas. À vocês a minha eterna gratidão.

Aos professores José Lamartine e Mônica Felts por me proporcionarem a oportunidade de trabalhar com o que amo e por todo o apoio e confiança.

À minha querida Júlia que atravessou o oceano para entrar de cabeça comigo neste trabalho e viver todas as dificuldades e alegrias, se tornando uma amiga para a vida inteira. Este trabalho não aconteceria sem você.

As pessoas incríveis que tive o prazer em conhecer e dividir essa jornada desafiadora, especialmente Lívia

À Lucas Danda por me receber e com toda sua paciência e apoio de sempre me apresentar ao fantástico mundo da cromatografia.

À toda equipe do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) por toda parceria e troca que tive nos últimos anos.

À Magda, Ewelyn e toda a equipe do NUDATEF, por toda água, materiais, discussões e momentos de muitas risadas que deixaram os dias mais leves.

As minhas queridas Regina e Vitória que foram meu braço direito e fazem parte desta conquista.

Ao PPGCF, especialmente ao secretário Rilvan.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

À UFPE e ao contribuinte brasileiro que financia toda essa estrutura.

Deus é bom o tempo todo.

RESUMO

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA PARA FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE: O CASO DA CLOFAZIMINA

Para o sucesso de um tratamento farmacológico, o medicamento deve ser eficaz e seguro. A estabilidade é essencial para manter essas características, evitando a perda do efeito terapêutico e a exposição a produtos tóxicos de degradação. As agências reguladoras no mundo preconizam através de diretrizes o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade (MIE) que seja seletivo para o fármaco e permita a quantificação e identificação dos produtos de degradação. Este método é desenvolvido através de estudos de degradação forçada, nos quais o fármaco é submetido a condições de estresse. A Clofazimina (CLZ), usado no tratamento da hanseníase, uma doença negligenciada e endêmica na América Latina, é um fármaco com baixa solubilidade, o que representa um grande desafio para o desenvolvimento estudos de degradação, que atestem sua qualidade. Nesse contexto, o trabalho objetivou, com auxílio de plataformas de predição *in silico* e ferramentas quimiométricas, obter a melhor condição de degradação para um fármaco lipofílico. Para tanto, a metodologia foi composta de três partes i. análise preditiva de degradação, na qual se encaixa a etapa de predição *in silico* dos produtos de degradação (PDs) e rotas de degradação; ii. desenvolvimento de um desenho experimental para estabelecer a melhor condição de degradação para o fármaco; iii. estudo de degradação propriamente dito, ensaios de degradação forçada em solução, além da iv. quantificação dos PDs por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD). Um MIE foi desenvolvido e validado utilizando CLAE-DAD, em coluna C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm). Além disso, a análise do PCA pode determinar qual a melhor condição para a formação de PDs em um nível de solubilidade ideal para o fármaco de modo que houvesse consistência no balanço de massas feitos para atestar as degradações. O fármaco foi submetido à degradação alcalina, ácida e oxidativa e apresentou a formação de 3 PDs no total, podendo ser atestado pela validação do método. Assim, o MIE desenvolvido poderá ser utilizado nos estudos de estabilidade e de aperfeiçoamento farmacotécnico para fármacos com baixa solubilidade, garantindo a qualidade do medicamento distribuído.

Palavras-chave: Produtos de Degradação; Estudo de Estabilidade; Clofazimina; CLAE-DAD; Planejamento Experimental.

ABSTRACT

FORCED DEGRADATION STUDY FOR POORLY SOLUBILITY DRUGS: THE CASE OF CLOFAZIMINE

To achieve success in pharmacological treatment, a drug must be effective and safe. Stability is essential to maintain these characteristics, preventing the loss of therapeutic effect and exposure to toxic degradation products. Regulatory agencies worldwide advocate the development of stability-indicating methods (SIM) that are selective for the drug and allow the quantification and identification of degradation products (DP). These methods are developed through forced degradation studies, where the drug is subjected to stress conditions. The Clofazimine (CLZ), used in the treatment of leprosy, a neglected and endemic disease in Latin America, is a drug with poorly solubility, which presents a significant challenge for degradation studies development. In this context, the focus of this work is obtaining the best degradation condition for lipophilic drug with the help of *in silico* prediction platforms and chemometric tools. The methodology comprises three parts: i. predictive degradation analysis, which includes the *in silico* prediction of degradation products (DPs) and degradation pathways; ii. development of an experimental design to establish the best degradation condition for the drug; iii. degradation study properly, forced degradation assays in solution, and iv. quantification of DPs by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD). An SIM was developed and validated using HPLC-DAD, with a C8 column 250x4.6 mm, 5 μ m. Furthermore, the principal component analysis (PCA) could determine the best condition for DP formation at an ideal solubility level for the drug, ensuring consistency in the mass balance conducted to confirm the degradations. The drug was subjected to alkaline, acidic, and oxidative degradation, resulting in the formation of a total of 3 DPs, as confirmed by method validation. Thus, the developed SIM can be used in stability and pharmaceutical improvement studies for poorly solubility drugs, ensuring the quality of the medication.

Keywords: Degradation Products; Stability Study; Clofazimine; HPLC-DAD; Experimental Design.

LISTA DE SIGLAS

ACN - Acetonitrila
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATD - Administração Total Diária
BM - Balaço de Massas
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLZ - Clofazimina
DAD - Arranjo de diodos
DPR - Desvio Padrão Relativo
EM - Espectrometria de Massas
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
HCl - Ácido Clorídrico
ICH - Internacional Conference on Harmonization
IFA - Insumo Farmacêutico Ativo
LoD - Limite de Detecção
LoQ - Limite de Quantificação
Log P - Logaritmo do coeficiente de partição
MeOH - Metanol
MIE - Método Indicativo de Estabilidade
NaOH - Hidróxido de sódio
PD - Produto de Degradação
PDs -Produtos de Degradação
PE - Planejamento Experimental
pK_a - Logaritmo da constante de dissociação
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada
UV – Ultravioleta

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Zonas climáticas ICH e condições de estabilidade a longo prazo.	17
Quadro 2 – Limites de qualificação para produtos de degradação em medicamentos.	19
Quadro 3 – Limites de identificação para produtos de degradação em medicamentos.	20
Quadro 4 – Limites de notificação para produtos de degradação em medicamentos.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de reagentes utilizados ao longo do trabalho.	31
Tabela 2 – Níveis reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 3 ²	33
Tabela 3 – Matriz da porção fatorial do planejamento fatorial completo 3 ²	33
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas para eluição gradiente.	45
Tabela 5 – Combinações da FM para determinação do diluente.	46
Tabela 6 – Combinações da FM para determinação do diluente.	49
Tabela 7 – Parâmetros cromatográficos da amostra de degradação em meio básico.	63
Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos da amostra de degradação em meio oxidativo.	69
Tabela 9 – Resultado do Planejamento Experimental NaOH.	70
Tabela 10 – Resultado Planejamento Experimental H ₂ O ₂	70
Tabela 11 – Balanço de massa da condição básica.	72
Tabela 12 – Balanço de massa da condição oxidativa.	73
Tabela 13 – Parâmetros de System Suitability.	74
Tabela 14 – Parâmetros de seletividade avaliados.	74
Tabela 15 – Dados da validação.	77
Tabela 16 – Parâmetros de robustez avaliados.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da clofazimina.....	25
Figura 2 – Perfil de protonação de CLZ sob variação de pH de acordo com seu pK	27
Figura 3 – D1 gerado a partir da degradação preditiva básica via software.....	39
Figura 4 – D2 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.	40
Figura 5 – D3 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.	41
Figura 6 – D4 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.	41
Figura 11 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.....	54
Figura 12 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.....	54
Figura 13 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.....	55
Figura 14 – Superfície de resposta para solubilidade da CLZ no planejamento experimental em meio ácido.	56
Figura 15 – Cromatograma referente a degradação em meio ácido após 24h.	56
Figura 16 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.....	58
Figura 17 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.....	59
Figura 18 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.....	59
Figura 19 – Superfície de resposta para solubilidade da CLZ no PE em meio básico.	60
Figura 20 – Superfície de resposta para quantidade de PD formado no PE em meio básico.....	61
Figura 21 – Cromatograma referente a degradação em meio básico após 24h.....	62
Figura 22 – Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.....	63

Figura 23 – Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.....	64
Figura 24 - Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.....	64
Figura 25 – Superfície de resposta para quantidade de PD formado no PE em meio básico.....	65
Figura 26 – Cromatograma referente a degradação em meio oxidativo após 24h...	67
Figura 27 – Cromatograma referente a amostra branco da degradação em meio oxidativo.....	67
Figura 28 – Gráfico da regressão linear.....	75
Figura 29 – Gráfico plotagem de resíduos.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE	16
3.2 DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	18
3.2.1 Condução do estudo de degradação forçada.....	20
3.2.2 Testes de degradação forçada	21
3.3 ANÁLISE IN SILICO	23
3.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	23
3.5 BALANÇO DE MASSAS	24
3.6 CLOFAZIMINA.....	25
3.6.1 Ionização.....	27
3.6.2 Clofazimina e hanseníase	28
3.7 Planejamento experimental	29
3.7.1 Ferramentas Quimiométricas	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 INSUMOS	31
4.2 REAGENTES	31
4.3 INSTRUMENTAÇÃO	31
4.4 PREDIÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO IN SILICO	32
4.5 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MÉTODO DE INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE) POR CLAE.....	32
4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR: DEGRADAÇÃO EM SOLUÇÃO..	32
4.6.1 Planejamento Experimental	32
4.6.2 Preparo da Solução de Referência.....	34
4.6.3 Preparo das Soluções de Degradação: Ácida, Básica e Oxidativa.....	34
4.6.4 Preparo das Amostras Degradantes Ácida, Básica e Oxidativa	34
4.6.5 Soluções de Análise	35
4.7 BALANÇO DE MASSAS	35

4.8 VALIDAÇÃO	35
4.8.1 Seletividade	36
4.8.2 Linearidade.....	36
4.8.3 Precisão	36
4.8.4 Exatidão	37
4.8.5 Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ).....	37
4.8.6 Robustez.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 PREDIÇÃO IN SILICO.....	38
5.4.1 Rotas de degradação.....	38
5.2 DESENVOLVIMENTO do método indicativo de estabilidade (MIE)	42
5.2.1 Degradação preditiva oxidativa.....	42
5.2.2 Desenvolvimento do MIE	42
5.2.3 Escolha do diluente	46
5.3 ESTUDOS DE Degradação forçada	51
5.3.1 Utilização de cossolvente	51
5.3.2 Solubilidade e Degradação Forçada	52
5.3.3 Degradação em meio ácido	53
5.3.4 Degradação em meio básico	58
5.3.5 Degradação em meio oxidativo	63
5.3.6 Escolha da melhor amostra degradante.....	69
5.4 BALANÇO DE MASSAS	72
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	73
5.3.1 Seletividade	74
5.3.2 Linearidade.....	74
5.3.3 Precisão e Exatidão	76
5.3.4 Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ).....	77
5.3.5 Robustez.....	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

Para o sucesso de um tratamento farmacológico, o medicamento deve ser eficaz, seguro e manter sua qualidade ao longo do tempo. Isso exige conformidade com normas regulatórias e controle rigoroso desde a seleção dos ativos farmacêuticos até os excipientes, assegurando pureza máxima. A estabilidade é essencial para manter essas características, evitando a perda do efeito terapêutico e a exposição a produtos tóxicos de degradação. As agências reguladoras no mundo preconizam através de diretrizes o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (MIE) que sejam seletivos para o fármaco e permitam a quantificação e identificação dos produtos de degradação (PDs) (Buschmann *et al.*, 2024; Blessy *et al.*, 2014).

Desenvolver um MIE pode ser um desafio complexo que requer uma compreensão profunda das propriedades físico-químicas do fármaco e dos PDs. Para fármacos apolares é particularmente desafiador devido às propriedades intrínsecas dessas moléculas. A natureza hidrofóbica dos compostos apolares dificulta a sua dissolução em solventes aquosos comuns, exigindo o uso de solventes orgânicos específicos e métodos analíticos adaptados. Como é o caso da Clofazimina (CLZ), fármaco utilizado na poliquimioterapia da hanseníase, doença negligenciada e endêmica na América Latina causada pelo bacilo intracelular *Mycobacterium leprae*. A CLZ é um fármaco com baixa solubilidade, o que representa um grande desafio para o desenvolvimento do MIE e dos estudos de degradação, que atestem sua qualidade (Träff *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2017; Ploemacher, *et al.*, 2020).

A técnica analítica considerada mais adequada, descrita tanto pelas farmacopeias quanto pelo ICH, para desenvolvimento de um MIE para PDs, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD), pois esta técnica proporciona uma grande flexibilidade de combinações a partir da variação de seus componentes (fase móvel, coluna cromatográfica e outros parâmetros analíticos) sendo possível fazer a separação de compostos com estruturas diversificadas, dentre as termicamente instáveis ou polares/iônicos, entre outros, em uma análise. Além do DAD possibilitar uma leitura no detector UV com uma ampla faixa de comprimento de onda. Estes métodos são desenvolvidos através de estudos de degradação forçada, onde o fármaco é submetido a condições de estresse (Tantawy *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020).

Esses estudos de degradação forçada aceleram a deterioração de um fármaco permitindo observar a redução do teor do princípio ativo e a formação de produtos de degradação (PDs). A análise dos PDs é crucial para garantir a segurança e eficácia contínua dos medicamentos, informando o desenvolvimento de formulações mais estáveis e condições ideais de armazenamento. Esses testes expõem medicamentos a condições extremas controladas, como temperaturas elevadas, alta umidade, variações de pH e agentes oxidantes para prever sua estabilidade. Atualmente, existem programas computacionais, como softwares, auxiliam na análise e identificação de produtos de degradação através de simulações *in silico*. Esses programas preveem reações de degradação com base na estrutura do fármaco e nas condições degradantes simuladas, fornecendo informações importantes sobre a probabilidade, fórmula química. (Hemingway et al., 2024; Barbosa et al., 2021).

Durante a elaboração de um estudo de degradação forçada, algumas ferramentas podem auxiliar no estabelecimento das condições de estresse mais adequadas com base na resposta do fármaco ao meio reacional, como a Análise de Componentes Principais (PCA). A PCA, através da elaboração de um planejamento experimental, pode simplificar a análise dos dados reduzindo a dimensionalidade dos conjuntos complexos. Isso é feito por meio de uma análise exploratória inicial que identifica os principais componentes que explicam a variação observada. Esse processo facilita a detecção de padrões e tendências na degradação, permitindo identificar os produtos predominantes e entender os mecanismos subjacentes (Ardila et al., 2021; Skibiński et al., 2016).

Atualmente, a literatura apresenta algumas limitações em trabalhos com desenvolvimento de MIE para a CLZ e aprofundamento sobre estudos de degradação para fármacos apolares em solução. Diante disto, o trabalho teve como objetivo desenvolver um MIE por CLAE-DAD e avaliar a degradação sob variação dos parâmetros de concentração da CLZ, porcentagem de solvente e do meio reativo através do planejamento experimental e PCA, além de realizar uma avaliação a partir do balanço de massas para sugerir o uso de técnicas complementares para detecção e elucidação estrutural de novos PDs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver método indicativo de estabilidade (MIE) para o fármaco Clofazimina a partir de ensaios de degradação forçada em solução para avaliar sua estabilidade e identificar seus produtos de degradação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para o fármaco Clofazimina;
- Realizar análise de degradação preditiva através de simulação in silico;
- Submeter o fármaco a degradação forçada através de meios degradantes em solução;
- Utilizar ferramentas quimiométricas para investigar as condições de degradação para fármaco de baixa solubilidade;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

A qualidade de um medicamento é um aspecto fundamental para assegurar sua eficiência terapêutica e segurança. Para atender todos os requisitos essenciais de qualidade, é necessário que o processo de produção esteja em total conformidade com as normas preconizadas pelos órgãos regulatórios competentes (Buschmann *et al.*, 2024). Também, é fundamental a adoção de medidas de controle que abranjam desde a seleção do ativo farmacêutico até os excipientes que compõem o medicamento, desta forma, é possível assegurar a pureza máxima de um fármaco e/ou medicamento. No desenvolvimento e implementação de esquemas terapêuticos, a estabilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA) e dos medicamentos é um fator determinante, sendo sua estabilidade essencial para garantir sua qualidade e segurança (Blessy *et al.*, 2014).

Neste contexto, os estudos de estabilidade farmacêutica desempenham um papel crucial durante o desenvolvimento e produção de um medicamento. Seu objetivo é fornecer informações quanto à variação da qualidade de um medicamento ao longo do tempo (BRASIL, 2019), analisando a degradação de um fármaco ou medicamento, a partir das observações de decaimento das propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados e em um intervalo de tempo pré-determinado, estabelecendo assim, o seu prazo de validade. Nesse sentido, esse tipo estudo também pode auxiliar na identificação de qual material é mais adequado para o acondicionamento do produto e quais são as condições mais favoráveis para realizar o seu transporte (Couto *et al.*, 2022).

Os fatores que influenciam a estabilidade dos medicamentos incluem variáveis intrínsecas e extrínsecas. Nesse sentido, a estabilidade é avaliada por meio de testes destinados a fornecer evidências sobre como a qualidade de um produto se altera sob a influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, entre outros. Além disso, aspectos como pH, polimorfismo, susceptibilidade do fármaco à oxidação ou hidrólise, potencial de interação entre fármaco, excipientes e materiais de embalagem, bem como o processo de fabricação, devem ser considerados no

planejamento dos estudos de estabilidade, uma vez que também exercem impacto significativo sobre a estabilidade do medicamento (Wang *et al.* 2022).

Os estudos de estabilidade visam assegurar que a identidade, potência, pureza e inocuidade dos produtos farmacêuticos sejam mantidas ao longo de todo o seu período de validade. Esses estudos são categorizados como acelerados, de longa duração e de acompanhamento. A execução desses estudos deve ser adequada às condições climáticas do país onde o registro do produto foi solicitado, isso de acordo com uma exigência da agência internacional de harmonização (ICH), publicada em 2003, devido a sensibilidade à umidade nos países de destino. Existem quatro zonas climáticas (I – IV) que se distinguem pelas suas condições anuais médias de temperatura e umidade (Quadro 1).

Quadro 1 – Zonas climáticas ICH e condições de estabilidade a longo prazo.

Zona Climática	Clima	Países	Temperatura de teste de longo prazo (°C)	Umidade relativa de teste de longo prazo (UR)
I	Temperado	Reino Unido, Norte da Europa, Rússia, EUA	21°C	45%
II	Subtropical e Mediterrâneo	Japão, Sul da Europa	25°C	60%
III	Quente e seco	Iraque, Índia	30°C	35%
IVa	Quente e úmido	Irã, Egito	30°C	65%
IVb	Quente e muito úmido	Brasil, Singapura	30°C	75%

Fonte: Adaptação ICH (*International Council for Harmonization*), 2003.

Levando em consideração a zona climática correspondente, o Brasil é classificado como zona climática IV, caracterizada por um clima quente e úmido. De acordo com uma nota de atualização dos especialistas do ICH (*International Council for Harmonization*), os países não localizados no guia Q1A(R2) entram no critério de países guarda-chuva, que se enquadram por região climática já designadas para unificar o armazenamento de estabilidade e os critérios de duração do estudo e reduzir o número de diferentes condições de armazenamento (González-González *et al.*, 2022).

O estudo de estabilidade acelerado consiste em um processo que acelera a degradação de medicamentos em fase de desenvolvimento, utilizando condições de armazenamento extremas para induzir tais mudanças de maneira mais rápida. O objetivo é avaliar as degradações observadas e estimar o prazo de validade ao manter o produto nas condições recomendadas pelo fabricante. Esses resultados são essenciais para o processo de registro do medicamento, o estudo é conduzido ao longo de um período de seis meses (Brasil, 2019).

O estudo de estabilidade de longa duração é conduzido sob condições de armazenamento normais, com o propósito de validar os resultados obtidos no estudo acelerado e estabelecer o prazo de validade do produto farmacêutico. As análises são inicialmente realizadas ao longo de 24 meses, e o fabricante tem a opção de estender o estudo para determinar um prazo de validade mais longo, desde que os critérios de aceitação sejam mantidos (Brasil, 2019).

O estudo de estabilidade de acompanhamento é conduzido após a concessão do registro ou notificação do produto, com o objetivo de monitorar a preservação de suas características conforme estabelecido nos estudos preliminares. Isso garante que a empresa implemente um controle eficaz de mudanças e avalie periodicamente seu impacto sobre o produto (Brasil, 2019).

3.2 DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os estudos de degradação forçada, também conhecidos como testes de estresse, são uma etapa crucial no desenvolvimento de um programa de estabilidade em conformidade com as regulamentações para substâncias medicamentosas e produtos farmacêuticos. Esses estudos são realizados na indústria há muitos anos, mas se tornaram um requisito regulatório formal com a introdução da diretriz da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) intitulada 'Teste de Estabilidade de Novas Substâncias e Produtos Medicamentosos' (Q1A) em 1993. Desde então, essa exigência foi ampliada para incluir medicamentos genéricos e o interesse sobre o tema cresceu em todo mundo (Brasil, 2019; ICH, 2003).

Para auxiliar na predição da estabilidade de um fármaco, os estudos de degradação forçada são realizados expondo o medicamento a condições controladas e extremas de estresse, como temperaturas elevadas, alta umidade, luz intensa, variações de pH e íons metálicos. Essas condições aceleram a degradação do

fármaco, permitindo a observação de como o princípio ativo se comporta ao longo do tempo (Brasil, 2015). Esses estudos resultam na redução do teor do princípio ativo e na formação de produtos de degradação (PD). Os órgãos regulatórios consideram PDs como impurezas originadas de alterações químicas no ativo farmacêutico durante os processos de produção e/ou armazenamento. A análise desses produtos de degradação é essencial para avaliar a segurança e a eficácia contínua do medicamento, além de fornecer dados críticos para o desenvolvimento de formulações mais estáveis e para a definição de condições ideais de acondicionamento (Zhong *et al.*, 2023).

O estudo de degradação forçada busca compreender condições específicas nas quais o IFA ou o medicamento é particularmente mais sensível. Essa identificação é crucial para orientar o desenvolvimento farmacotécnico de produtos mais robustos, uma vez que vulnerabilidades específicas podem ser abordadas mediante o uso de excipientes, dentre outros fatores. Além de fornecer noções sobre as vias de degradação e outros PDs potenciais que podem ser formados. No cenário nacional, baseando-se no guia internacional Q3B do ICH, a ANVISA publicou em 20 de dezembro de 2013 a RDC nº 58 (que posteriormente foi revogada e substituída pela RDC nº 53, em 4 de dezembro de 2015), na qual determina os critérios para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos contendo substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos ou similares, e adota outras medidas. A resolução demanda que as empresas farmacêuticas façam o acompanhamento dos produtos de degradação dos medicamentos, visando não apenas conhecer suas estruturas, mas também garantir a qualidade e segurança dos produtos (Mendes *et al.*, 2023; BRASIL, 2015). Os valores para dos limites de quantificação, detecção, notificação são descritos nos Quadros 2, 3 e 4.

Quadro 2 – Limites de qualificação para produtos de degradação em medicamentos.

Limites de Qualificação	Dose Máxima Diária ¹	Limites ^{2 3}
	<10 mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10 mg-100mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100 mg - 2g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2g	0,15%

Fonte: Adaptação da RDC Nº 53, 2015.

¹ Quantidade de fármaco ingerido por dia

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

³ Limites maiores devem ser cientificamente justificados.

Quadro 3 – Limites de identificação para produtos de degradação em medicamentos.

Limites de identificação	Dose Máxima Diária ¹	Limites ^{2 3}
	<1mg	1,0% ou 5µg ATD, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	>10mg-2g	0,2% ou 2mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,10%

Fonte: Adaptação da RDC Nº 53, 2015.

¹ Quantidade de fármaco ingerido por dia

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação

³ Limites maiores devem ser cientificamente justificados

Quadro 4 – Limites de notificação para produtos de degradação em medicamentos.

Limites de Notificação	Dose Máxima Diária ¹	Limites ^{2 3}
	≤1g	0,1%
	>1g	0,05%

Fonte: Adaptação da RDC Nº 53, 2015.

¹ Quantidade de fármaco ingerido por dia

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

³ Limites maiores devem ser cientificamente justificados.

É importante salientar que os valores descritos nos quadros 2, 3 e 4 podem sofrer alterações, variando de cada composto, pois limites menores podem ser assumidos caso o produto de degradação seja extremamente tóxico (ICH, 2006).

3.2.1 Condução do estudo de degradação forçada

Agências reguladoras, como ANVISA e ICH, estabelecem diretrizes e requisitos para a condução dos estudos de degradação forçada através de uma cuidadosa avaliação das características intrínsecas de medicamentos e IFAs, analisando também as possíveis condições de armazenamento e uso. Os estudos devem ser feitos em um lote piloto do medicamento piloto, laboratorial ou industrial. O ideal é que as condições de degradação sejam aplicadas de maneira uniforme ao placebo, ao insumo farmacêutico e à formulação finalizada, a fim de facilitar propósitos comparativos. A RDC nº 53/2015 indica a aplicação do estudo a todas as dosagens do medicamento presentes no mercado (BRASIL, 2015; ICH 2003).

No entanto, ainda existe uma falta de clareza na literatura científica e nas diretrizes regulamentares sobre qual seria o ponto final "adequado" para os experimentos de estresse. Em outras palavras, não há consenso claro sobre como determinar se uma amostra foi suficientemente submetida a condições de estresse. Considera-se aconselhável gerar uma degradação mínima de 10% no pico de referência. Isso iria assegurar que a degradação não seja excessivamente suave nem resulte na geração de produtos de degradação de segunda ordem (outros produtos que serão provenientes de substâncias que já estão degradadas) (Zelesky *et al.*, 2023; Schou-Pedersen, *et al.* 2015).

3.2.2 Testes de degradação forçada

3.2.2.1 Degradação ácida e básica

As degradações ácidas e básicas acontecem a partir da utilização de uma solução aquosa como um catalisador que viabiliza a aceleração do ataque a grupos funcionais ionizáveis que se encontram nas moléculas provocando modificações estruturais, essas reações também são conhecidas por hidrólises (Sengupta, *et al.*, 2018). Os grupos funcionais mais suscetíveis às hidrólises incluem, ésteres, lactonas, amidas e lactamas. Esses grupos tendem a se decompor, formando novos produtos. Por exemplo, ésteres e lactonas são hidrolisados para formar ácidos carboxílicos e álcoois, enquanto amidas e lactamas formam ácidos carboxílicos e aminas. A eficiência das hidrólises depende da presença de bons grupos abandonadores nas moléculas, que facilitam a sua clivagem (Blessy *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2015).

A hidrólise ácida é um processo de degradação que ocorre quando uma substância é exposta a um ambiente ácido, geralmente se utiliza o ácido clorídrico (HCl), onde a presença de prótons (H^+) facilita a clivagem de ligações químicas pela interação com moléculas de água. A hidrólise básica, por outro lado, ocorre quando uma substância é exposta a um ambiente alcalino, neste caso o hidróxido de sódio (NaOH), onde a presença de íons hidroxila (OH^-) catalisa a clivagem de ligações químicas (Krait, *et al.* 2021; Sengupta, *et al.*, 2018).

Estudos de hidrólise ácida são cruciais para prever a estabilidade de medicamentos em condições em que o pH pode ser baixo, como no trato gastrointestinal por exemplo. Os estudos de hidrólise básica são essenciais para

entender como os medicamentos se comportam em ambientes alcalinos, que podem ser encontrados em certos locais do corpo ou durante o armazenamento em condições inadequadas. Esses estudos ajudam a identificar produtos de degradação que possam surgir durante o armazenamento ou uso do medicamento, permitindo ajustes na formulação para melhorar a estabilidade e segurança do produto (Rao *et al.*, 2015). Em casos que composto for insolúvel ou apresentar baixa solubilidade em solução aquosa, é recomendável o uso de cossolventes orgânicos. A escolha do cossolvente que será utilizado irá depender da estrutura da molécula, sendo preferível a utilização dos que compõem a fase móvel do sistema cromatográfico utilizado durante o estudo. Esses cossolventes são utilizados para produzir amostras com força cromatográfica semelhante e minimizar a perda de qualidade nos parâmetros cromatográficos de adequabilidade do sistema (Blessy *et al.*, 2014).

3.2.2.2 Degradação oxidativa

A oxidação é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, ocorrendo devido à transferência de elétrons do composto para o agente oxidante para formar cátions e ânions reativos. Este processo pode ser desencadeado por várias condições de exposição das amostras, incluindo oxigênio puro, peróxidos, ou radiação ultravioleta para acelerar o processo de oxidação, o mais comum é a exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Florence, 2011). Os radicais livres formados durante essas reações podem iniciar cadeias de reações que resultam na degradação do composto. Alguns grupos funcionais nas moléculas de fármacos são particularmente suscetíveis à degradação oxidativa, os grupos aromáticos, como os anéis fenólicos, são vulneráveis à oxidação, resultando na formação de quinonas. As aminas são outro grupo funcional suscetível, que pode ser transformado em óxidos de amina ou nitrosaminas durante a oxidação (Merey *et al.*, 2020; Rao *et al.*, 2015; Florence, 2011).

A oxidação e, em certa medida, a hidrólise, podem ser catalisadas pela luz, afetando tanto o fármaco quanto o produto final ou o material de armazenamento. A radiação ultravioleta, proveniente de fontes naturais ou artificiais, é particularmente propensa a causar fotodegradação dos medicamentos. Portanto, são necessárias precauções específicas no manuseio desses produtos, como o uso de embalagens opacas ou âmbar, revestimentos protetores, ou embalagens secundárias para

minimizar a exposição à luz e preservar a estabilidade do fármaco durante a execução do estudo (Curi-borda, *et al.*, 2021; Tønnesen, 2001).

3.3 ANÁLISE IN SILICO

Atualmente, já existem ferramentas computacionais que auxiliam no estudo e na identificação de possíveis produtos de degradação, também conhecidas como análises *in silico*, como o Zeneth® (Lhasa Limited®, Reino Unido) e o ACD/Percepta® (ACD Labs®, Canadá). Programas como o Zeneth®, são capazes de realizar análises preditivas dos produtos de degradação em potencial a partir da estrutura do fármaco e da simulação das condições degradantes. Desta forma, o software consegue estipular as possíveis reações de degradação que poderiam gerar esses produtos, incluindo: nível de probabilidade, fórmula química, massa exata, mudança na massa e descrição do caminho de degradação. Todavia, é importante considerar que, esses programas são ferramentas auxiliares para o entendimento e a identificação de moléculas ainda desconhecidas. Após a utilização desses programas, é necessário realizar métodos experimentais confirmatórios para elucidar a estrutura real dos compostos em análise, garantindo a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos (Hemingway, *et al.*, 2024; Barbosa *et al.*, 2021).

3.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Uma vez que, a estrutura de um PD pode ser de natureza desconhecida, as entidades produtoras de medicamentos de referência realizam os estudos de perfil degradação, no qual se submete o produto de interesse a condições de estresse, a fim de investigar sua estabilidade ao longo do tempo, utilizando um método analítico capaz de separar e quantificar os PDs provenientes do IFA e dos excipientes, ou decorrente da interação de ambos, no caso de produtos acabados (Jain *et al.*, 2023). Assim, como o objetivo desse método analítico é avaliar a estabilidade dos compostos de uma formulação, ele é chamado de método indicativo de estabilidade (MIE). A ANVISA define MIE como ferramentas analíticas validadas que sejam capazes de quantificar o teor do IFA após a exposição das condições de estresse e quantificação isolada dos PDs e de outros componentes de interesse, sem interferência. Neste contexto, um MIE deve ser capaz de detectar e quantificar todos os PDs na amostra (Brasil, 2019).

O desenvolvimento de um MIE requer atenção a alguns fatores importantes. Inicialmente, é essencial o conhecimento físico-químico do material, levando em consideração que cada IFA ou produto acabado possuem propriedades químicas diferentes pela sua natureza intrínseca ou extrínseca, dessa forma é possível estabelecer os parâmetros da técnica analítica de modo adequado para a substância, garantindo que o método desenvolvido seja robusto e capaz de identificar e quantificar produtos de degradação de forma eficaz. Assim como a escolha das condições de estudo, sejam elas semelhantes ao ambiente real ou situações extremas, como ambiente de estresse (Träff *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2017).

A técnica analítica considerada mais adequada, descrita tanto pelas farmacopeias quanto pelo ICH, para desenvolvimento de um MIE para PDs, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo (CLAE-DAD), pois esta técnica proporciona uma grande flexibilidade de combinações a partir da variação de seus componentes (fase móvel, coluna cromatográfica e outros parâmetros analíticos) sendo possível fazer a separação de compostos com estruturas diversificadas, dentre as termicamente instáveis ou polares/iônicos, entre outros, em uma análise. Além do DAD possibilitar uma leitura no detector UV com uma ampla faixa de comprimento de onda (Tantawy *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020).

Para assegurar a eficiência do processo da separação cromatográfica, é fundamental fazer o acompanhamento da adequabilidade do método através dos parâmetros do sistema cromatográfico como: pureza do pico, resolução, assimetria, pratos teóricos e fator de retenção. Porém, quando utilizada sozinha a CLAE-DAD pode ser limitada para moléculas não voláteis ou termicamente instáveis, uma vez que, essas moléculas podem não ser facilmente detectadas pelo detector UV. Todavia, a CLAE não fornece informações suficientes para identificação estrutural. Por este motivo, o método é usualmente acoplado ao espectrômetro de massas (EM) que tem a capacidade de receber compostos voláteis, possui alta resolução e fornece informações estruturais inequívocas (Sversut *et al.*, 2019; Youzhong *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2013).

3.5 BALANÇO DE MASSAS

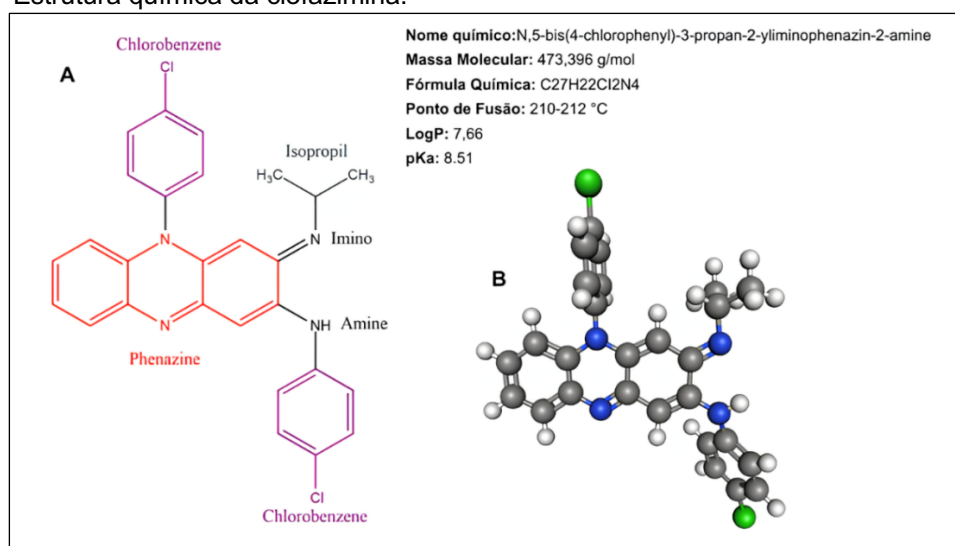
O balanço de massas (BM) é uma ferramenta analítica muito importante no MIE, ela envolve a soma do teor e dos níveis remanescentes dos PDs encontrados

após degradação, visando avaliar quão próximo esse somatório está de atingir 100% do valor do teor inicial da amostra (ICH, 2003; Brasil, 2015). Essa avaliação leva em consideração as margens de erros analíticos, seguindo o princípio da conservação da massa. Embora seja um guia científico valioso na interpretação de dados, nem sempre é possível atingir esse objetivo devido a fatores como: a natureza intrínseca dos processos de degradação, variações experimentais e possibilidade da co-eluição de alguma impureza com o ativo, especialmente considerando a provável semelhança estrutural entre o produto de degradação e o ativo (Baertschi *et al.*, 2013). O BM é feito através de técnicas analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massa (MS), permitindo detectar e quantificar com precisão as concentrações de cada espécie química presente. É preciso fazer uma análise crítica das ferramentas analíticas em questão, visando o cumprimento do pretendido e almejando atender os padrões de qualidade necessários. Para finalidade de registro, eventuais impasses identificados podem ser comunicados para avaliação pelas autoridades sanitárias (Brasil, 2015).

3.6 CLOFAZIMINA

A clofazimina CLZ, Figura 1, foi sintetizada em 1957 por Barry *et al.*, na Irlanda. É um fármaco pertencente à classe das riminofenazinas, que são caracterizadas pela presença de um núcleo fenazina com um grupo alquilimino (R-imino) presentes na posição 2, e substituintes fenil nas posições 3 e 10 do núcleo fenazina.

Figura 1 – Estrutura química da clofazimina.



Legenda: A. molécula clofazimina planar; B. molécula clofazimina conformação espacial.

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> acessado em 24 de junho de 2024.

Essa estrutura molecular confere propriedades únicas à CLZ, sendo o grupo alquilimino na posição 2 considerado crítico para o combate à micróbios e infecções (Moloko *et al.* 2012). Atualmente, as formas farmacêuticas contendo clofazimina são comercializadas nas apresentações de suspensão micronizadas da molécula, incorporadas em uma cápsula mole, nas marcas Lamprene® (Novartis), Clofozine® (AstraZeneca), Hansepran® (Abbott), Lamcoin® (Pond's Chemical) (Xu *et al.*, 2023).

A CLZ é caracterizada como uma molécula lipofílica catiônica, o que lhe atribui domínios hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. Ela possui um coeficiente de partição (log P) de 7,66, indicando sua alta hidrofobicidade e resultando em uma absorção limitada do ingrediente farmacêutico ativo em condições fisiológicas. É importante ressaltar que, a cor da clofazimina em solução pode variar dependendo do pH do meio: em ambientes alcalinos, ela apresenta uma tonalidade amarelo alaranjada; em pH neutro a levemente ácido, a cor tende a ser vermelho profundo; em condições fortemente ácidas, a substância pode adquirir tonalidades violeta e pode, eventualmente, se tornar incolor. A capacidade da CLZ de modificar sua cor em resposta às variações de pH pode ter implicações na sua interação com componentes biológicos e na sua atividade farmacológica (Venkata *et al.* 1999; Moloko *et al.* 2012). As propriedades físico-químicas singulares da CLZ desempenham um papel crucial na sua farmacocinética, nos supostos mecanismos de ação e nos potenciais efeitos adversos associados ao seu uso. A lipofilicidade elevada da substância influencia sua absorção e distribuição nos tecidos, a baixa solubilidade aquosa pode afetar sua biodisponibilidade e metabolismo, o que pode até mesmo levar a um quadro de efeitos indesejados e toxicidade (Li *et al.* 2016).

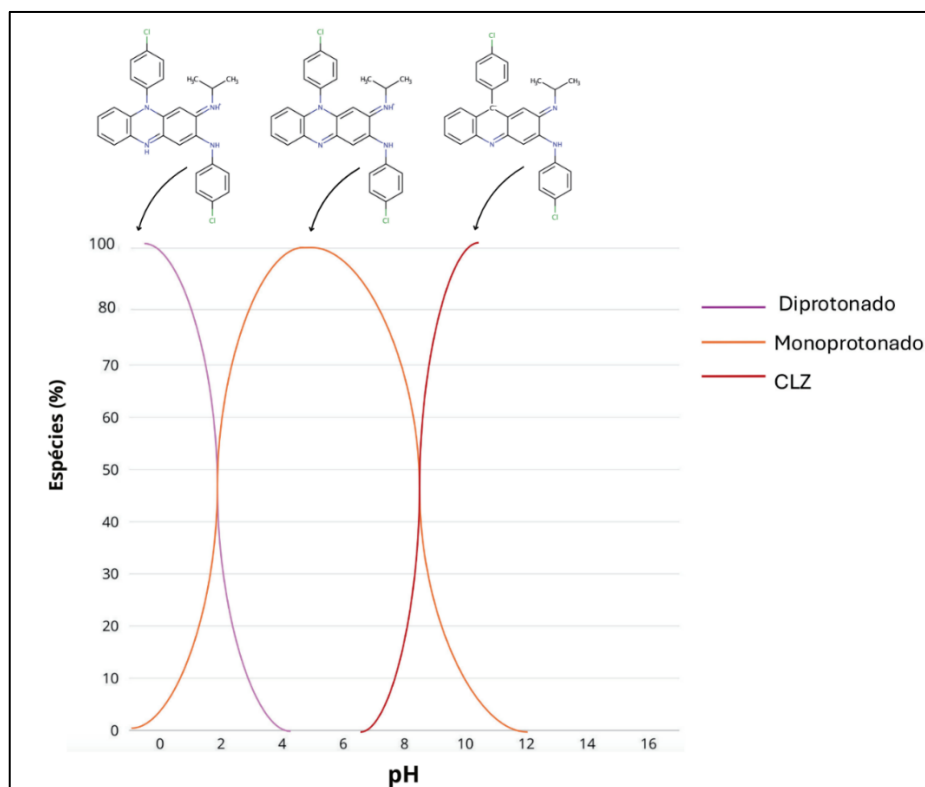
Ainda não está totalmente elucidado o mecanismo exato pelo qual a clofazimina é absorvida do trato gastrointestinal para a circulação. No entanto, alguns estudos sugerem que uma fração do fármaco é transportada em micelas, o que facilita sua absorção para a circulação sistêmica através da linfa, embora esse não seja considerado o principal modo de absorção. Uma vez que a clofazimina é absorvida pela circulação sistêmica, ocorre uma rápida distribuição para os compartimentos periféricos, seguida por um reequilíbrio mais lento para o compartimento central. Esse processo resulta em um aumento gradual na concentração plasmática média do

fármaco e na consequente formação de um estado estacionário com um patamar relativamente baixo (Mirnejad *et al.* 2018; Sousa *et al.* 2020).

3.6.1 Ionização

Os valores de pKa, junto com as solubilidades, coeficientes de partição e taxas de reação, são algumas das propriedades físico-químicas mais importantes dos fármacos e excipientes utilizados na formulação de medicamentos. O pKa de um composto indica a tendência do ácido a perder um próton, determinando seu estado de ionização em diferentes pHs, incluindo moléculas mono-, di- e tri-próticas (Kin y Tam, *et al.* 2001). A extensão da ionização de um fármaco pode influenciar sua solubilidade, taxa de dissolução, cinética de reação, complexação com transportadores de fármacos, absorção através de membranas biológicas, distribuição no local de ação, metabolismo e interações com proteínas ou receptores (Quigley *et al.*, 1989). A relação entre pKa e pH influencia diretamente o comportamento de um fármaco durante análises. Qualquer alteração nesses valores deve ser considerada, pois a ionização resultante pode impactar significativamente o resultado. Por exemplo, de acordo com Prankerd *et al.* (2007), considerando uma diminuição de 0,3 unidades no pH, embora pareça pequena, representa um aumento de duas vezes na atividade do íon hidrônio. Esse aumento pode dobrar a taxa de reação, reduzindo pela metade a vida útil do fármaco, e, variação de 0,05 unidades no pKa, considerada trivial por muitos, resultaria em uma mudança de 10,9% na extensão da ionização de um ácido ou base fraca em um pH fixo. Essa alteração na polaridade pode significativamente influenciar a solubilidade e as propriedades de partição, comparável a erros experimentais em estudos farmacocinéticos ou biofarmacêuticos rigorosos (Dohoda *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, a CLZ apresenta, pelo menos, dois pKa (DRUGBANK, [s.d.]; HMBD, [s.d.]; PUBCHEM, [s.d.]). Em solução, dependendo do pH do meio, essa molécula pode estar em sua forma molecular e/ou ionizada, Figura 2, previsão simulada usando o software MarvinSketch® (Chemaxon®, Budapeste, Hungria).

Figura 2 – Perfil de protonação de CLZ sob variação de pH de acordo com seu pKa.



Fonte: Adaptação Keswani, *et al.* (2016). Predição via MarvinSketch® (Chemaxon®). Acesso 10 de julho de 2024.

Keswani, *et al.* (2016) utilizou uma unidade de espectroscopia fotoacústica para medir quantitativamente as propriedades espectrais do sinal da CLZ. As medições mostraram variações dependentes do comprimento de onda na geração de ondas ultrassônicas, correspondentes às mudanças nos espectros de absorbância da CLZ protonada. A CLZ, um fármaco básico com dois grupos amina protonáveis, exibiu um desvio batocrômico dependente do pH nos espectros, com picos em 450 nm, 495 nm e 540 nm, correspondendo às espécies moleculares de base livre, monoprotonadas e diprotonadas, respectivamente.

Esses resultados preditivos são suportados por estudos na literatura (VERBIĆ *et al.*, 2023). Essas propriedades são fundamentais para o desenvolvimento de um método de identificação e quantificação por CLAE eficiente e sensível e ajudam na seleção prévia dos componentes do sistema, como fases móvel e estacionária, temperatura do forno e diluente usado para solubilizar as amostras.

3.6.2 Clofazimina e hanseníase

A hanseníase, também chamada de Doença de Hansen, é uma doença negligenciada que se caracteriza por uma infecção causada pela bactéria

Mycobacterium leprae. A contaminação se dá através das vias respiratórias e possui progressão lenta e acomete principalmente os nervos periféricos, o que dificulta a detecção precoce, e aumenta o estigma social associado que pode levar à discriminação dos pacientes (Ploemacher, *et al.*, 2020; BRASIL, 2023).

Na década de 1960, a eficácia da CLZ no tratamento da hanseníase multibacilar foi demonstrada pela primeira vez em testes clínicos em humanos (Browne e Hogerzeil, 1962) e, desde então, a clofazimina tem sido um componente essencial no tratamento da hanseníase, sendo designada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como parte da poliquimioterapia padrão para a doença, atualmente em combinação com a dapsona e rifampicina. A administração simultânea dos fármacos é indispensável para a cura da doença, já que individualmente nenhum deles é capaz de erradicar o bacilo definitivamente (Souza *et al.* 2020). No tratamento da hanseníase, a clofazimina é empregada para controlar o eritema nodoso hansênico durante as fases reacionárias agudas da doença, além de contribuir para a redução da dose de corticosteroide requerida para o manejo desses pacientes (Caitriona *et al.*, 1992). Assim como outras riminofenazinas, a CLZ demonstrou atividade contra micobactérias de crescimento lento e rápido, além de serem eficazes contra a maioria das outras bactérias Gram-positivas *in vitro*, inclusive aquelas que são multirresistentes (Venkata *et al.* 1999). Entretanto, os dados presentes na literatura acerca das aplicações clínicas da clofazimina como agente antimicrobiano são extremamente limitadas. Os mecanismos de ação antimicrobiana da clofazimina não estão completamente esclarecidos.

3.7 Planejamento experimental

Habitualmente, dentro dos experimentos, pode haver interesse em estudar o efeito de dois ou mais fatores, e, nesses casos, um planejamento experimental deve ser utilizado. O planejamento experimental (PE), também conhecido como delineamento experimental, consiste em uma série de ensaios desenvolvidos com base em critérios científicos e estatísticos. Seu objetivo é identificar a influência de diferentes variáveis nos resultados de um determinado processo. Esse objetivo principal pode ser subdividido em metas específicas conforme o propósito dos ensaios podendo determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados ou atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar as respostas (McMullen *et al.*,

2024). Nos experimentos fatoriais, onde os fatores variam simultaneamente, investigamos todas as combinações dos níveis dos fatores em cada tentativa completa ou replicação do experimento. Esse tipo de planejamento é normalmente representado por n^x , onde x é o número de fatores e n é o número de níveis escolhidos (Pasqualoto *et al.*, 2007; Neves *et al.* 2002).

Nos PEs em que as variáveis são exploradas em diferentes níveis, são comumente utilizados os sinais (+) e (-) para codificá-los. O emprego dos sinais aos níveis superiores ou inferiores é feito de modo arbitrário e não interfere na realização dos experimentos ou na interpretação dos resultados, permitindo esquematizar o planejamento na forma de matrizes.

3.7.1 Ferramentas Quimiométricas

A quimiometria usa métodos matemáticos e estatísticos para tratar, interpretar e prever informações químicas de diversos produtos, evoluindo nas últimas décadas para converter dados em informações úteis. Na saúde, ela já é aplicada no planejamento de fármacos, sendo uma valiosa ferramenta nas indústrias química e farmacêutica, ajudando no controle de qualidade e otimização de processos (Svetič *et al.*, 2024; Hidalgo *et al.*, 2018). Para uma análise de dados químicos bem-sucedida, é essencial organizar, visualizar e pré-processar os dados para uso em softwares, realizando uma análise exploratória não supervisionada para reconhecer padrões e classificar amostras por similaridades e dissimilaridades. A análise de componentes principais (PCA) é amplamente utilizada nesse contexto, transformando grandes conjuntos de variáveis em componentes principais para simplificar a visualização e interpretação sem perder informações críticas (Wang *et al.*, 2022).

Durante estudos de degradação forçada, amostras são expostas a condições estressantes como calor, luz e variações de pH para acelerar a degradação. A PCA pode simplificar a análise dos dados ao reduzir a dimensionalidade dos conjuntos complexos através de uma análise exploratória inicial, identificando os principais componentes que explicam a variação observada. Isso facilita a detecção de padrões e tendências na degradação, permitindo a identificação dos produtos predominantes e o entendimento dos mecanismos subjacentes (Ardila *et al.*, 2021; Skibiński *et al.*, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMOS

O insumo farmacêutico ativo (IFA) da CLZ foi adquirido através da empresa Macleods Pharmaceuticals Limited®. Segundo certificado de análise do fornecedor o IFA da CLZ apresenta teor de 99,5%. O IFA foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração.

4.2 REAGENTES

A água ultrapura foi obtida de um purificador Milli-Q® para preparação das soluções. A solução da fase móvel foi filtrada com a utilização um filtro de membrana (Merck MF-Millipore® 0,45 µm) e foi degaseificada em banho ultrassônico por 10 minutos antes do uso. Outros componentes da fase móvel foram degaseificados da mesma forma. Os demais reagentes estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1 – Lista de reagentes utilizados ao longo do trabalho.

REAGENTES	MARCA	LOTE
Acetonitrila	Supelco	JA122430
Metanol	J.T.Baker	G22W33
Ácido Fórmico	Synth	182592
Formiato de Amônio	Sigma-Aldrich	MKCS8578
Ácido Clorídrico	Química Moderna	07542
Hidróxido de sódio	NEON	522332
Peróxido de Hidrogênio	ALPHATEC	24192

Fonte: autora (2024).

4.3 INSTRUMENTAÇÃO

O sistema integrado de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizado consistia em um cromatógrafo Shimadzu® i-Series LC-2050C 3D (Kyoto, Japão) com detector de matriz de fotodiodos (DAD), uma bomba quaternária, amostrador automático sob refrigeração e forno para coluna. O software Shimadzu® Labsolutions LC (versão 5.117) foi usado para aquisição e análise de dados.

4.4 PREDIÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO IN SILICO

As análises preditivas da degradação foram realizadas através do Zeneth® (Lhasa Limited®), um software para a previsão da degradação química de moléculas orgânicas que incorpora uma base de conhecimento de regras para prever vias de degradação. A base de conhecimento do software contém preditores de propriedade que modulam a probabilidade prevista de um determinado produto de degradação. Foram estipuladas, dentro do software, as condições de estresse alinhadas com as diretrizes do International Council for Harmonisation (ICH) e com a RDC Nº 53 de 2015. A especificidade dos resultados da previsão foi analisada, resultados dos produtos de degradação gerados foram observados experimentalmente e uma avaliação das possíveis causas dessas previsões é apresentada nos resultados.

4.5 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO MÉTODO DE INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE) POR CLAE

Diversas variações do método foram exaustivamente testadas até obtenção do método mais adequado composto por tampão formiato 50 mM pH 3,0 (A) e acetonitrila (B). A temperatura de eluição foi fixada em 30 °C, o fluxo de 1,0 mL/min e 20 µL de volume de injeção. O método de eluição foi um gradiente 0,01 B-40, 35,00 B-60, 36,00 B-40, 40,00 B-40, durante 40 min, para assegurar que não haveria co-eluição entre os PDs que fossem quantificados. Todo método foi desenvolvido em uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C8 fase normal 25cm x 4,6mm, com tamanho de partícula de 5µm (Agilent®).

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE PRELIMINAR: DEGRADAÇÃO EM SOLUÇÃO

4.6.1 Planejamento Experimental

Para o estudo de degradação forçada, realizou-se um planejamento fatorial completo de três níveis com duas variáveis, ou seja, $3^2 = 9$ experimentos. Adicionando-se cinco experimentos no ponto central para a estimativa do erro puro resultando um total de 13 experimentos. O procedimento para a formulação do planejamento fatorial completo foi iniciado com a triagem das principais variáveis de processo que poderiam potencialmente influenciar na formação dos PDs, como solubilidade e concentração da CLZ. A grande quantidade de testes realizados teve

como objetivo a realização de uma análise exploratória sobre as condições para formação de PDs. A Tabela 2 mostra os níveis e fatores das variáveis independentes estudadas no planejamento fatorial completo (3²). O planejamento foi realizado com base no software STATISTICA (data analysis software system), for Windows versão 12.

Tabela 2 – Níveis reais das variáveis independentes para o planejamento fatorial 3².

FATORES	NÍVEIS		
	(-)	(0)	(+)
Porcentagem solvente (%)	20	35	50
Concentração da amostra (µg/mL)	20	60	100

Fonte: autora (2024).

A estrutura do planejamento fatorial com 13 experimentos é apresentada através da matriz de planejamento na Tabela 3. A matriz foi aplicada para todas as condições de degradação.

Tabela 3 – Matriz da porção fatorial do planejamento fatorial completo 3².

Experimentos	Porcentagem solvente (%)	Conc. da amostra (µg/mL)
1 ^a	20	20
2 ^a	20	60
3 ^a	20	100
4 ^a	35	20
5A1	35	60
5A1	35	60
5A3	35	60
5A4	35	60
5A5	35	60
6 ^a	35	100
7 ^a	50	20
8 ^a	50	60
9 ^a	50	100

Fonte: autora (2024).

4.6.2 Preparo da Solução de Referência

A solução de referência foi preparada em triplicata, pesou-se 12,5 mg de CLZ IFA, transferiu-se para balões volumétricos de 25 mL, adicionou-se 10 mL do solvente metanol (MeOH) e submeteu-se a desgaseificação por 5 min em lavadora ultrassônica Schuster® (Santa Maria, Brasil). Esse processo foi repetido até ser obtido o volume próximo ao menisco, o solvente foi acrescido vagarosamente com o objetivo de permitir uma melhor solubilização do IFA. Ao final, o volume foi completado com o respectivo solvente, obtendo-se a concentração de 500 µg/mL. Em seguida foi retirada da amostra uma alíquota de 0,2 mL e foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, onde foi acrescido 9,8 mL da solução diluente composta por ACN:MeOH (1:1, v/v) e aferiu-se o menisco, obtendo-se a concentração final de 10 µg/mL. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um *vial* para análise no cromatógrafo.

4.6.3 Preparo das Soluções de Degradação: Ácida, Básica e Oxidativa

Para obter uma solução ácida de HCl 1 M (Ácido Clorídrico), básica de NaOH 1 M (Hidróxido de Sódio) e oxidativa de H₂O₂ 3% (Peróxido de Hidrogênio), destinadas à degradação, foi necessário preparar três diferentes concentrações dos degradantes, um para cada porcentagem de solvente do planejamento fatorial, para que, ao final, a concentração de HCl fosse 1 M, NaOH fosse 1 M e H₂O₂ 3%, respectivamente, para todas as soluções de degradação.

4.6.4 Preparo das Amostras Degradantes Ácida, Básica e Oxidativa

Para o preparo das amostras degradantes (ácida, básica e oxidativa) foram consideradas as proporções de solventes estabelecidas no planejamento fatorial. Sendo assim, para cada porcentagem de solvente orgânico, o valor remanescente para atingir 100% do volume total da amostra foi de solução degradante. Deste modo, o preparo das amostras degradantes foi realizado, de forma independente, em balões de 10 mL onde, a porcentagem de solvente orgânico correspondia a solução de referência da CLZ em MeOH e a quantidade remanescente para aferir o menisco do balão foi das soluções de degradação de cada condição (ácida, básica ou oxidativa). Foi considerada também a variabilidade de concentrações da CLZ em diferentes porcentagens de solvente, desta forma, foi preparada uma solução individual de CLZ

para cada uma das amostras do planejamento fatorial, a partir de diluições feitas da solução de referência do IFA da CLZ (500 µg/mL). Para que, as soluções degradantes obedecessem aos critérios dos níveis e fatores individualmente.

4.6.5 Soluções de Análise

Para o preparo das soluções que seriam analisadas por CLAE-DAD, foi retirada uma alíquota de cada uma das soluções degradantes (ácida, básica e oxidativa) e transferidas individualmente para balões de 10 mL e aferiu-se o menisco com a solução diluente de ACN:MeOH (1:1, v/v). Quando necessário, as amostras foram neutralizadas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em 12.000 rpm por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para um *vial* para análise no cromatógrafo.

4.7 BALANÇO DE MASSAS

A avaliação do balanço de massas foi realizada até o IFA da CLZ atingir aproximadamente 10% de degradação, conforme especificado nas diretrizes regulamentares e respaldado pela literatura científica. As medições foram realizadas após um período de 24 horas da degradação, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para monitorar o decaimento do pico principal do composto de interesse, a CLZ, e o aumento das áreas dos picos correspondentes aos produtos de degradação nos cromatogramas.

4.8 VALIDAÇÃO

O MIE desenvolvido por CLAE-DAD foi validado de acordo as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, seguindo os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 (Brasil, 2017): linearidade, precisão, exatidão, seletividade, robustez, limite de detecção (LoD) e quantificação (LoQ), de acordo com os parâmetros estabelecidos na United States Pharmacopeia (USP) para garantir resolução ($r > 1,5$), pratos teóricos, ($P > 2000$), fator de calda ($T \leq 2,0$) e fator de capacidade ($k' \geq 2,0$) para cada pico a ser validado e subsequentemente quantificado (USP, 2003). As análises foram realizadas em triplicata com três replicatas para cada injeção e a média e o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado. Todos os cálculos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o *software Microsoft® Excel®*.

4.8.1 Seletividade

Foi determinada por análise e comparação dos dados cromatográficos (tempo de retenção e pureza de pico observada pelo espectro de UV), em triplicata.

4.8.2 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, estabelecendo uma relação linear por toda a faixa de trabalho. Essa determinação deve ser feita usando, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata (Brasil, 2017a). A linearidade e a subsequente quantificação foram realizadas a partir das curvas de calibração da CLZ IFA em 5 níveis de concentração (80% a 120%) separadamente. As áreas dos picos do cromatograma obtidas no comprimento de onda de 280 nm foram plotadas em função das concentrações de CLZ para a obtenção das equações da reta (regressão linear). A linearidade da equação de regressão foi determinada para cada composto separadamente a partir do coeficiente de correlação (r^2) e sua análise estatística feita no programa Excel® (pacote Microsoft Office®) pelos parâmetros recomendados pelo “Guia para tratamento estatístico da validação analítica” (GUIA nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017).

4.8.3 Precisão

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR = (DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. E deve ser determinada por meio da repetibilidade e precisão intermediária (Brasil, 2017a). **Repetibilidade:** 9 determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações (baixa 80%, média 100 % e alta 120%) com 3 réplicas em cada nível. Foram preparadas três amostras individuais para cada concentração e depois analisadas em triplicatas.

Precisão intermediária: 9 determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações (baixa 80 %, média 100 % e alta 130 %) com 3 réplicas em cada nível, em 3 dias diferentes por três analistas diferentes.

4.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (Brasil, 2017a). Por tanto, foram realizadas 9 determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 concentrações (baixa 80 %, média 100% e alta 120%) com 3 réplicas em cada nível.

4.8.5 Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ)

O limite de detecção (LoD) é a menor quantidade do analítico presente na amostra que pode ser detectado, e o limite de quantificação (LoQ), por sua vez, é a menor quantidade do analítico presente na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão (BRASIL, 2017a). Para este trabalho, determinou-se o LoD e LoQ através dos parâmetros da curva de calibração, utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{LoD (\%)} = \frac{3,3 \times \sigma}{\text{IC}} \qquad \text{LoQ (\%)} = \frac{10 \times \sigma}{\text{IC}}$$

Onde: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão obtido a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção.

4.8.6 Robustez

A robustez indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (Brasil, 2017a). Para validação do método desenvolvido, a robustez foi avaliada por meio de pequenas modificações no fluxo da fase móvel e na temperatura da coluna.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREDIÇÃO IN SILICO

As predições da degradação aconteceram via software Zeneth® (Lhasa Limited®) no qual foram simuladas condições de degradação em ambientes reais com mudanças de pHs, temperaturas e meios de reação de acordo com cada degradação individualmente. O software disponibiliza uma pontuação, ou *score*, de 0 a 1000. Quanto maior o *score* maior a probabilidade da formação do PD. Posteriormente, as mesmas condições simuladas via software foram reproduzidas experimentalmente para evidênciação dos PDs gerados.

5.4.1 Rotas de degradação

5.4.1.1 Ácida

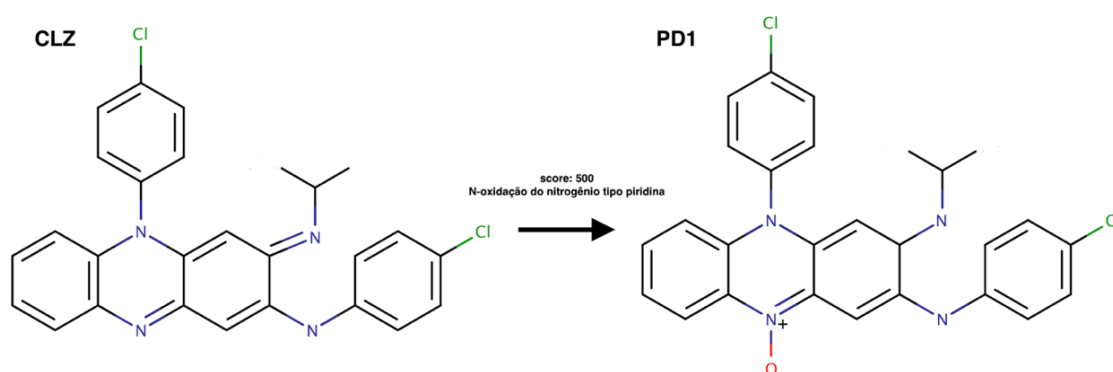
Análise simulando uma solução aquosa a pH 1,0 não há nenhum produto de degradação formado, nem mesmo a pH 0. Isso é esperado devido a estrutura molecular do fármaco. Nem mesmo aumentando a temperatura até 80 °C há a formação de degradantes. Reduzindo o *score* para 300, ainda não há formação de degradantes no pH ácido, o que ilustra a resistência da molécula a sofrer hidrólise em meio ácido. Entretanto, para atestar o resultado da predição *in silico* também foi executada experimentalmente a degradação ácida em solução com HCl 1 M.

5.4.1.2 Básica

Na básica, tivemos resultado semelhante. Mesmo em pH 14 e com temperatura de 80 °C, não há formação de degradantes, acima de *score* de 600. Todavia, diminuindo o *score* para mínimo de 500, é possível encontrar o mesmo PD e a mesma via de degradação em todas as condições testadas, uma N-oxidação do nitrogênio tipo piridina. Nesse caso, os átomos de nitrogênio aromáticos não-substituídos (“tipo piridina”) podem ser oxidados por peróxidos ou por oxigênio molecular (O₂) para dar origem a N-óxidos, sendo a reação com peróxidos a mais provável de ocorrer, e essa probabilidade diminui quando o pH é inferior a 5. Ademais, é necessária uma concentração significativa do substrato não protonado para que a reação ocorra. Os

imidazóis não substituídos, os pirazóis e compostos análogos estão excluídos, uma vez que o N-óxido é propenso a tautomerismo. É importante ressaltar que, assim como na simulação em meio ácido, não há hidrólise em meio básico, mas uma oxidação favorecida em meio básico. A reação é mostrada na Figura 3.

Figura 3 – D1 gerado a partir da degradação preditiva básica via software.



Fonte: Autoria própria a partir dos resultados de predição do Zeneth[®] (Lhasa Limited[®]), acesso 02 de julho de 2024. Reação desenhada a partir do Marvin[®].

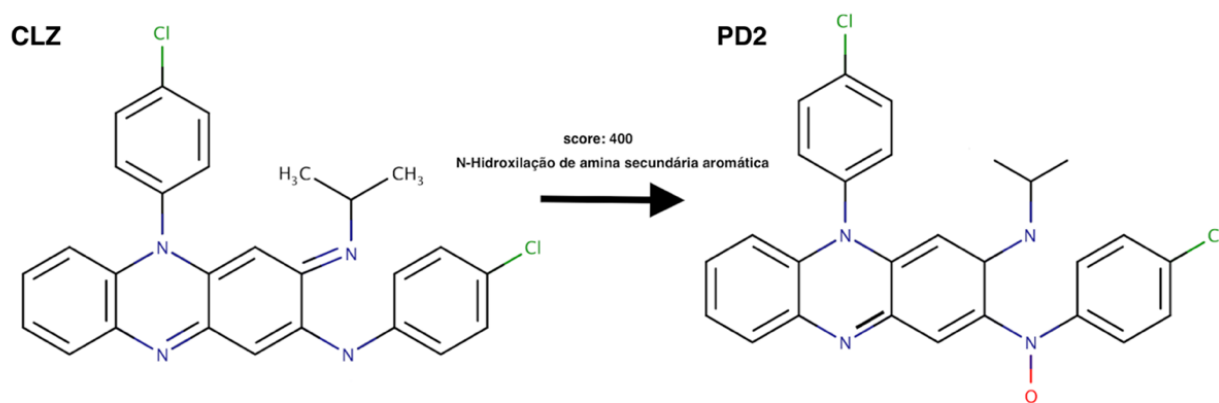
5.4.1.3 Oxidativa

Na oxidação com a utilização de peróxido como meio de degradação, em meio aquoso, o pH da solução reduz até próximo de 4. Na condição de 26 °C a pH 4 é sugerido 4 degradantes, um deles com score de 600 (D1) e os demais com score de 400. O D1 é o mesmo degradante sugerido pela básica, Figura 3, um N-oxidação do nitrogênio no anel tipo piridina, mas com maior possibilidade de ocorrer devido a presença do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse produto D1 pode sofrer um N-hidroxilação da amina secundária aromática na presença de H₂O₂ dando uma hidroxilamina (D3), cuja formação depende da concentração da amina não protonada e do pH do meio, visto que em pHs menores que 9 diminui a probabilidade dessa reação ocorrer, o que justificaria seu score de 400.

A formação dos produtos D2 e D4 são as mesmas reações só que em sentido inverso, ou seja, ocorre primeiro a hidroxilação para formar o D3, Figura 5, e este, por conseguinte, sofre um N-oxidação do nitrogênio do tipo piridina para formar o D4, Figura 6. Nas simulações *in silico* usando um pH maior é possível verificar a produção dos mesmos produtos de degradação, todavia a reação é favorecida e o score para formação de todos os PDs aumentam. Em simulações com aumento de temperatura, não há influência sobre a o aumento da produção de PDs ou favorecimento da reação.

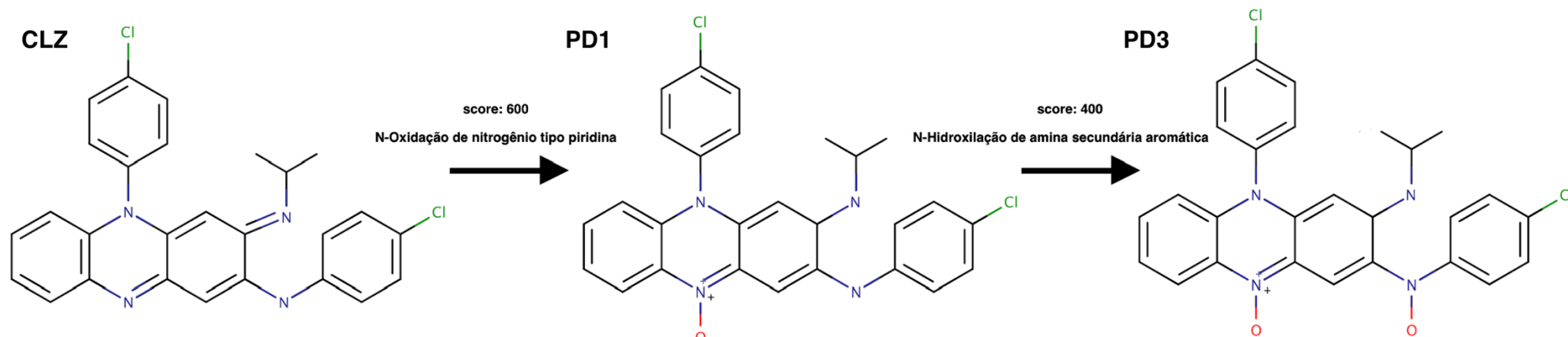
Implicando que somente o aumento do pH pode favorecer tanto a reação de N-oxidação quanto a de N-hidroxilação.

Figura 4 – D2 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.



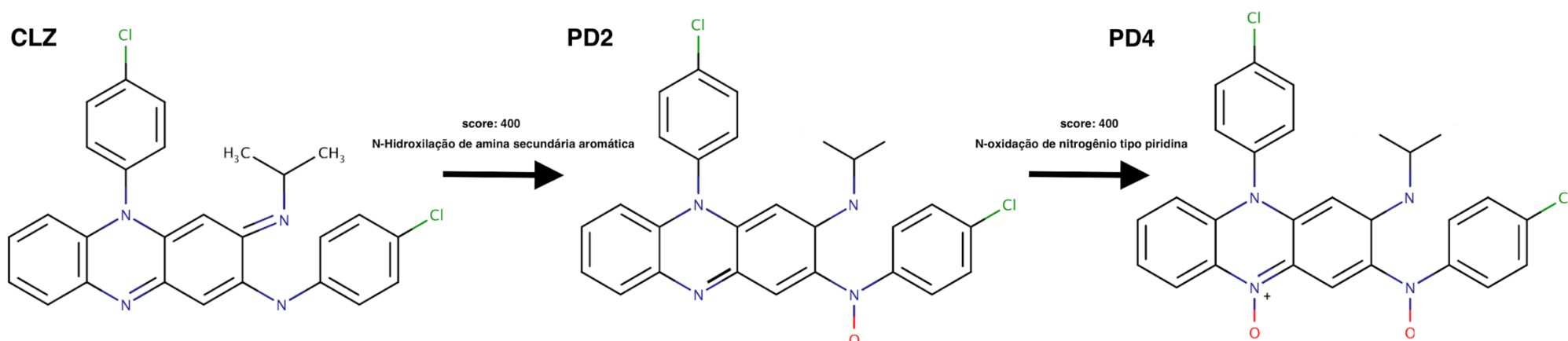
Fonte: Autoria própria a partir dos resultados de predição do Zeneth® (Lhasa Limited®), acesso 02 de julho de 2024. Reação desenhada a partir do Marvin®.

Figura 5 – D3 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.



Fonte: Autoria própria a partir dos resultados de predição do Zeneth® (Lhasa Limited®), acesso 02 de julho de 2024. Reação desenhada a partir do Marvin®.

Figura 6 – D4 gerado a partir da degradação preditiva oxidativa via software.



Fonte: Autoria própria a partir dos resultados de predição do Zeneth® (Lhasa Limited®), acesso 02 de julho de 2024. Reação desenhada a partir do Marvin®.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)

5.2.1 Degradação preditiva oxidativa

Para desenvolvimento do MIE foi utilizada uma amostra de CLZ degradada em meio oxidativo preparada com H₂O₂ a 3%, desta forma foi possível avaliar o perfil dos PDs formados e otimizar a separação dos sinais analíticos para assegurar maior eficácia do método.

5.2.2 Desenvolvimento do MIE

Para desenvolvimento de um MIE seletivo para o fármaco de interesse, possibilitando a identificação dos PDs, o primeiro passo envolve uma pesquisa bibliográfica sobre as características relevantes do fármaco, como o pKa dos grupos ionizáveis e os pHs nos quais suas formas ionizadas e não ionizadas estão presentes. Essas informações são essenciais para determinar a composição da FM e as condições do método cromatográfico.

Como mencionado anteriormente, por meio da análise da distribuição das espécies de íons da CLZ, feitas por Keswani *et al.* (2016), o fármaco CLZ possui pelo menos dois íons que podem interferir no seu comportamento em solução, o monoprotonado em pHs mais ácidos/neutros e o diprotonado, predominante em pHs ácidos. Diante disto, a partir de uma análise teórica prévia, concluiu-se que o pH ideal para utilização estaria dentro de uma faixa entre 4 e 8, no qual se sobressai o íon monoprotonado. Visto que, na faixa de pH entre 0 e 3,5 a forma ionizada presente é a diprotonada. Um íon diprotonado contém duas cargas positivas, devido à adição de dois prótons e o aumento na carga positiva causa uma maior repulsão eletrostática dentro da molécula, tornando a estabilização mais desafiadora, sendo menos estáveis que seus equivalentes monoprotonados que, com apenas uma carga positiva, devido à adição de um próton a uma molécula neutra, altera a densidade eletrônica da molécula, que pode estabilizar a carga extra por meio de ressonância ou efeitos indutivos (Bruice, 2006). A existência de apenas de uma espécie bem definida pode evitar problemas como cauda no pico cromatográfico, uma vez que a existência de outras espécies podem interagir de formas diferentes com a coluna.

Nesse sentido, a escolha de um tampão adequado é de grande importância para uma melhor eficiência de separação, uma vez que o tamponamento da fase móvel estabiliza a presença de uma espécie química. Assim, foi necessário um tampão que possuísse a faixa de tamponamento entre 4 e 8 e compatível com o detector de massas, visto que é importante para a identificação e de elucidação das estruturas dos PDs. Para conduzir o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, foi realizada uma revisão da literatura para encontrar informações relevantes que pudessem orientar o desenvolvimento do método.

O método de partida, previamente desenvolvido pelo grupo de pesquisa do qual faço, parte para a quantificação da CLZ, utilizava eluição isocrática com tampão acetato de amônio 25 mM pH 4,8 e acetonitrila (30:70, v/v) durante 5 minutos, a 1 mL/min, temperatura ambiente ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e volume de injeção de 20 μL , em coluna de fase reversa C18 (25cm x 4,6mm, 5 μm). No entanto, esse método resultava em picos extremamente assimétricos com fator de cauda superior a 2,0 e baixa pureza de pico (abaixo de 0,5), indicando possíveis co-eluições entre picos. Foi observado na literatura da CLZ que, para estudos de degradação forçada e análise de PDs, o pH da fase móvel frequentemente utilizado estava em torno de 3,0, fator crítico nos estudos revisados. Esse valor de pH foi corroborado pelos dados das Farmacopeias Europeia e Americana (USP). O ácido fosfórico era o reagente mais comumente utilizado para ajustar o pH nessa faixa (Patil; Deshpande, A. S.; Deshpande, S., 2018).

Logo, a primeira alteração no método de partida foi a substituição do tampão acetato pH 4,8 por ácido fosfórico pH 3,0 para avaliar como ficaria o pico. O pico referente a CLZ obteve assimetria com valor menor. Posteriormente, o ácido fosfórico foi substituído pelo ácido fórmico pH 3,0 por ser compatível com espectrometria de massas (EM), o que facilitaria em caso de uma provável necessidade de elucidação dos produtos de degradação. A mudança de pH fez sentido tomando como base a curva de ionização da CLZ, na qual o íon monoprotonado prevalente pode ser identificado em detrimento dos demais (Figura 2). Para se quantificar a forma não-ionizada (forma molecular) da CLZ seria necessário trabalhar em pH mais alto, acima de 8, fora da faixa de trabalho de colunas convencionais que operam entre 2,0 e 8,0. Verbic *et al.*, 2023 relatam pH 9,34.

A presença de outros íons da CLZ em solução poderia causar interferências na linha de base e no formato do pico, uma vez que apesar de ser ácido, o pH não

estabiliza devido à ausência do poder tamponante de uma solução tampão. Neste contexto, alterações foram realizadas na fase móvel, substituindo o ácido fórmico pelo seu respectivo tampão formiato de amônio. Foi escolhido inicialmente o tampão formiato de amônio 10 mM pH 3,0, todavia não foi suficiente para estabilizar o pH da solução amostra e, dessa forma, a concentração foi elevada para 25 mM pH 3,0. Foi observado que quando o formiato de amônio foi usado a 10 mM ocorriam mais variações entre as leituras, como flutuações na linha de base dos cromatogramas e baixa repetibilidades dos resultados. Quando o tampão foi utilizado a 25 mM junto com ACN em 60:40 (v/v) produziu excelentes resultados e mais consistência em relação aos parâmetros cromatográficos.

Como fase orgânica foi utilizada ACN, devido a sua maior capacidade de eluição da CLZ e a facilidade de interação com o IFA, podendo auxiliar na separação dos PDs. Isso é respaldado por Lin *et al.* (2022) que partiu do mesmo racional para separar impurezas, além de aumentar a resolução entre a separação dos compostos, em relação ao metanol (Ibrahim *et al.*, 2018).

Esses resultados corroboram com o trabalho recente publicado por Marques *et al.* (2023), o qual apresenta uma comparação entre o tampão acetato de amônio com o tampão formiato de amônio e o uso dos solventes MeOH e ACN, no desenvolvimento de métodos cromatográficos para estudo de degradação forçada. Os resultados desse estudo mostram que o tampão formiato de amônio fornece melhor eficiência de separação, com apresentando parâmetros cromatográficos mais adequados em relação ao tampão acetato. O trabalho também mostrou que a combinação de MeOH e dos dois tampões a pH 3,5 na proporção 50:50 (v/v) resultou na formação de um pico dividido, sendo substituído por ACN, devido à sua menor viscosidade, o que também ajudou na redução da pressão interna da coluna. Nos nossos resultados, o tampão formiato de amônio combinado com ACN apresentou a maior área de pico e número de pratos teóricos em comparação ao acetato de amônio. Assim, o formiato de amônio foi considerado o mais adequado e eficiente enquanto fase aquosa (A) e ACN como fase orgânica (B).

A partir dos resultados obtidos com gradientes exploratórios, diversos métodos com eluição em gradiente foram testados até aquele que permitisse uma melhor resolução entre os picos da CLZ e dos PDs. Desta forma foi escolhido um gradiente

com maior proporção aquosa, Tabela 4, para uma melhor eficiência na separação dos compostos.

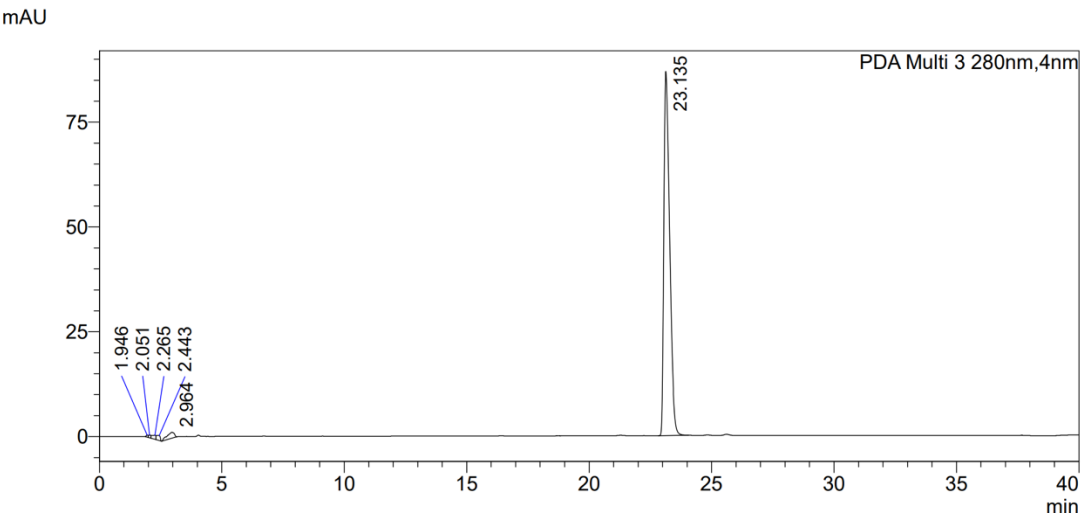
Tabela 4 – Condições cromatográficas utilizadas para eluição gradiente.

Gradiente (min)	Fase Aquosa A (%)	Fase Orgânica B (%)
0.01	60	40
35.00	40	60
36.00	60	40
40.00	60	40

Fonte: autora (2024).

O tempo de análise foi de 30 min com 10 min adicionais para possibilitar o reequilíbrio da coluna entre as leituras, totalizando 40 min. A temperatura de eluição foi fixada em 30 °C, o fluxo de 1,0 mL/min e 10 µL de volume de injeção. Todo método foi desenvolvido em uma coluna ZORBAX Eclipse Plus C8 fase normal 25 cm x 4,6 mm, com tamanho de partícula de 5µm (Agilent®). O resultado do método final é possível visualizar na Figura 7, com a amostra de CLZ referência a 10 µg/mL.

Figura 7 – Cromatograma referente a amostra referência da CLZ 10µg/mL após otimização do MIE.



Legenda: Método de eluição da clofazimina 10 µg/mL. Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

5.2.3 Escolha do diluente

Durante a elaboração do MIE, foi investigado o diluente mais adequado para CLZ, aspecto fundamental no desenvolvimento e otimização de métodos analíticos, especialmente, em técnicas de CLAE-DAD e CLAE-EM. A seleção do diluente tem a capacidade de influenciar diretamente na estabilidade da amostra, eficiência da separação cromatográfica e na precisão dos resultados analíticos (Chion *et al.* 2005). A estabilidade da amostra no diluente escolhido é vital para prevenir alterações nos parâmetros cromatográficos entre as análises. Além disso, em métodos quantitativos usando CLAE, a solubilidade é de vital importância, especialmente, quando se trabalha com fármacos insolúveis em água como no caso da CLZ (Ruta *et al.* 2010).

Assim, a primeira etapa no desenvolvimento de um método analítico baseia-se na análise dos interferentes e determinação dos parâmetros ideais para preparo de uma amostra. Essa informação é importante para tanto para determinar a FM e quanto o diluente. Como visto no tópico anterior, 5.1, a escolha da faixa de pH com maior favorecimento para a CLZ está entre 3 e 8. Desta forma, foi elaborado um experimento para estabelecer o diluente ideal que causaria menos interferências nas propriedades cromatográficas. O objetivo do estudo foi avaliar o pH das diferentes combinações e identificar o nível de interferência na leitura das análises da CLZ 10 µg/mL, bem como melhor solubilidade. As combinações e seus pHs são descritos na Tabela 5.

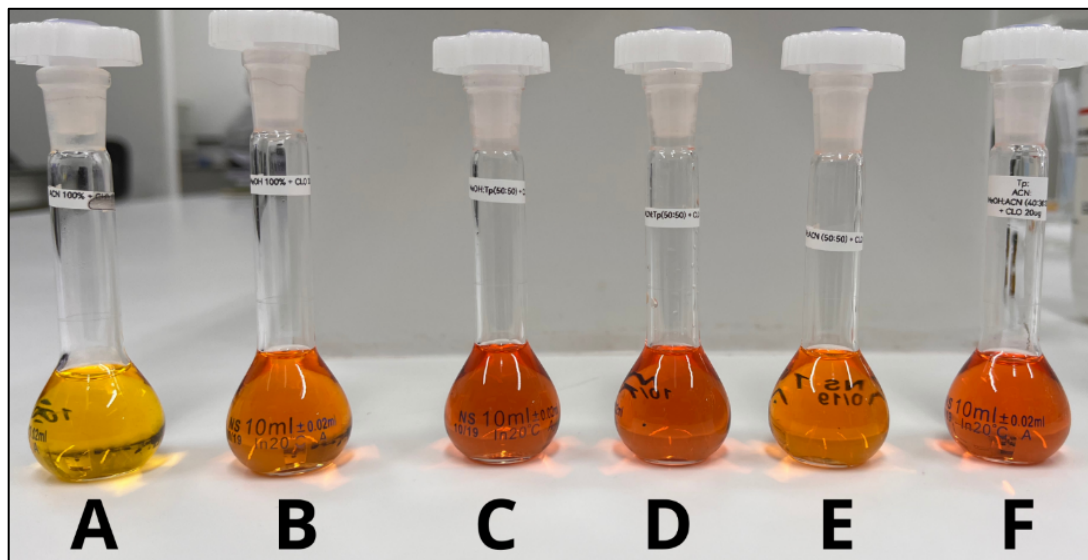
Tabela 5 – Combinações da FM para determinação do diluente.

	Combinações	(v/v)	pH com IFA
A	ACN	100	6,5
B	MeOH	100	5
C	MeOH:TP	50:50	5,5
D	ACN:TP	50:50	5,5
E	ACN:MeOH	50:50	5
F	TP:MeOH:ACN	40:30:30	4,5

Fonte: autora (2024).

Foi possível observar a variação no valor do pH que, como visto anteriormente, interfere diretamente no pKa da CLZ. Foi possível também observar a variação do pH visualmente, a partir da mudança de cor (Figura 8).

Figura 8 – Amostras das diferentes combinações do diluente com CLZ 10 µg/mL.



Legenda: A. Acetonitrila; B. MeOH; C. MeOH:TP; D. ACN:TP; E. AC:MeOH; F. TP:MeOH:ACN.
Fonte: autora (2024).

Moloko *et al.* (2012) fala sobre a suscetibilidade da CLZ sofrer mudanças na coloração em diferentes pHs, desta forma, a partir da imagem acima é possível atestar esta afirmação. A amostra A, contendo apenas ACN, apresentou uma coloração amarela, por ser um solvente orgânico com pH próximo a 7, quando a ACN é utilizada como diluente para um fármaco básico como a CLZ naturalmente se obtém um meio mais neutro/básico. As amostras B e E, contendo MeOH e MeOH:ACN, respectivamente, apresentaram um tom laranja claro, visto que, o metanol possui um pH ligeiramente mais ácido, em torno de 5,5 a 6,0, mesmo quando combinado com ACN (tabela 4). As amostras C, D e F contendo MeOH:TP, ACN:TP e TP:MeOH:ACN respectivamente, apresentam uma tonalidade laranja escuro, isso devido a combinação do solvente com o tampão formiato de amônio pH 3 que, por consequência, tende a acidificar o diluente atribuindo-os a cor ligeiramente mais intensa. As amostras foram preparadas em triplicata de 6 diferentes combinações, resultando um total de 18 amostras que foram analisadas por CLAE-DAD e os parâmetros cromatográficos. Os resultados obtidos assim como as variações

individuais e suas médias e o percentual de coeficiente de variação (% CV) através do DPR (%) das variações, são observados na Tabela 6.

A partir dos resultados obtidos nos cromatogramas, Figura 9, pode-se observar variações pontuais nos parâmetros cromatográficos. A princípio, a condição observada como mais adequada foi a A (ACN 100%) por apresentar um bom valor de assimetria do pico e uma boa resolução, no entanto, quando comparada as demais, foi a que apresentou o NPT mais insatisfatório. O NTP indica a capacidade da coluna em separar compostos em picos distintos, o baixo NTP significa que os picos são menos definidos, o que dificulta a distinção entre compostos com tempos de retenção próximos. Isso compromete a precisão e a acurácia da análise de PDs, o que resultou na eliminação da condição A. A condição B (MeOH 100%) apresentou um compilado de inadequabilidades, baixíssima resolução e assimetria de pico, sendo também desconsiderada. As condições tamponadas C (MeOH:TP), D (ACN:TP) e F (TP:MeOH:ACN), que são as mais comumente utilizadas na literatura no desenvolvimento do MIE, no entanto, dentro do presente estudo, foram as condições com maior valor de assimetria de pico. Mesmo obtendo valores médios satisfatórios na resolução e no NTP. Uma alta assimetria sugere que a separação foi comprometida, podendo ocorrer a co-eluição dos compostos que possuem um comprimento de onda próximo ao do analito. Sendo assim, as condições tamponadas também foram desconsideradas.

Tabela 6 – Combinações da FM para determinação do diluente.

Amostra	RT ¹	Área	k' ²	Fator de Cauda	Resolução (R) ³	Número de Pratos Teóricos (NTP) ⁴
A	23,41 ± 0,008%	1237861 ± 0,020%	9,46 ± 0,036%	1,48 ± 0,011%	64,229 ± 0,237%	40756 ± 0,049%
B	23,41 ± 0,002%	1185642 ± 0,057%	10,61 ± 0,349%	1,63 ± 0,018%	7,18 ± 6,218%	44805 ± 0,600%
C	23,04 ± 0,049%	1267256 ± 0,008%	10,38 ± 0,035%	1,72 ± 0,003%	42,755 ± 0,218%	45400 ± 0,162%
D	23,23 ± 0,105%	1288255 ± 0,007%	9,90 ± 0,786%	1,71 ± 0,004%	68,085 ± 0,442%	43338 ± 0,569%
E	22,96 ± 0,043%	1247178 ± 0,006%	10,47 ± 0,049%	1,61 ± 0,002%	64,968 ± 0,205%	43618 ± 0,207%
F	23,37 ± 0,002%	1302495 ± 0,016%	10,19 ± 0,001%	1,72 ± 0,005%	50,973 ± 0,948%	44851 ± 0,332%

Legenda: A. ACN; B. MeOH; C. MeOH:TP; D. ACN:TP; E. ACN:MeOH; F. TP:MeOH:ACN.

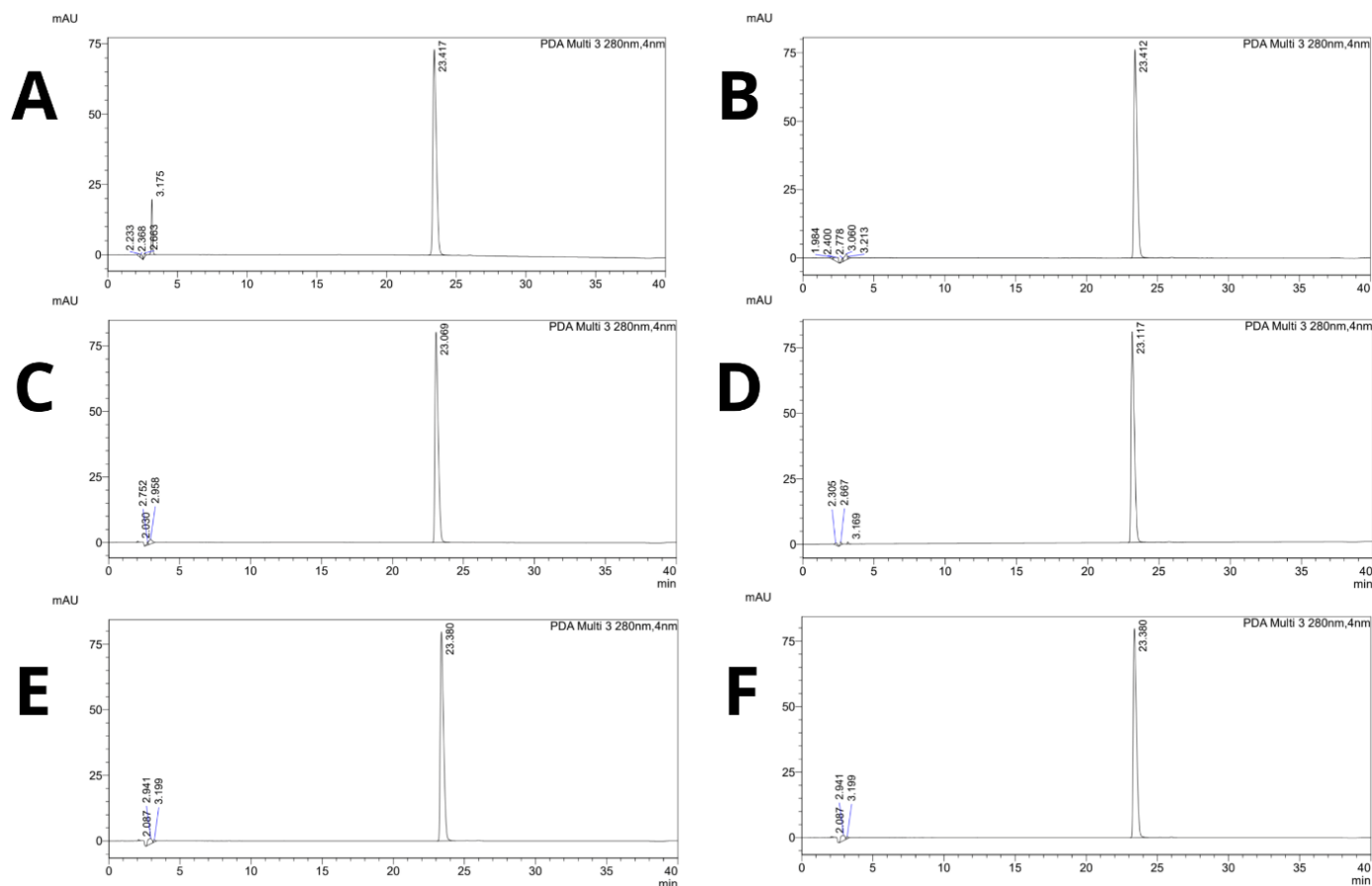
Fonte: autora (2024).

¹ RT: *Retention Time* (Tempo de retenção referente aos picos do analito);

² k': Fator de retenção. Também conhecido como fator de capacidade, é uma medida importante da retenção de um analito na coluna;

³ R: Resolução. Na CLAE o R é uma medida crítica da capacidade do sistema cromatográfico de separar dois picos adjacentes;

⁴ NTP: *Theoretical Plate Number*. Mede a eficiência da coluna. Quanto maior o valor do NTP, melhor é a eficiência da coluna em separar os componentes da amostra em picos bem definidos e distinto

Figura 9 – Cromatogramas referentes às combinações para diluente na presença do IFA da CLZ.

Legenda: A. Acetonitrila; B. MeOH; C. MeOH:TP; D. ACN:TP; E. AC:MeOH; F. TP:MeOH:ACN.

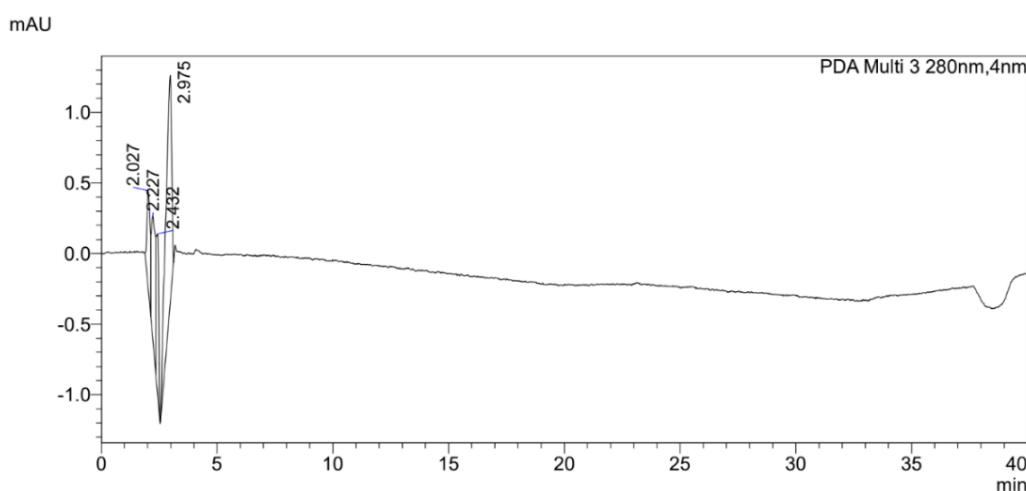
Método de eluição da clofazimina 10 µg/mL. Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

A escolha do MeOH para estar em uma das combinações dos diluentes é devido natureza da amostra degradante e ao seu poder de solvatar a CLZ. A degradação ocorre em meio aquoso e a baixa solubilidade da CLZ é um desafio para as análises. Estudos feitos por Blessy *et al.* (2014) e Ortiz *et al.* (2021) destacam alta miscibilidade do MeOH com a água e com muitos solventes orgânicos, e como isso o torna extremamente versátil. Essa miscibilidade assegura uma homogeneidade adequada da amostra, independentemente da polaridade do solvente original ou da fase aquosa em que a degradação ocorreu. Isso é particularmente relevante para a preparação de amostras de fármacos apolares como a CLZ, que podem apresentar desafios na dissolução e homogeneização em soluções predominantemente aquosas. Sendo assim, foi estabelecido uma mistura de igual volume entre ACN:MeOH 50:50

(v/v), dois solventes muito utilizados em cromatografia, nos quais a CLZ é totalmente solúvel.

Völgyi *et al.* (2007) and Box *et al.* (2007) propuseram um solvente universal constituído por metanol, 1,4-dioxano e acetonitrila misturados com água (MDM) para aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis em água. Ortiz *et al.* (2021) mostraram o poder de solvatação de misturas dos cossolventes MeOH e ACN com um bom grau de exatidão utilizando como fármaco modelo, a sulfaletazina. Na Figura 10 é possível avaliar o cromatograma com injeção apenas do diluente no método e é possível constatar a ausência de interferentes que pudessem comprometer as amostras.

Figura 10 – Cromatograma referente ao diluente ACN:MeOH 1:1 (v/v).



Fonte: autora (2024).

5.3 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Para a degradação forçada foi elaborado um planejamento experimental que avaliou a influência de diferentes fatores em uma matriz visando determinar se há uma condição mais adequada para degradação de um fármaco apolar, praticamente insolúvel, em solução. Além de investigar quais condições são mais favoráveis para formação de PDs.

5.3.1 Utilização de cossolvente

A partir de uma análise profunda das condições para ideais para submeter um fármaco a hidrólise, concluiu-se que seria necessária a utilização de cossolvente para a realização dos estudos de degradação forçada, uma vez que a CLZ apresenta

praticamente nenhuma solubilidade água. A RDC nº 53 de 2015 determina que as degradações ácida, básica e oxidativa devem ser executadas em solução aquosa. Para que ocorra a reação de clivagem ocorra, a molécula deve reagir com a água, resultando na quebra de ligações químicas e formação de PDs. No seu estudo, Quiang *et al.* (2022) fala que moléculas com hidrofobicidade tende a ser menos reativa em meios aquosos, no caso da CLZ isso pode retardar significativamente sua taxa de hidrólise.

Box *et al.* (2007) refere em seu estudo que a presença de um cossolvente ajuda a dispersar melhor moléculas com baixa solubilidade em uma solução, aumentando a área de superfície disponível para a reação de clivagem. Considerando está análise, é possível garantir que a CLZ estará suficientemente disponível para reagir com as moléculas de água. Nesse sentido, optou-se por utilizar o metanol como cossolvente, devido a boa solubilidade da CLZ nesse solvente, e por possuir alta miscibilidade com a água o que facilita a interação do fármaco com o meio, devendo ser preferencialmente utilizado nos testes de degradação hidrolíticas.

Estudos de Volgyi *et al.* (2006) e Albishri *et al.* (2022) discutem sobre qual a quantidade ideal necessária de cossolvente para a completa solubilização de uma substância, os autores trazem o valor de 20%, uma porcentagem sugerida também pelo próprio Box *et al.* (2007). Entretanto, para a garantia total da solubilização da CLZ, foram feitas análise com 20, 35 e 50% de cossovelntes, em três diferentes concentrações de CLZ, como descrito na Tabela 6 deste trabalho. Cujo objetivo foi a realização de uma investigação mais abrangente do uso de cossolvente e de suas possíveis interferências em um estudo de degradação forçada.

5.3.2 Solubilidade e Degradação Forçada

Ao desenvolvermos o planejamento experimental consideramos a diferença de solubilidade da CLZ em cada um dos pHs. Yamanouchi *et al.* (2023) mostrara que a CLZ apresentou um melhor desempenho de solubilidade em meio aquoso quando está em pH mais baixo, no entanto, ainda não totalmente satisfatório. Stadler *et al.* (2023) e Lou *et al.* (2024) falam sobre a propensão de fármacos básicos sofrerem precipitação em pHs mais altos, como por exemplo, no intestino delgado.

Foi feita uma investigação para avaliar se essas variações podem ou não exercer uma influência sobre a formação de PDs, uma vez que, quanto maior

interação com meio aquoso mais disponibilidade uma molécula terá para sofrer as reações de quebra. Desta forma, o cossolvente entra como um auxiliador na solubilidade para auxiliar na reação de degradação.

Posto isto, foram esperadas diferentes respostas do planejamento experimental para cada condição degradante. Assim, no planejamento, as soluções com a mesma concentração foram separadas em grupos das três diferentes porcentagens de solvente. Desta forma, foi possível visualizar se houve ou não a precipitação da CLZ a partir da variação da taxa de parte orgânica em meio aquoso e mudança da coloração nos pHs.

Devido à escassez e limitações de trabalhos na literatura sobre degradação da CLZ, além de sua insolubilidade em meio aquoso, o planejamento experimental foi importante na investigação da condição mais favorável para a degradação de um fármaco de natureza apolar, a fim de avaliar a influência da concentração e da presença de cossolvente na formação de PDs.

5.3.3 Degradação em meio ácido

O estudo da degradação forçada em meio ácido para CLZ foi iniciado em uma condição intermediária de 25°C, com solução de HCl 1 M em temperatura ambiente atingindo o máximo de 30°C em até 24h em uma embalagem com proteção contra a luz. O preparo das soluções foi feito conforme descrito no tópico 4.6.1 deste trabalho. É possível observar que, na menor porcentagem de cossolvente, Figura 11, as concentrações de 60 µg/mL e 100 µg/mL sofrem precipitação. A CLZ de 20 µg/mL sofre uma leve dispersão que é solubilizada após agitação.

Figura 117 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante ácida. Amostras com 20% de cossolvente MeOH. 1A. CLZ 20 µg/mL; 2A. CLZ 60 µg/mL; 3A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Na porcentagem intermediária de cossolvente, Figura 12, a concentração de 100 µg/mL sofre total precipitação e a de 60 µg/mL sofre uma leve dispersão que não se solubiliza após agitação. A CLZ de 20 µg/mL está totalmente solubilizada.

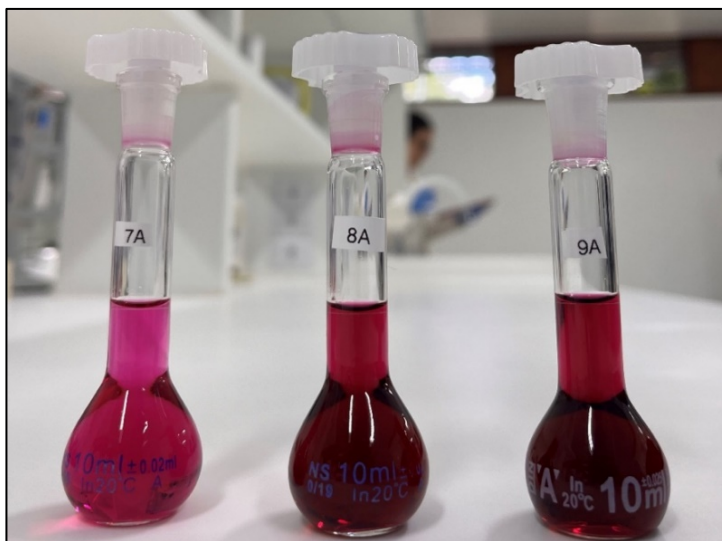
Figura 8 12 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante ácida. Amostras com 35% de cossolvente MeOH. 4A. CLZ 20 µg/mL; 5A. CLZ 60 µg/mL; 6A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Na maior porcentagem de cossolvente, Figura 13, todas as concentrações de CLZ 20 µg/mL, 60 µg/m e 100 µg/mL estão solubilizadas.

Figura 13 9 – Degradação em meio ácido. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.

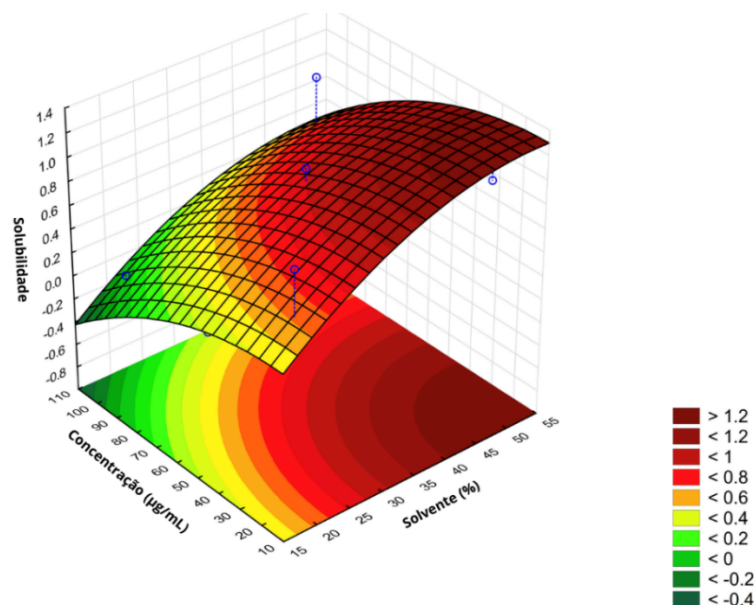


Legenda: Solução degradante ácida. Amostras com 50% de cossolvente MeOH. 7A. CLZ 20 µg/mL; 8A. CLZ 60 µg/mL; 9A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

5.3.3.1 *Análise quimiométrica do planejamento experimental para condições de degradação forçada ácida*

A Figura 14 avalia a solubilidade da CLZ em diferentes concentrações e porcentagens de solventes e, apesar de não ocorrer degradação em meio ácido, obtivemos uma resposta significativa acerca da solubilidade aparente de um fármaco apolar submetido a uma condição ácida. Inicialmente, avaliamos o efeito da variação do fator solvente sobre a solubilidade do fármaco. Os resultados indicaram que, ao aumentar a porcentagem de solvente, a solubilidade do fármaco aumentou de maneira linear para esta condição. No entanto, foi possível observar que baixa porcentagem de solvente em concentrações entre 60 e 100, levaram a formação de agregados sólidos. No gráfico é possível visualizar que o ponto máximo de solubilidade é em 50% de solvente e 20 µg/mL de concentração.

Figura 14 10 – Superfície de resposta para solubilidade da CLZ no planejamento experimental em meio ácido.

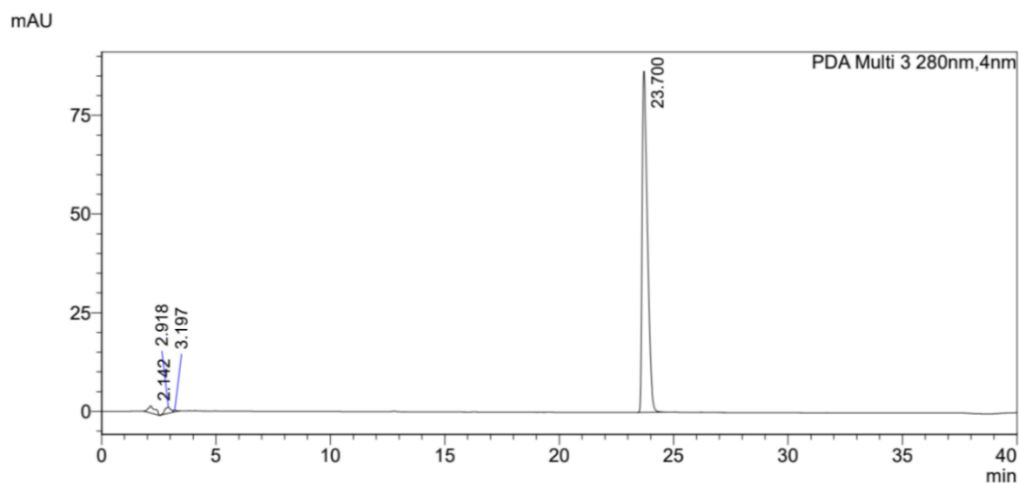


Legenda: Software STATISTICA® (data analysis software system) for Windows versão 12. Fonte autora (2024)

5.3.3.2 PDs degradação ácida

Prosseguiu-se com as análises dos cromatogramas obtidos das amostras degradadas. Amostra escolhida, Figura 15, se referente a 4A CLZ 20 µg/mL dissolvida em 35% de cossolvente, a amostra final para análise foi diluída e sua concentração ficou em 10 µg/mL. Para realizar uma varredura alterou-se o comprimento de onda, 10 nm para mais e para menos, no intuito de detectar algum possível PD. Porém, nenhum PD foi encontrado.

Figura 1511 – Cromatograma referente a degradação em meio ácido após 24h.



Legenda: Amostra final de análise CLZ 10 µg/mL em diluente ACN:MeOH. Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

Ainda sim, diferente dos resultados obtidos no nosso estudo, um trabalho publicado por Patel *et al.* (2017) traz em seus resultados a formação de um PD e relata cerca 15% de decaimento da CLZ, no entanto, o trabalho apresenta inconsistências em sua metodologia, o autor não detalha se houve neutralização nas amostras de análise nem discute a interferência do pKa da CLZ na análise, um fator crítico para um fármaco com a natureza de ionização da CLZ, o que pode gerar informações inconsistentes sobre as análises. Um trabalho publicado por Patil *et al.* (2018) traz a formação de quatro PDs em meio ácido (HCl), no entanto esses PDs estão entre os tempos de retenção 1 min. e 2.5 min, uma faixa considerada não confiável pois pode haver influência do tempo morto durante a detecção. Nenhum dos trabalhos mencionados fazem elucidação dos PDs por LC-MS.

A ausência de degradação em meio ácido no nosso trabalho pode ser justificada através de uma análise teórica da molécula de CLZ. Em um meio ácido forte, os átomos de nitrogênio e dos grupos amínicos presentes na estrutura da CLZ podem ser protonados. Essa protonação dos nitrogênios aumenta a polaridade da molécula, o que pode até elevar a solubilidade em meio aquoso, mas não necessariamente levar à degradação. Outro ponto é, a presença de anéis aromáticos que podem interagir eletronicamente com os átomos de cloro através de ressonância e efeitos indutivos. Esses anéis aromáticos proporcionam uma nuvem de elétrons e a presença de substituintes, como o cloro, pode influenciar essa distribuição eletrônica. Os efeitos da ressonância podem ajudar a estabilizar qualquer carbocátion intermediário que se forme durante a protonação ou outras reações, tornando a CLZ menos reativa, logo, menos propensa a degradação.

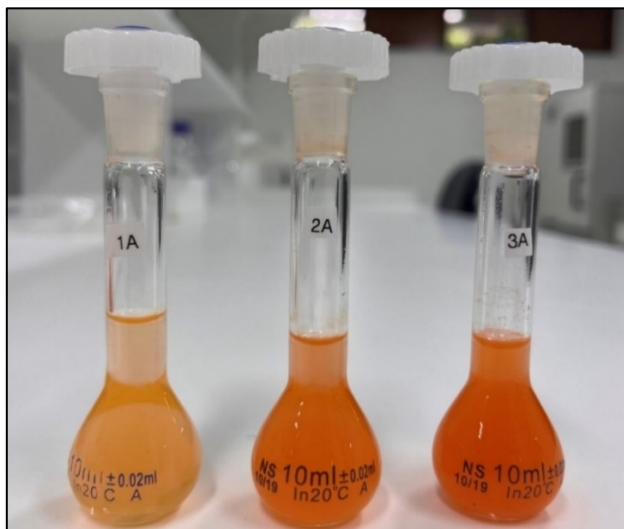
Todavia, pode existir uma limitação que decorre da possibilidade da formação de PDs com sinais muito baixos que não possuem grupos cromóforos ou que são voláteis, isso justifica a necessidade de empregar outros detectores junto ao CLAE, como o espectrômetro de massas.

5.3.4 Degradação em meio básico

O estudo da degradação forçada em meio básico para CLZ foi iniciado em uma condição intermediária de 25°C, com solução de NaOH 1 M em temperatura ambiente atingindo o máximo de 30°C em até 24h em uma embalagem com proteção contra a luz. O preparo das soluções foi feito conforme descrito no tópico 4.6.1 deste trabalho. Em meio degradante básico, é possível observar que, na menor porcentagem, Figura 16, de cossolvente que todas as concentrações apresentam uma certa turbidez, a CLZ de 20 µg/mL sofre uma leve dispersão que é levemente solubilizada após agitação. A CLZ de 60 µg/mL e 100 µg/mL sofrem precipitação.

Na porcentagem intermediária de cossolvente, Figura 17, o cenário se repete, a CLZ de 60 µg/mL e 100 µg/mL sofrem precipitação. Devido ao aumento do cossolvente, a CLZ de 20 µg/mL apresenta menos turbidez que a amostra 1A, a qual possui a mesma concentração.

Figura 1612 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante básica. Amostras com 20% de cossolvente MeOH. 1A. CLZ 20 µg/mL; 2A. CLZ 60 µg/mL; 3A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Figura 1713 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante básica. Amostras com 35% de cossolvente MeOH. 4A. CLZ 20 µg/mL; 5A. CLZ 60 µg/mL; 6A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Na maior porcentagem de cossolvente, Figura 18, as CLZ de 60 µg/mL e 100 µg/mL estão totalmente turvas. A CLZ de 20 µg/mL está parcialmente turva.

Figura 1814 – Degradação em meio básico. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.

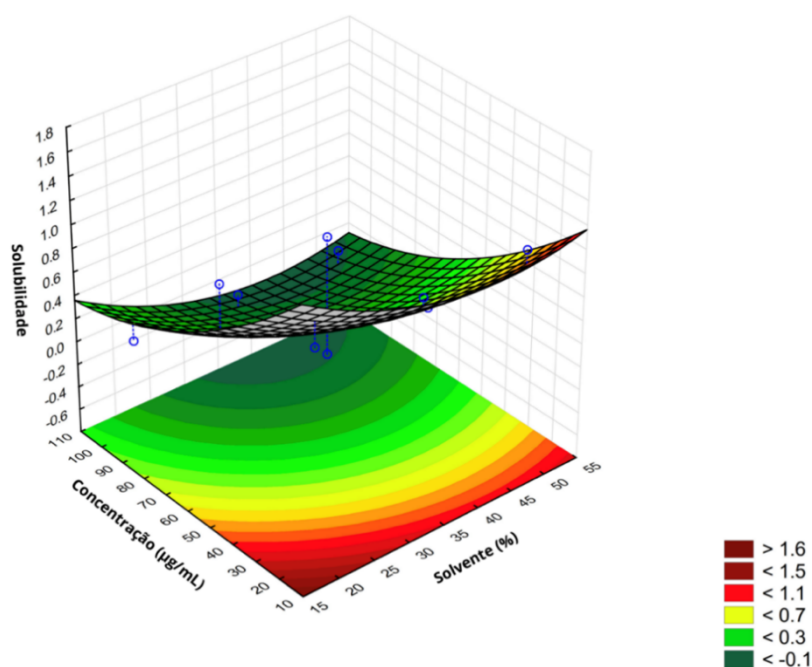


Legenda: Solução degradante básica. Amostras com 35% de cossolvente MeOH. 7A. CLZ 20 µg/mL; 8A. CLZ 60 µg/mL; 9A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

5.3.4.1 Análise quimiométrica do planejamento experimental para condições de degradação forçada básica

Em meio básico, podemos avaliar no gráfico de superfície de resposta e de contorno que, as concentrações entre 10 e aproximadamente 50 µg/mL favorecem a solubilidade da CLZ. Isso significa que o solvente não pode mais dissolver a quantidade de fármaco acima dessas concentrações, onde a solubilidade é limitada, levando à formação de cristais ou agregados sólidos. Quanto à porcentagem de solvente, valores entre 15% e 30% aumentam significativamente a solubilidade, permanecendo constante. Nas Figuras 19 e 20 podemos avaliar esta relação

Figura 1915 – Superfície de resposta para solubilidade da CLZ no PE em meio básico.

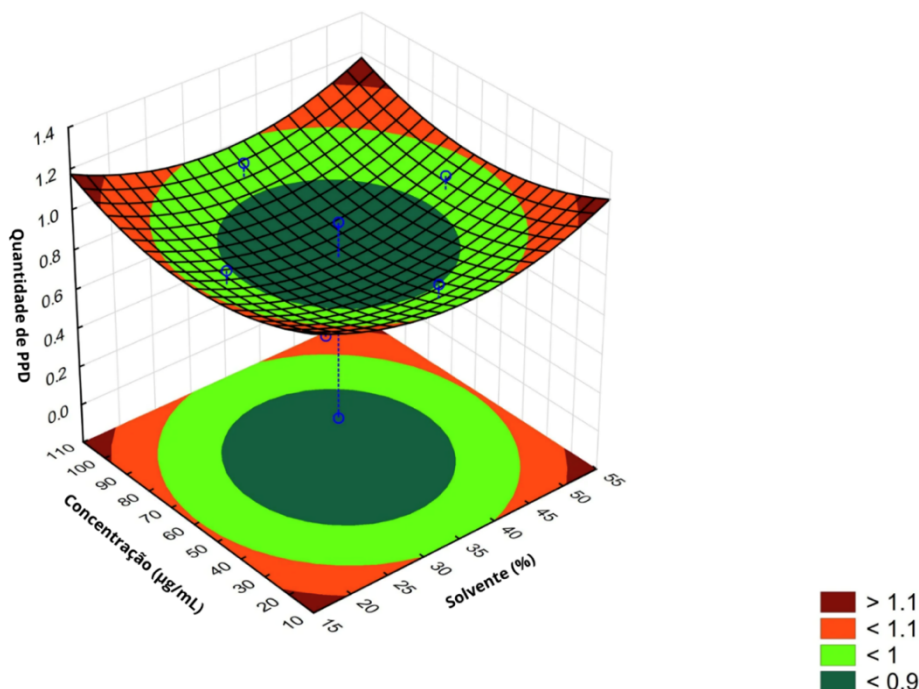


Legenda: Software STATISTICA® (*data analysis software system*) for Windows versão 12. Fonte autora (2024).

É importante ressaltar que, a degradação em meio básico ocorre por meio da oxidação favorecida em meio básico através da N-oxidação do nitrogênio tipo piridina. Ao analisarmos o gráfico de superfície de resposta e de contorno, Figura 20, ao compará-lo com gráfico de solubilidade conseguimos avaliar a formação de PDs mesmo em condições de baixa solubilidade. Barteau (2003) e Weiss et al. (2002) falam como a reatividade na superfície de partículas sólidas pode ser influenciada por fatores estruturais e químicos específicos. No contexto da CLZ, que é insolúvel em

meio básico, a superfície das partículas desempenha um papel crucial na degradação oxidativa.

Figura 20 16 – Superfície de resposta para quantidade de PD formado no PE em meio básico.



Legenda: Software STATISTICA® (*data analysis software system*) for Windows versão 12. Fonte autora (2024).

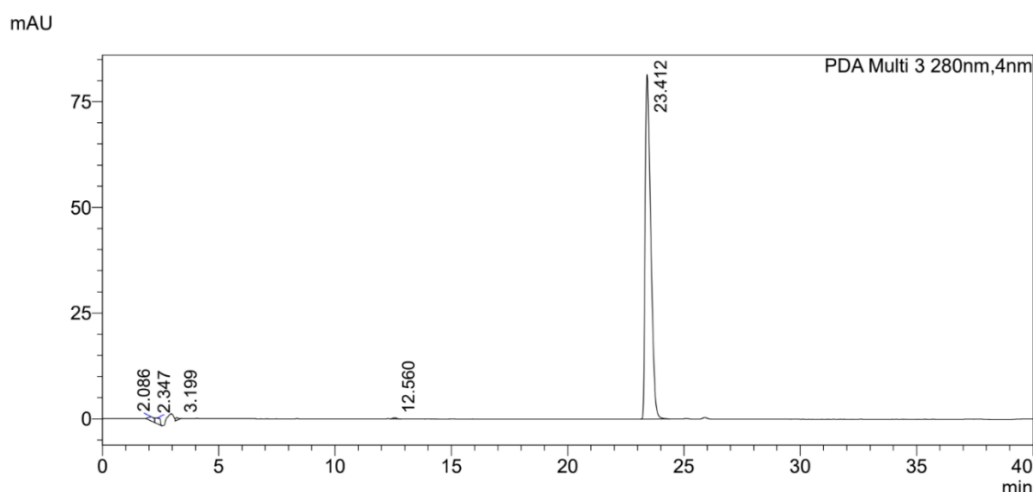
Mesmo que a clofazimina não esteja completamente dissolvida, a reação de oxidação pode ocorrer na interface sólido-líquido, onde os átomos de nitrogênio tipo piridina na superfície da clofazimina são expostos aos agentes oxidantes promovendo reações de oxidação localizadas e gerando produtos de degradação detectáveis. Neste cenário, visto no gráfico que a condição mais desfavorável para formação de PD foi entre as concentrações até 30 a 80 µg/mL e na porcentagem de solvente de 25 a 45%. Estima que nessa faixa, a CLZ não esteja nem mais bem solubilizada nem concentrada o suficiente para ter superfície de reação. Neste caso o fator crítico para formação de PD é a concentração.

5.3.4.2 PDs degradação básica

A amostra, Figura 21, em meio básico foi a 3A, referente a CLZ 100 µg/mL em 20% de cossolvente. A amostra para análise final foi diluída e sua concentração ficou em 10 µg/mL. Nesta condição a CLZ apresentou um RT = 23,412 min, com análise espectral de pureza de pico equivalente à 1,000000, indicando que não houve co-

eluição de compostos. Após a sobreposição dos cromatogramas com o branco da amostra, não foi observado a formação de picos indicativos de produtos de degradação no comprimento de leitura da CLZ (280nm). Uma degradação de cerca de 10% da CLZ foi obtida em 24 horas em NaOH 1 M, a temperatura ambiente (entre 25°C e 30°C).

Figura 2117 – Cromatograma referente a degradação em meio básico após 24h.



Legenda: Amostra final de análise CLZ 10 µg/mL em diluente ACN:MeOH. Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

Como discutido anteriormente, no tópico 3.6.1, em meio básico a CLZ tende a ser ainda menos solúvel devido à ausência de espécies ionizadas e da sua natureza hidrofóbica. E, como visto na predição *in silico*, a formação de apenas um produto de degradação, a N-oxidação dos nitrogênios do tipo piridina, pode-se atribuir a presença de nitrogênios não substituídos e aromáticos na estrutura da clofazimina. Além disto, a estabilidade dos anéis aromáticos pode contribuir para a observação de um único produto de degradação em todas as condições testadas.

Patil *et al.* (2018) também traz em seu trabalho a formação de dois PD para CLZ em degradação básica, no entanto, segue a mesma problemática de não especificar critérios da metodológicos, além disso, todos os 4 PDs tem tempos de retenção abaixo de 2 min, co-eluindo com o tempo morto. Devido a esta questão, o autor não fornece dados dos parâmetros cromatográficos dos PDs colocando em questionamento a confiabilidade dos seus resultados na formação destes produtos.

No nosso trabalho, a ausência de degradação significativa dos outros componentes da molécula reforça a resistência da CLZ em meio básico e sua limitação na formação de produtos de degradação adicionais. Os parâmetros cromatográficos estão descritos na Tabela 13.

Tabela 7 – Parâmetros cromatográficos da amostra de degradação em meio básico.

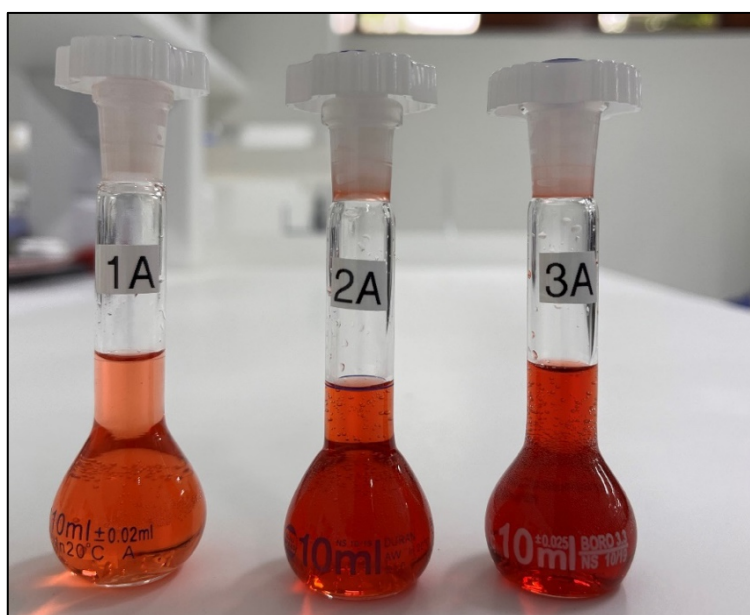
	Área	k'	Fator de Cauda	Resolução	NTP	Pureza
PD1	2631	5.023	1.129	30402	28932	0.9979
CLZ	1238285	10.227	1.505	31300	56244	1.0000

Fonte: autora (2024).

5.3.5 Degradação em meio oxidativo

O estudo da degradação forçada em meio oxidativo para CLZ IFA foi iniciado em uma condição de 25°C, com solução de H₂O₂ 3% em temperatura ambiente atingindo 30°C em até 24h em uma embalagem com proteção contra a luz. O preparo das soluções foi feito conforme descrito no tópico 4.6.1 deste trabalho. Em meio degradante oxidativo, é possível observar que, nas porcentagens baixa e intermediária, Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 18 22 – Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 20% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante oxidativa. Amostras com 20% de cossolvente MeOH. 1A. CLZ 20 µg/mL; 2A. CLZ 60 µg/mL; 3A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024)

Todas as CLZ (20, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$) apresentam uma total solubilidade aparente. É possível observar também que há apenas uma alteração na intensidade da coloração devido a mudança de concentração da CLZ, como descrito no tópico 3.6 deste trabalho. O mesmo se repete para a maior porcentagem de cossolvente, Figura 24, onde todas as concentrações de CLZ estão aparentemente solúveis.

Figura 2319 – Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 35% de cossolvente MeOH.



Legenda: Solução degradante oxidativa. Amostras com 35% de cossolvente MeOH. 4A. CLZ 20 $\mu\text{g/mL}$; 5A. CLZ 60 $\mu\text{g/mL}$; 6A. CLZ 100 $\mu\text{g/mL}$. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Figura 20 24 - Degradação em meio oxidativo. CLZ dissolvida em 50% de cossolvente MeOH.



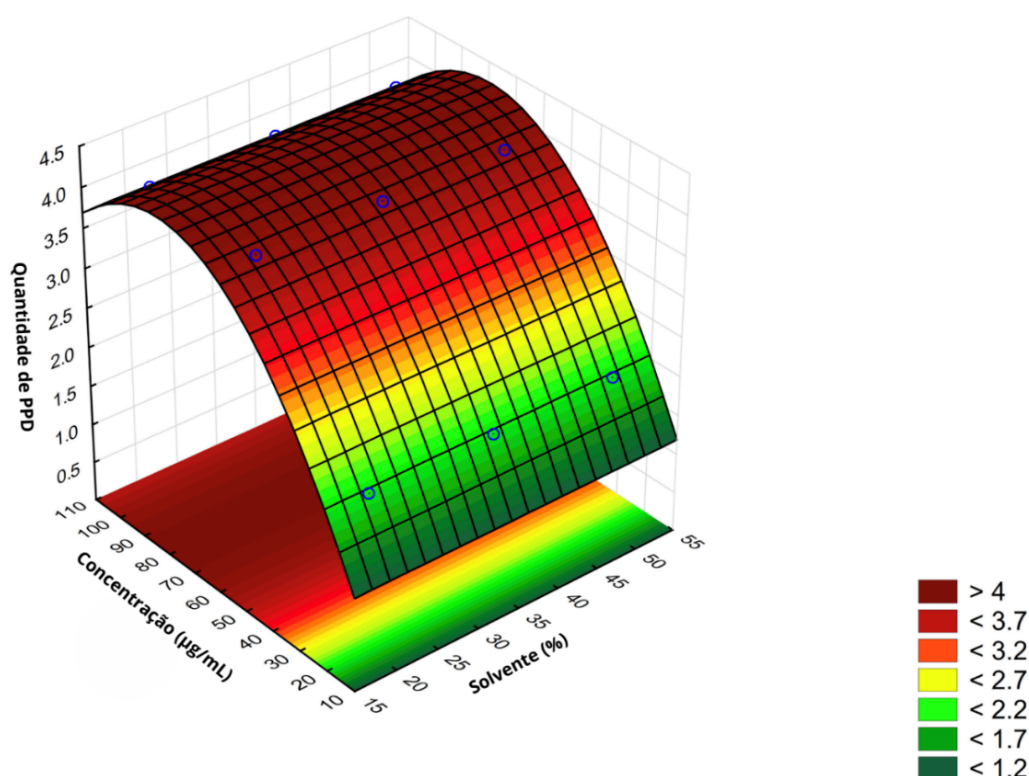
Legenda: Solução degradante oxidativa. Amostras com 50% de cossolvente MeOH. 7A. CLZ 20 µg/mL; 8A. CLZ 60 µg/mL; 9A. CLZ 100 µg/mL. Avaliação do pH e da solubilidade. Fonte: autora (2024).

Pode-se avaliar que, diferente dos meios degradantes ácido e básico, no meio oxidativo a CLZ apresenta total solubilidade em todas as proporções de solvente e em todas as concentrações de CLZ. Isso acontece porque, assim como é descrito através da predição *in silico* no tópico 5.3.1.3, em um meio oxidativo com H₂O₂ a clofazimina pode sofrer oxidações que pode, potencialmente, aumentar sua solubilidade por meio de reações de oxidação que modificam a estrutura química da clofazimina, tornando-a mais polar e, portanto, mais solúvel em água.

5.3.5.1 Análise quimiométrica do planejamento experimental para condições de degradação forçada oxidativa

Para análise em meio oxidativo não foi necessário elaborar um gráfico de solubilidade, uma vez que, a CLZ esteve solúvel em todas as amostras do planejamento, como demonstrado no tópico 5.4.5 deste trabalho. Na Figura 25 podemos avaliar a resposta do meio oxidativo na formação dos PDs.

Figura 2521 – Superfície de resposta para quantidade de PD formado no PE em meio básico.



Legenda: Software STATISTICA® (*data analysis software system*) for Windows versão 12. Fonte autora (2024).

A oxidação pode aumentar a solubilidade ao introduzir grupos mais polares, como na hidroxilação da amina secundária na estrutura da clofazimina. O aumento da solubilidade da clofazimina em meio oxidativo é um fator que pode elevar a probabilidade de formação dos quatro produtos de degradação. A maior solubilidade permite uma interação mais eficaz entre o fármaco e os agentes oxidantes, facilitando as reações químicas que levam à formação dos produtos de degradação. Na análise da formação da quantidade de PDs, podemos considerar duas situações:

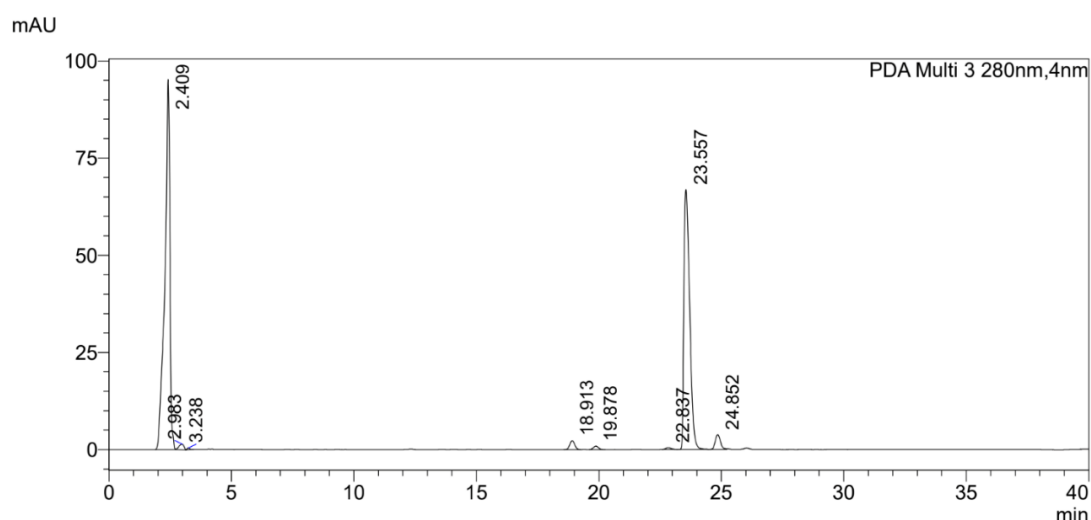
- **Menor formação de PD:** Para menores condições para formação de PDs, concentrações até 30 µg/mL são ideais. Visto que, de acordo com a legenda do gráfico, concentrações entre 10 e 30 µg/mL resultam em cerca de 2 PDs. A partir de 80 µg/mL, não há aumento significativo na formação de PD. A porcentagem de solvente não influencia a formação de PD, visto que, o meio aquoso contendo o agente oxidativo (H₂O₂ 3%) já funciona como catalisador para solubilização da CLZ. Portanto, para reduzir a quantidade de PD, ajustar as concentrações até 30 µg/mL seria recomendável.
- **Maior formação de PD:** Para maximizar a formação de PD, concentrações a partir de 30 µg/mL são mais adequadas. Segundo a legenda do gráfico, concentrações entre 30 e 80 µg/mL produzem aproximadamente 4 PDs. Acima de 80 µg/mL, a produção de PD permanece constante até atingir 100 µg/mL. O comportamento em relação à porcentagem de solvente é similar ao observado na menor formação de PD.

Desta forma, a solubilidade e a concentração da CLZ são fatores críticos para formação de PDs em meio oxidativo, sendo a concentração o principal. Visto que, o aumento de solubilidade causada pelo H₂O₂ permite que a CLZ esteja livre para interagir com o agente oxidante e, quanto maior a concentração livre disponível para essa interação, maior a probabilidade da formação de PDs.

5.3.5.2 PDs degradação oxidativa

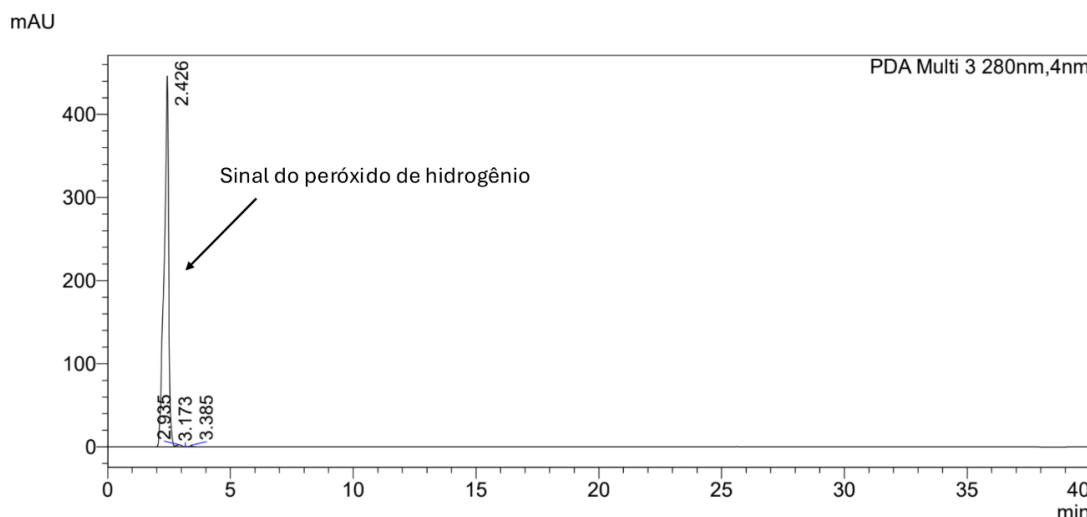
A amostra utilizada em meio oxidativo foi a 2A, referente a CLZ 60 µg/mL em 20% de cossolvente. Assim como na básica, a amostra final para análise foi diluída e sua concentração ficou em 10 µg/mL. Uma degradação de cerca de 11% da concentração inicial de CLZ foi obtida em 24 horas em H₂O₂ 3%, entre 25°C e 30°C. Nesta condição a CLZ apresentou um RT = 23,567 min; com análise espectral de pureza de pico equivalente à 1,000000, indicando que não houve co-eluição de compostos, Figura 26. No entanto, após a leitura do cromatograma da amostra foi observado um pico próximo ao tempo morto com alta absortividade. Todavia, quando sobreposto o cromatograma com o branco da amostra o pico foi identificado como sinal do H₂O₂, Figura 27.

Figura 22 26 – Cromatograma referente a degradação em meio oxidativo após 24h.



Legenda: Amostra final de análise CLZ 10 µg/mL em diluente ACN:MeOH. Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

Figura 23 27 – Cromatograma referente a amostra branco da degradação em meio oxidativo.



Legenda: Fase móvel: Tampão formiato 25 mM pH 3,0 e acetonitrila (ACN), eluição em gradiente, fluxo de 1,0 mL/min, 30 °C e volume de injeção de 20 µL. Fase estacionária: coluna do tipo C-8 Zorbax Eclipse Plus Agilent® 150 x 4,6 mm, 5 µm. Detecção: 280 nm. Fonte: autora (2024).

Dentro da limitada quantidade de trabalhos na literatura sobre estudos de degradação da CLZ, os que existem, trazem a condição degradante oxidativa como uma das mais suscetíveis a degradação. No entanto, esses trabalhos apresentam algumas inconsistências e poucos respaldos para os seus resultados.

Patil *et al.* (2018) traz apenas um PD na degradação oxidativa no período de 3 horas, porém, ele utiliza H₂O₂ a 10 %, o que é considerada uma concentração muito alta em comparação a utilizada no nosso trabalho (3 %), que gerou quatro PDs, apoiado nos resultados da análise preditiva do software especialista em PDs. Além disto, o PD identificado por Patil *et al.* (2018) tem RT em cerca de 1 min., o que pode ser questionado como sinal do peróxido de hidrogênio, como visto no nosso trabalho, já que o autor não traz cromatograma do branco da amostra para fins comparativos.

Trabalhos de Murty *et al.* (2020) e Patel *et al.* (2017) também apresentam PDs para degradação oxidativa, mas não especificam em quantidade nem apresentam os parâmetros cromatográficos para atestar a confiabilidade dos picos detectados, nem discussão a cerca das possíveis causas e rotas de degradação da CLZ.

Como visto anteriormente na predição *in silico*, a alta probabilidade de formação de produtos de degradação em meio oxidativo se deve à oxidação de grupos aromáticos e amina, resultando em compostos mais polares, logo com um menor tempo de retenção que a CLZ, como é possível observar o PD1 com RT = 18,913, o PD2 com RT = 19,878, e o PD3 com RT = 22,837. O PD4 com RT = 24,852 foi o único a apresentar um pico após a CLZ. Os parâmetros estão descritos na Tabela 14.

Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos da amostra de degradação em meio oxidativo.

	Área	k'	Fator de Cauda	Resolução	NTP	Pureza
PD1	5888	6.828	1.056	55440	43086	1.00000
PD2	4174	7.228	1.074	2571	42065	0.99994
PD3	2250	8.453	1.299	7648	55869	0.99969
CLZ	1158930	8.753	1.626	17758	46463	1.00000
PD4	10877	9.294	1.033	3228	71644	0.99999

Fonte: autora (2024)

5.3.6 Escolha da melhor amostra degradante

Todas as amostras do PE submetidas à degradação foram devidamente analisadas por CLAE-DAD, no entanto, algumas apresentaram um melhor desempenho na formação de PDs. O objetivo principal do PE foi realizar uma análise exploratória de solubilidade aparente e verificar se esta tem alguma relação com a formação ou quantidade de PDs formados, uma vez que, as agências reguladoras não possuem um critério claro sobre degradação em meio aquoso e formação de PDs para fármacos com baixa solubilidade. Isso foi avaliado no presente trabalho para o meio básico e o oxidativo e está descrito nas tabelas 11 e 12, respectivamente.

Nas tabelas é possível observar a formação de PDs mesmo em condições em que a solubilidade do fármaco não foi atingida, todavia, como vimos em discussões anteriores, a CLZ em meio aquoso não sofre degradação por hidrólise, mas sim uma degradação via oxidação da sua molécula. E, de acordo com Lu *et al.*, (2022), o processo de oxidação envolve a transferência de elétrons, geralmente promovida por agentes oxidantes, no caso do nosso trabalho os meios NaOH e H₂O₂. O autor traz que, mesmo quando há precipitação do fármaco, a oxidação pode continuar na interface entre o sólido e a solução ou dentro das partículas sólidas se houver suficiente agente oxidante presente (Bruice, 2006). Portanto, a degradação por oxidação pode prosseguir em meios com precipitação.

Este caso se aplica para nosso experimento em meio básico (NaOH), Tabela 11, onde houve formação do PD1 em condições com precipitação. O relatório gerado pelo software de análise preditiva afirma que para que ocorram as reações de oxidação é necessária uma concentração significativa do substrato não protonado

como visto no tópico 5.3.1.2, no caso do pH básico optamos pela maior concentração de CLZ na menor porcentagem de solvente para que o meio predominante fosse do agente degradante e, com isso, favorecesse a formação do PD1.

Tabela 9 – Resultado do Planejamento Experimental NaOH.

NaOH					
AMOSTRAS	Porcentagem solvente (%)	Concentração amostra (mcg/mL)	Solubilidade ¹	Formação dos PDs ¹	Quantidade de PDs
1A	20	20	1	0	0
2A	20	60	0	1	1
3A	20	100	0	1	1
4A	35	20	0	0	0
5A1	35	60	0	1	1
5A2	35	60	0	1	1
5A3	35	60	0	1	1
5A4	35	60	0	1	1
5A5	35	60	0	1	1
6A	35	100	0	1	1
7A	50	20	0	0	0
8A	50	60	0	1	1
9A	50	100	0	1	1

Notas:

¹ Nas colunas solubilidade aparente e formação de PDs 0 = Ausência e 1 = Presença.

Fonte: autora (2024)

Para nosso experimento em meio oxidativo (H₂O₂), Tabela 12, a solubilidade não foi um interferente significativo pois o fármaco esteve aparentemente solúvel em todas as condições. Observou-se apenas que, em concentrações mais baixas do fármaco, houve uma queda no número de PDs, isso pode ser justificado pela baixa superfície de reação.

Tabela 10 – Resultado Planejamento Experimental H₂O₂.

H ₂ O ₂

AMOSTRAS	Porcentagem solvente (%)	Concentração amostra (mcg/mL)	Solubilidade ¹	Formação dos PDs ¹	Quantidade de PDs
1A	20	20	1	1	2
2A	20	60	1	1	4
3A	20	100	1	1	4
4A	35	20	1	1	2
5A1	35	60	1	1	4
5A2	35	60	1	1	4
5A3	35	60	1	1	4
5A4	35	60	1	1	4
5A5	35	60	1	1	4
6A	35	100	1	1	4
7A	50	20	1	1	2
8A	50	60	1	1	4
9A	50	100	1	1	4

Notas:

¹ Nas colunas solubilidade aparente e formação de PDs: 0 = Ausência e 1 = Presença.

Fonte: autora (2024)

Todavia, é ideal que os PDs sejam caracterizados por LC-MS para fins de confirmação da estrutura química e avaliação da diferença massa carga dos componentes.

5.4 BALANÇO DE MASSAS

O cálculo do balanço de massas foi feito através da somatória das áreas e dos níveis de produtos de degradação encontrados para avaliar a proximidade deles a 100% do valor inicial da CLZ não degradada, levando em consideração a margem de precisão e exatidão analítica. Este cálculo, considerado balanço de massas absoluto, está dentro dos critérios descritos no guia do ICH Q1A e do Guia Nº 04/2015 (International Conference on Harmonisation, 2003; Agência Nacional De Vigilância Sanitária, ANVISA, 2015). O cálculo segue a seguinte equação:

CLZ Controle

AΣ PDs + CLZ_D

—

—

100%

x

>

AΣ PDs + CLO_D*100

CLZ Controle

Adaptação guia Nº 04/2015 (ANVISA). Fonte: autora (2024)

Nas Tabelas 15 e 16 é possível observar os resultados obtidos com as diferentes condições de degradação no tempo de 24 horas, os principais produtos de degradação encontrados, o somatório dos produtos formados e balanço de massas. Foram injetadas amostras sem degradação, as amostras controles de CLZ 10 µg/mL, como referência de comparação para aquelas que foram degradadas, estas foram utilizadas para fins de cálculo da queda da CLZ e na formação dos PDs.

Tabela 11 – Balanço de massa da condição básica.

Básica	
Descrição	Valor
Área da CLZ	1375872 ±
Área da CLZ Degradada (24 horas)	1238285
Área do PD1	2631
Σ PDs + CLZ Deg.	1240916
Degradação (%) ¹	10%
Teor da CLZ remanescente (%) ²	90 %
Balanço de Massa (%) ³	90,19 %

Notas:

FARIAS-FERREIRA, M. M. B. Estudo da Degradação Forçada para Fármacos Apolares: O Caso da Clofazimina, 2024.

¹ Degradação do fármaco: (Amostra controle – Amostra condição estressada);

² Teor da CLZ remanescente: (Valor da CLZ após degradação);

³ Balanço de Massa (%): 100% (Σ produtos de degradação + CLZ degradada).

Fonte: autora (2024).

Tabela 12 – Balanço de massa da condição oxidativa.

Oxidativa	
Descrição	Valor
Área da CLZ	1312672 $\pm$
Área da CLZ Degradada (24 horas)	1158930
Área PD1	5888
Área PD2	4174
Área PD3	2250
Área PD4	10877
Σ produtos de degradação + CLZ Deg.	1205308
Degradação (%) ¹	11,71 %
Teor da CLZ remanescente (%) ²	88,29 %
Balanço de Massa (%) ³	91,81%

Notas:

¹ Degradação do fármaco: (Amostra controle – Amostra condição estressada);

² Teor da CLZ remanescente: (Valor da CLZ após degradação);

³ Balanço de Massa (%): 100% (Σ produtos de degradação + CLZ degradada).

Fonte: autora (2024).

O percentual das degradações está em conformidade com as diretrizes, que recomendam uma degradação em nível adequado para a avaliação da formação de PDs. Isso deve ser inferior a um nível que causaria degradação excessiva e completa do IFA. A referência adotada é uma faixa de degradação entre 10% e 30% do teor inicial de um ou mais analitos avaliados (Huynh-Ba & Dong, 2022).

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Previamente ao início da validação foi feito o teste de adequação do sistema cromatográfico foi realizado através da injeção de seis injeções de uma solução padrão a 10 $\mu\text{g/mL}$. Determinou-se a % RSD da área do pico e tempo de retenção

(RT) foram determinados foram considerados aceitáveis abaixo de 2%. Os resultados foram expressos em termos de Rt, Tf, NTPs e fator de capacidade (k'), Tabela 7. Os critérios de aceitação para Tf inferior a 2,0 e pratos teóricas superiores a superiores a 2000 foram mantidos.

Tabela 13 – Parâmetros de System Suitability.

Amostra	Rt	Tf	NTPs	k'
CLZ 10 μ g	23,195 $\pm$ 0,150	1,598 $\pm$ 0,095	41,025 $\pm$ 0,416	10,831 $\pm$ 2,212

Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

5.3.1 Seletividade

A seletividade foi determinada por análise e comparação dos dados cromatográficos (tempo de retenção e pureza de pico) e não visualização de co-eluições da CLZ e seus PDs obtido por degradação oxidativa (Tabela 8).

Tabela 14 – Parâmetros de seletividade avaliados.

	RT	Pureza de pico
CLZ A1	23.496 $\pm$ 0,150	1,0000
CLZ A2	23.502 $\pm$ 0,148	1,0000
CLZ A3	23.526 $\pm$ 0,151	1,0000

Fonte: Resultados experimentais. Autora (2024)

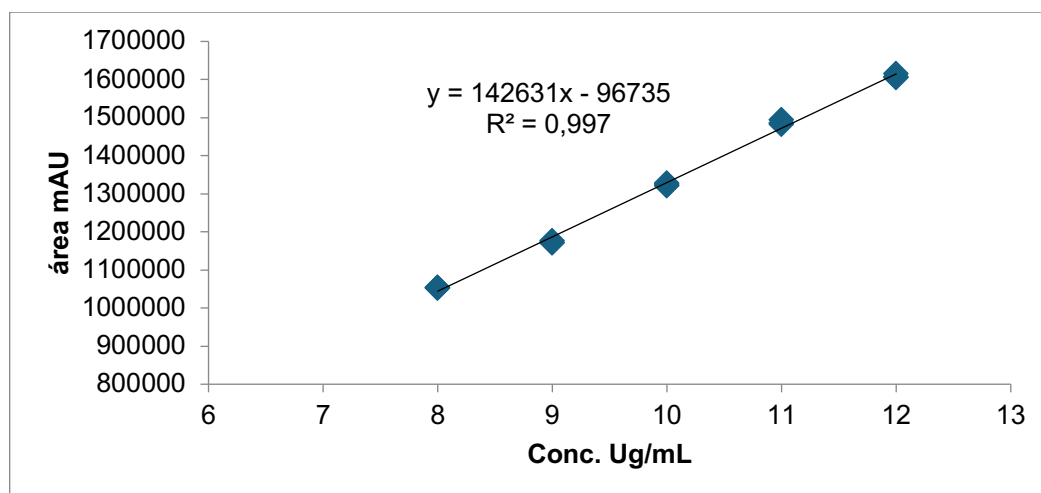
5.3.2 Linearidade

Neste trabalho, para construir a curva de calibração, a área do pico foi a resposta analítica utilizada em função da concentração do analito. Foi observado o coeficiente de correlação de Pearson (r) de 0,998, que representa o grau de associação linear entre as variáveis, mostrando uma correlação positiva e forte entre as variáveis. Quanto maior o valor de r , mais forte é a correlação entre as duas variáveis e mais realista é o modelo (equação) proposto (BRASIL, 2017b).

O coeficiente de determinação, conhecido como r^2 , é o quadrado do coeficiente de correlação e expressa a proporção da variância na variável dependente (y) que é explicada pela variável independente (x). O valor mínimo aceito para r^2 é de 0,990, conforme disposto no § 3º do art. 27 da RDC 166/2017 (BRASIL, 2017a). Quanto mais

próximo de 1,0, menor a incerteza dos coeficientes angulares e lineares obtidos pelas curvas dos compostos, ou seja, mais próximos os resultados são da realidade. O gráfico gerado para CLZ, bem como seus valor de r , apresentado na Figura 28.

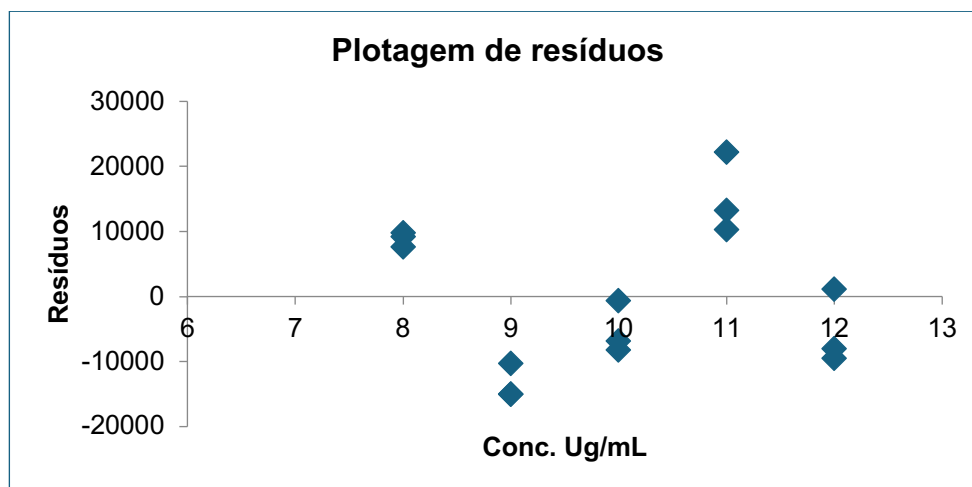
Figura 24 28 – Gráfico da regressão linear.



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

Através da reta obtida, os pontos testados podem ser observados, confirmando assim a área do pico do cromatograma proporcionalmente crescente à medida que a concentração CLZ é aumentada. O coeficiente de correlação foi maior que 0,99 como está descrito na RDC Nº 166/2017, com DPR (desvio padrão relativo) menor que 5 % para todos os pontos.

O r^2 não pode determinar se as estimativas e predições dos coeficientes são tendenciosas, e por isso é necessário avaliar os gráficos de resíduos. Resíduo é a diferença entre o valor encontrado de y e o valor estimado pelo modelo (equação) em um determinado ponto, $(y_i - \hat{y})$. O resíduo quantifica a distância entre o valor real e o estimado. Na Figura 29, é ilustrado o gráfico de resíduos, mostrando distribuição aleatória dos mesmos, sem nenhum *outliers* (valores aberrantes). Os valores calculados dos resíduos estão contidos no Apêndice 1.

Figura 29 25 – Gráfico plotagem de resíduos.

Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

A análise das variâncias mostrou que os dados são homocedásticos ($H_0 = V$, se $C_{calc} < C_{crit}$), logo a equação da reta é determinada pelo Método dos Mínimos quadrados ordinários (MMQO), sem a necessidade de fazer ponderação. O teste F para significância global comprovou que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear $F_{calculado} \geq F_{(alfa, 1, n-2)}$. Todos os testes estatísticos bem como os valores obtidos para cada etapa da validação podem ser encontrados no Apêndice 1.

5.3.3 Precisão e Exatidão

O parâmetro seguinte analisado foi a precisão, tanto a intra-dia (repetibilidade), quanto a inter-dia (precisão intermediária), como descrito no item 4.8.3 da metodologia. Conforme descrito na RDC 166/2017, o valor máximo aceitável de desvio padrão relativo para repetibilidade e precisão intermediária deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (BRASIL, 2017a). Neste trabalho, a precisão foi realizada em três níveis de concentração (média, alta e baixa) no mesmo dia (repetibilidade) e em três dias diferentes com analistas diferentes (precisão intermediária). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR) e apresentou uma variação adequada para o método dentro do estabelecido pela RDC Nº 166/2017, Tabela 9.

A exatidão realizada para o IFA foi a exatidão interna do método, calculando os valores calculados em relação aos teóricos. Nesse caso, utilizados três níveis de

concentração diferentes (baixa, média e alta), como mostrado na Tabela 9 (Assim com os valores de Limite de Detecção e Limite de Quantificação). Os valores detalhados e os cálculos obtidos para cada etapa da validação podem ser encontrados no Apêndice 1.

Tabela 15 – Dados da validação.

Linearidade							
Equação da Regressão				Coeficiente de Relação			
y = 142631x - 96735				0,998			
Precisão							
Intermediária ^b				Repetibilidade ^a			
DPR (%)	80 %	100 %	120 %	DPR (%)	80 %	100 %	120 %
	0,435	0,197	0,601		0,767	0,133	0,032
Exatidão							
80 %		100 %		120 %			
0,0964		0,2825		0,3383			
LOD				LOQ			
0,8194 µg/mL				2,4831µg/mL			

Nota: ^a DPR da média das amostras analisadas no mesmo dia (n=3); ^b DPR da média das amostras analisadas em 3 dias diferentes (n=3). Fonte: autora (Resultados experimentais) (2024).

5.3.4 Limite de Detecção (LoD) e Limite de Quantificação (LoQ)

A menor concentração em que CLZ pode ser detectada e quantificada de forma aceitável foi estimada através do cálculo de desvio padrão do intercepto com o eixo Y das três curvas, conforme (BRASIL, 2017). Foram utilizados os valores de δ (desvio padrão) do intercepto, representado por a na equação de regressão linear, de três curvas de calibração e IC (representado por b na equação de regressão linear). Os dados de LOD e LOQ obtidos estão descritos na tabela 9.

5.3.5 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada por injeções em triplicata da CLZ 10µg com pequenas variações de fluxo de fase móvel e temperatura do forno da coluna. Apesar de haver uma pequena variação de tempo de retenção, não houve alteração dos parâmetros da adequabilidade, como é possível avaliar na Tabela 10.

Tabela 16 – Parâmetros de robustez avaliados.

Condição	Rt	Tf	NTPs	k'
----------	----	----	------	----

0,9 mL/min	25,075 ± 0,039	1,606 ± 0,329	44,441 ± 0,302	10,465 ± 0,232
1,1 mL/min	23,440 ± 0,013	1,589 ± 0,347	41,560 ± 0,528	11,260 ± 0,248
29°C	23,353 ± 0,466	1,602 ± 0,312	43,701 ± 0,106	10,964 ± 0,361
31°C	23,464 ± 0,063	1,590 ± 0,400	43,592 ± 0,398	10,897 ± 0,453

Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

Apesar de haver variação do RT, não houve alteração dos parâmetros de *system suitability* (quadro 6). As alterações de RT causadas pela mudança de temperatura são esperadas devido a essa variável interferir na viscosidade da fase móvel e na solubilidade dos compostos (LANÇAS, 2009).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O MIE desenvolvido para estudo de degradação da CLZ mostrou-se seletivo, linear, preciso e robusto para avaliação dos PDs. A aplicação de ferramentas quimiométricas mediante o uso do planejamento experimental e sua avaliação possibilitou uma abordagem exploratória mais integrada e abrangente das condições degradantes, fornecendo junto ao software de análise preditiva, maior respaldo da compreensão das rotas de degradação da CLZ.

Foi avaliado que, no caso do estudo de degradação forçada da CLZ, a solubilidade não interferiu significativamente na formação de PDs, uma vez que, os produtos gerados na análise preditiva foram supostamente visualizados por CLAE-DAD, pelo menos, em quantidade de PDs formados, uma vez que ainda não foi possível confirmar sua identidade por CLAE-EM. Ademais, foi possível estabelecer as melhores condições para conduzir os ensaios em solução, garantindo total solubilidade do fármaco para obtenção de um balanço de massas confiável.

A análise preditiva, por meio do software Zeneth, sugere que a CLZ é estável a hidrólise, tanto em meio básico quanto em meio ácido, sofrendo degradação por via oxidativa da sua molécula em solução, visto sua predisposição a auto-oxidação. O próximo passo será a elucidação das estruturas por CLAE-EM para confirmação da identidade dos PDs, que está em andamento.

Portanto, com este trabalho foi possível ampliar o conhecimento acerca da estabilidade da CLZ, especialmente, em solução, além do desenvolvimento e validação de um MIE que poderá ser utilizado nos estudos de i. degradação forçada e ii. estabilidade de formas farmacêuticas que virão a ser desenvolvidas com esse fármaco.

REFERÊNCIAS

AHMED, H. *et al.*, Simultaneous analysis of chlorzoxazone, diclofenac sodium and tramadol hydrochloride in presence of three potential impurities using validated HPLC-DAD and HPTLC methods, **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104505, 2020.

ALBISHRI, Abdulkarim *et al.* Determination of the aqueous pKa of very insoluble drugs by capillary electrophoresis: Internal standards for methanol-water extrapolation. *Journal of Chromatography A*, v. 1665, p. 462795, 2022.

ARDILA, J. A. *et al.* Design of experiments applied to stress testing of pharmaceutical products: A case study of Albendazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 165, p. 105939, 2021.

BAERTSCHI, S. *et al.* Assessing mass balance in pharmaceutical drug products: New insights into an old topic. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 126-136, 2013.

BARBOSA, F. S. *et al.* Stability study of doripenem antibiotic applying LC-ESI-Q-TOF method and in silico prediction: An analytical investigation focused on degradation products. **Microchemical Journal**, v. 166, p. 106230, 2021.

BARRY, V., BELTON, J., CONALTY, M. *et al.* A New Series of Phenazines (Rimino-Compounds) With High Antituberculosis Activity. **Nature** n.179, p.1013–1015, 1957.

BARTEAU *et al.* Surface chemistry and catalysis on well-defined oxide surfaces: nanoscale design bases for single-site heterogeneous catalysts, *Journal of Catalysis*, v. 216, n 1–2, p. 236-245, 2003.

BLESSY, M. *et al.* Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review, **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Hanseníase: Boletim Epidemiológico, jan./2023. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hansenia-se-2023_internet_completo.pdf Acesso em: 02 jun. 2024.

BRASIL. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, de 8 de dezembro de 2015.

BRASIL. **Resolução - RE nº 166, 24 de julho de 2017**: validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Diário Oficial da União nº 166, 25 de julho de 2017.

BRASIL. **Guia nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017**. Guia para tratamento estatístico da Validação analítica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2017.

BRUICE, Paula Yurkanis. Química orgânica, 4ª edição, volume I / São Paulo: Pearson Prentice Hall, p. 33-50. ISBN 85-7605-004-8, 2006.

CHION, B. et al. Key Factors in Sample Diluent Selection for HPLC Assays of Active Pharmaceutical Ingredients. *LCGC North America*, v.23 n. 7, p.682–686.

BRASIL. **Resolução - RE nº 318, 6 de novembro de 2019: Critérios para a realização dos estudos de estabilidade. Diário Oficial da União**, Diário Oficial da União nº 216, de 7 de novembro de 2019.

BROWNE, S G, and L M HOGERZEIL. B 663 in the treatment of leprosy. Preliminary report of a pilot trial. **Leprosy review** v. 33, p. 6-10, 1962.

BOX et al. Physicochemical Properties of a New Multicomponent Cosolvent System for the pKa Determination of Poorly Soluble Pharmaceutical Compounds. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p. 1538-1553, 2007.

BUSCHMANN, H. et al. The quality of drugs and drug products – Always guaranteed?. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 239, p. 115880, 2024.

CAITRIONA M. et al. Clofazimine. **Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Academic Press**, v. 21, p. 75-108, 1992.

COUTO, A. R. et al. Definition of medicine shelf-life based on the assessment of the total risk of false conformity decisions due to measurement uncertainty – A multiparameter approach. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 229, p. 104649, 2022.

CURI-BORDA, C. K et al. Model for measuring light stability of photolabile substances in powder beds using spray dried bixin microcapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, p. 127131, 2021.

DOHODA, D. et al. Spectrophotometric pKa determination of ionizable pharmaceuticals: Resolution of molecules with weak pH-dependent spectral shift. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 88-96, 2015.

FLORENCE A. T.; ATTWOOD, D. Princípios Físico-químicos em Farmácia. 2a ed. São Paulo: Pharmabooks, p.126-130, 2011.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, O. et al. Drug Stability: ICH versus Accelerated Predictive Stability Studies. **Pharmaceutics**, vol. 14,11, p. 2324. 2022

HEMINGWAY, R. et al. In Silico Prediction of Pharmaceutical Degradation Pathways: A Benchmarking Study Using the Software Program Zeneth. **Organic Process Research & Development**, v. 28, n. 3, p. 674-692, 2024.

HIDALGO, M. J.; POZZI, M. T.; FURLONG, O. J.; MARCHEVSKY, E. J.; POLLERANO, R. G. Classification of organic olives based on chemometric analysis of elemental data. **Microchemical Journal**, v. 142, n. 1, p. 30-35, 2018.

HUYNH-BA, K.; DONG, M. W. Stability Studies and Testing of Pharmaceuticals: An Overview. **LCGC North America**, v. 38, n. 6, p. 325–336, 2020.

IBRAHIM, Fawzia. Asmaa Kamal El-Deen. Shimizu, Kuniyoshi. Comparative study of two different chromatographic approaches for quantitation of hydrocortisone acetate and pramoxine hydrochloride in presence of their impurities. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.26, n.3, p. 1160-1170, 2018.

ICH. *Estabilidade das Diretrizes Tripartidas Harmonizadas da ICH*. ICH; Q1A(R2): Testes de estabilidade de novos medicamentos e produtos, p. 1–18, 2003.

ICH. *Estabilidade das Diretrizes Tripartidas Harmonizadas da ICH*. ICH; Q3A (R2): Impurezas em novas substâncias medicamentosas, p. 1-15, 2006.

JAIN, D. *et al.* Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 86, p. 11-35, 2023.

KESWANI, Rahul K. *et al.* Repositioning Clofazimine as a Macrophage-Targeting Photoacoustic Contrast Agent. **Scientific reports** v. 6, p 23528, 2016.

KIN Y TAM, *et al.* Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. **Analytica Chimica Acta**, v. 434, n. 1, p. 157-167, 2001.

KRAIT, S. *et al.* HPLC-MS identification of acid degradation products of dolutegravir. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 197, p. 113954, 2021.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*. 1ª Edição. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LI, S.; CHAN JYW, Y. L. *et al.* Complexation of clofazimine by macrocyclic cucurbituril reduced its cardiotoxicity without affecting the antimycobacterial efficacy. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.14, n.31, p.7563–7569, 2016.

LIN, Jinsheng *et al.* Investigation of an artificial solution degradant of linagliptin: An undesired linagliptin urea derivative generates in sample preparation of linagliptin tablet treated by sonication in acetonitrile containing diluent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 210, p. 114540, 2022.

LOU, *et al.* In vivo deposition of poorly soluble drugs, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 211, p. 115358, 2024.

LU *et al.* Single-electron transfer oxidation-induced C–H bond functionalization via photo-/electrochemistry. **Trends in Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 179-190, 2022.

MARQUES, S. M. *et al.* Analytical ‘Quality-by-Design’ paradigm in development of a RP-HPLC method for the estimation of cilnidipine in nanoformulations: Forced degradation studies and mathematical modelling of in-vitro release studies. **Microchemical Journal**, v. 193, p. 109124, 2023.

MCMULLEN, J. P. *et al.* Brian M. Integrating Functional Principal Component Analysis with Data-Rich Experimentation for Enhanced Drug Substance Development. **Organic Process Research & Development**, v. 28, n. 3, p. 719-728, 2024.

MENDES, T. C. *et al.* Identification and Characterization of Rotigotine Degradation Products by HPLC Coupled DAD and CAD Detectors and HRMS Through Q-Orbitrap and Electrospray Ionization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.24, p. 3549, 2024.

MEREY, H. A. *et al.* Green monitoring of bromhexine oxidative degradation kinetics. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104378, 2020.

MIRNEJAD R, *et al.* Clofazimine: A useful antibiotic for drugresistant tuberculosis. **Biomedical Pharmacotherapy**. 105, 1353-1359, 2018.

MURTY *et al.* Development And Validation of a LC-MS Compatible Method for Quantification of Degradation Impurities of Clofazimine Using UHPLC. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 16, n. 7, p. 856 – 866, 2020.

MOLOKO C. *et al.* Clofazimine: status atual e perspectivas futuras. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 290–298, 2012.

NEVES, C. F. C.; SCHVARTZMANN, M. M. A. M., J., E. Variables search technique applied to gas separation. **Química Nova**. v.25, n 2, p. 327-329, 2002.

ORTIZ, Claudia Patricia *et al.* Solubility of Sulfamethazine in the Binary Mixture of Acetonitrile + Methanol from 278.15 to 318.15 K: Measurement, Dissolution Thermodynamics, Preferential Solvation, and Correlation. **Molecules**, vol. 26,24 p.7588, 2021.

PASQUALOTO, K. F.M. *et al.* A study of physicochemical and biopharmaceutical properties of Amoxicillin tablets using full factorial design and PCA biplot. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, n. 1–2, p. 216-220, 2007.

PATEL, H.A. *et al.* Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method For Estimation of Clofazimine in Soft Gelatine Capsule. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v.8, n. 1, p. 32-38, 2017.

PATIL, P. N., Deshpande, A. S., & Deshpande, S. Chromatographic Method Development and Validation for Determination of Active Pharmaceutical Ingredients. **Journal of Chromatographic Science**, v.56, n.3, 214-221, 2018.

PLOEMACHER, T. *et al.* Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 2020.

PRANKERD, R. J. Critical Compilation of pKa Values for Pharmaceutical Substances. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, Academic Press, v. 33, p. 1-33, 2007.

QIANG, Sun. "The Hydrophobic Effects: Our Current Understanding." **Molecules** v. 27, n.20, p. 7009, 2022.

QUIGLEY, J. M. *et al.* The effect of ionization on the partitioning of clofazimine in the 2,2,4-trimethylpentane—water system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, n. 2, p. 155-159, 1989.

RAO, B. V. *et al.* a Review on Stability Indicating Hplc Method Development. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences**, v. 4, n. 08, p. 405–423, 2015.

RUTA, J. *et al.* A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 52, p. 8230-8240, 2010.

SCHOU-PEDERSEN, A. M. V. *et al.* Evaluation of microwave oven heating for prediction of drug–excipient compatibilities and accelerated stability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 485, n.1–2, p. 97-107, 2015.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B.; TEKADE, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 328–344, 2018.

SHARMA, M. K.; MURUGESAN, M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. **Journal of Chromatographic Separation Techniques**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2017.

SINGH, S. *et al.* Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 71-88, 2013.

SKIBIŃSKI, Robert *et al.* Jakub Characterization of forced degradation products of clozapine by LC-DAD/ESI-Q-TOF. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 272-280, 2016.

SOUSA, M. L *et al.* A new salt of clofazimine to improve leprosy treatment. **Journal of Molecular Structure**, v. 1214, p. 128226, 2020.

SOUZA, C. *et al.* Leprosy in Brazil in the 21st century: analysis of epidemiological and operational indicators using inflection point regression. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.95, n.6, p.743-747, 2020.

STADLER JAM, Maartens G, Meintjes G, Wasserman S. Clofazimine for the treatment of tuberculosis. **Front Pharmacol**, v.2 n. 14 p.1100488, 2023.

SVERSUT, R. *et al.* Forced degradation behavior of two-drug combinations: Isolation and characterization of major degradation products by LC-MS. **Microchemical Journal**, v. 150, n. 104074, 2019.

SVETIČ, S. *et al.* Multivariate process analytical technology tools for fluidized bed granulation and drying analysis: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 92, p. 105201, 2024.

TANTAWY, M. *et al.* A novel HPLC-DAD method for simultaneous determination of alfuzosin and solifenacin along with their official impurities induced *via* a stress stability study; investigation of their degradation kinetics. **Analytical Methods**, v.12, n. 26, p. 368-3375, 2020.

TØNNESEN, Hanne Hjorth. Formulation and stability testing of photolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.225, n1-2, p. 1-14, 2001.

TRÄFF, A. *et al.* The Degradation Map Process – A Tool for Obtaining a Lean Stability Strategy in Drug Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, n. 7, p.1918-1925, 2022.

VENKATA, M. R. *et al.* Antimycobacterial activities of riminophenazines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, n. 5, p. 615–623, 1999.

VOLGYI *et al.* Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. **Analytica Chimica Acta**, v. 583, n. 2, p. 418-428, 2007.

WANG, J. *et al.* Scientific Considerations for Stability Studies of Drug Substances Supporting Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **The AAPS journal**, v. 24, p.5, 2022.

WANG, Hai-Peng *et al.* Recent advances of chemometric calibration methods in modern spectroscopy: Algorithms, strategy, and related issues. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 153, p. 116648, 2022.

WEISS *et al.* Surface chemistry and catalysis on well-defined epitaxial iron-oxide layers. *Progress in Surface Science*, v. 70, n. 1–3, p. 1-151, 2002.

XU, J.; KOVAL, A.; KATANAEV, V. L. Clofazimine: A journey of a drug. **Biomedicine & Pharmacotherapy Journal**, v.167, p.115539, 2023.

YAMANOUCHI, *et al.* Improvement and characterization of oral absorption behavior of clofazimine by SNEDDS: Quantitative evaluation of extensive lymphatic transport. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 187, p. 141-155, 2023.

YOUZHONG, L. *et al.* Mass spectrometry-based structure elucidation of small molecule impurities and degradation products in pharmaceutical development. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 121, n115686, 2019.

ZELESKY, T. *et al.* Pharmaceutical Forced Degradation (Stress Testing) Endpoints: A Scientific Rationale and Industry Perspective. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, n. 12, p. 2948-2964, 2023.

ZHONG, X. *et al.* Forced degradation studies of elagolix sodium with the implementation of high resolution LC-UV-PDA-MSn (n = 1,2,3...) and NMR structural elucidation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 224, p. 115198, 2023.

APÊNDICE

LINEARIDADE

	80%	90%	100%	110%	120%
C1	1054146	1171967	1322726	1485410	1616022
C2	1051995	1176625	1321324	1482497	1606869
C3	1053476	1171967	1328898	1494443	1605299
Média	1053205,7	1173519,7	1324316,0	1487450,0	1609396,7
Desvio P	1100,7	2689,3	4029,6	6228,8	5791,2
RSD (%)	0,105	0,229	0,304	0,419	0,360

	8 ug/mL	9 ug/mL	10 ug/mL	11 mg/mL	12 ug/mL
C1	1054146	1171967	1322726	1485410	1616022
C2	1051995	1176625	1321324	1482497	1606869
C3	1053476	1171967	1328898	1494443	1605299
Média	1053205,7	1173519,7	1324316,0	1487450,0	1609396,7
Desvio P	1100,7	2689,3	4029,6	6228,8	5791,2
Variância	1211510,3	7232321,3	16237444,0	38797929,0	33537506,3

Análise das variâncias

Somatório: Ccalculado: Ccrítico 5% :
 97016711 0,39991 0,684
 Maior variância dividido pela
 media das varências

Teste de Cochran:

Teste de hipóteses:

$H_0 = V$, se
 $C_{calc} < C_{crit}$ $H_0 = F$,
 se $C_{calc} > C_{crit}$

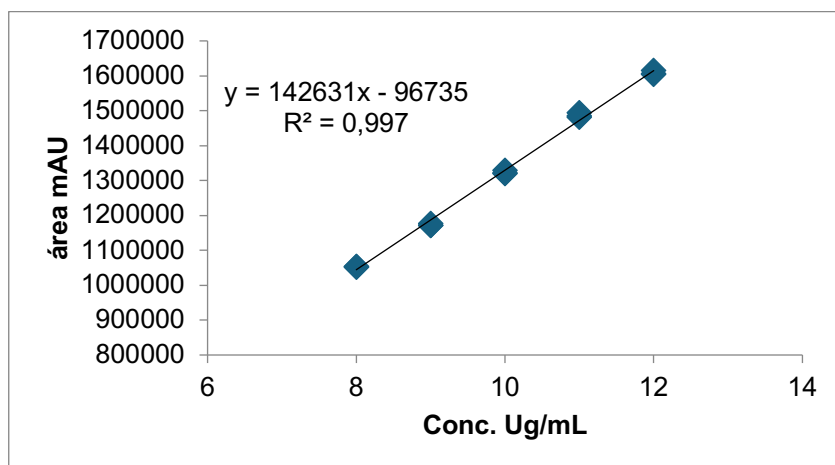
Logo $H_0 = V$ e os
 dados são
Homocedásticos;
 então, equação
 da reta
 determinada por
MMQO

Coefficiente angular ou inclinação	b	142631
Coefficiente linear ou intercepto	a	96735
Equação da reta $y = a + bx$	$y = 142631x - 96735$	
R quadrado	0,996993	0,997
R - coeficiente de correlação	0,998495	0,998

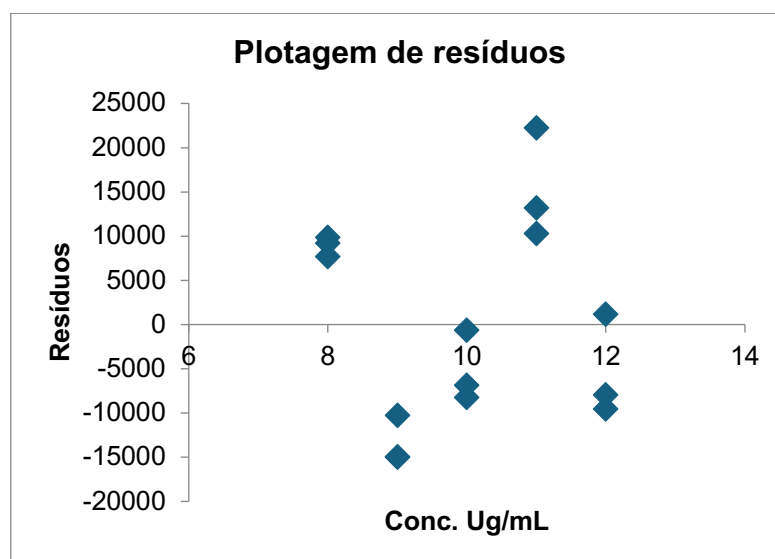
F	4310,072173	
Fsignificância (p-valor)	8,81398E-18	1 grau de liberdade

Se F calculado $\geq$ F (alfa, 1, n-2) = rejeita-se a hipótese nula de que $b=0$ e assume-se que y efetivamente varia em função de x e que o método pode ser considerado linear.

Gráfico da regressão linear.



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

ESTATÍSTICA DA REGRESSÃO

RESUMO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998495308
R-Quadrado	0,996992879
R-quadrado ajustado	0,996761562
Erro padrão	11899,61728
Observações	15

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,1031E+11	6,1031E+11	4310,072173	8,81398E-18
Resíduo	13	1840811588	141600891,4		
Total	14	6,12151E+11			

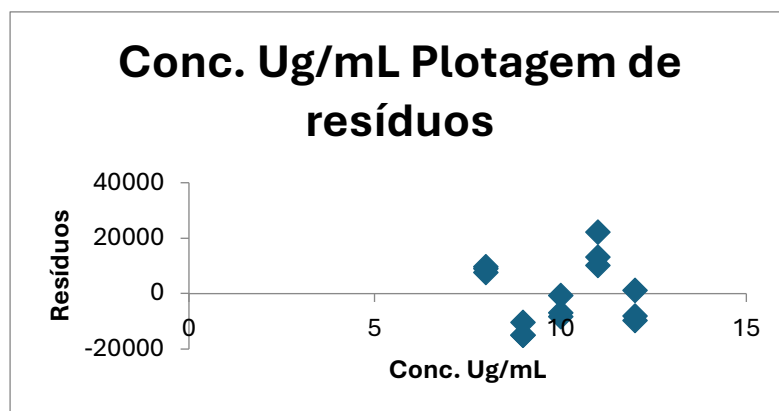
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	96734,73333	21941,81011	4,408694309	0,000706264	-144137,1322	49332,33452	-144137,132	-49332,33452
Conc. Ug/mL	142631,2333	2172,562936	65,65113992	8,81398E-18	137937,6965	147324,7702	137937,6965	147324,7702

RESULTADOS DE RESÍDUOS

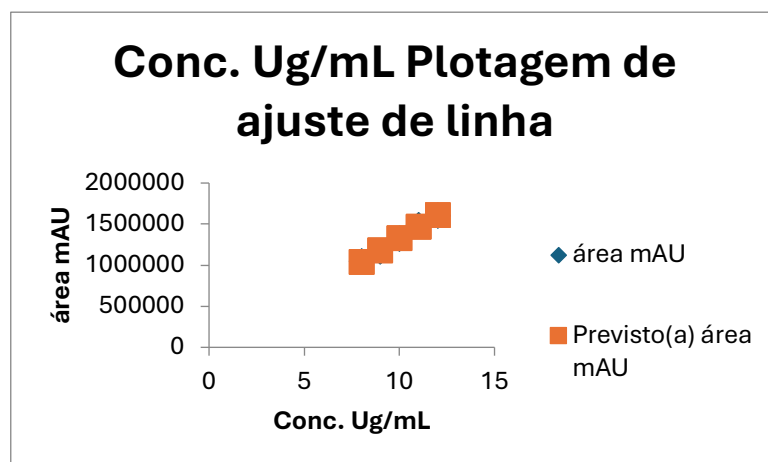
<i>Observação</i>	<i>Previsto(a) área mAU</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	1044315,133	9830,866667	0,857336185
2	1044315,133	7679,866667	0,669750472
3	1044315,133	9160,866667	0,798906418
		-	-
4	1186946,367	14979,36667	1,306329696
		-	-
5	1186946,367	10321,36667	0,900112006
		-	-
6	1186946,367	14979,36667	1,306329696
7	1329577,6	-6851,6	-0,59751849
		-	-
8	1329577,6	-8253,6	0,719784956
		-	-
9	1329577,6	-679,6	0,059266969
10	1472208,833	13201,16667	1,151255352
11	1472208,833	10288,16667	0,897216681
12	1472208,833	22234,16667	1,939010696
13	1614840,067	1181,933333	0,103074759
		-	-
14	1614840,067	7971,066667	0,695145618
		-	-
15	1614840,067	9541,066667	0,832063131

RESULTADOS DE PROBABILIDADE

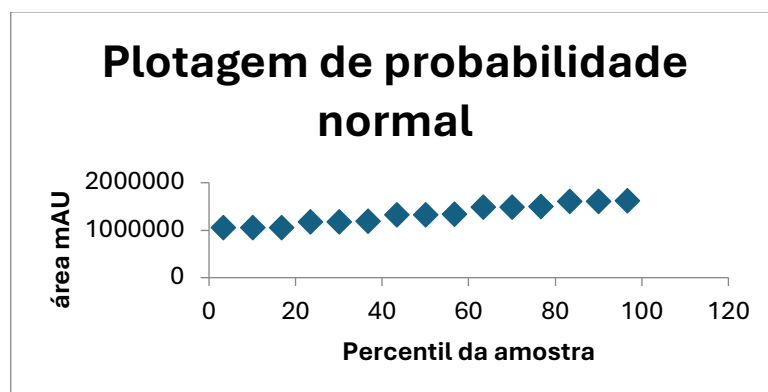
<i>Percentil</i>	<i>área mAU</i>
3,333333333	1051995
10	1053476
16,66666667	1054146
23,33333333	1171967
30	1171967
36,66666667	1176625
43,33333333	1321324
50	1322726
56,66666667	1328898
63,33333333	1482497
70	1485410
76,66666667	1494443
83,33333333	1605299
90	1606869
96,66666667	1616022



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

PRECISÃO

Precisão intra-dia			
Repetibilidade			
	80%	100%	120%
	8 µg/mL	10 µg/mL	12 µg/mL
1	1083958	1358127	1649665
2	1085621	1361604	1650151
3	1070522	1360706	1649105
Mean	1080033,667	1360145,667	1649640,333
SD	8279,2055	1804,9549	523,4361
RSD (%)	0,767	0,133	0,032

Precisão inter-dia									
Precisão intermediária									
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
	80%			100%			120%		
	8 µg/mL			10 µg/mL			12 µg/mL		
1	1083958	1054146	1085098	1358127	1322726	1347118	1649665	1616022	1605566
2	1085621	1051995	1094539	1361604	1321324	1345023	1650151	1606869	1643759
3	1070522	1053476	1090275	1360706	1328898	1349140	1649105	1605299	1647016
Mean	1080033,667	1053205,667	1089971	1360146	1324316,000	1347094	1649640	1609396,667	1632114
SD	8279,20538	1100,6863	4727,85	1804,95	4029,5712	2058,61	523,436	5791,1576	23048,6
RSD (%)	0,767	0,105	0,434	0,133	0,304	0,153	0,032	0,360	1,412
Mean RSD (%)	0,435			0,197			0,601		

EXATIDÃO

	Teórica	área mAU	Calculada	Exatidão (%)
	Conc. Ug/mL		Conc. Ug/mL	
80%	8	1054146	8,068925062	100,8616
	8	1051995	8,053844214	100,6731
	8	1053476	8,064227634	100,8028
100%	10	1322726	9,951962836	99,5196
	10	1321324	9,942133292	99,4213
	10	1328898	9,995235265	99,9524
120%	12	1616022	12,00828664	100,0691
	12	1606869	11,94411416	99,5343
	12	1605299	11,93310675	99,4426

Coefficiente angular ou inclinação	b	142631
Coefficiente linear ou intercepto	a	96735

LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Intercepto		
Curve 1	a1	62725
Curva 2	a2	96735
Curva 3	a3	26787
	Mean	62082,3333
	SD	34978,4282

Inclinação		
Curve 1	b1	141655
Curve 2	b2	142631
Curve 3	b3	138306
	Mean	140864
	SD	2268,4063

DIA 1	
8	1083958
8	1085621
8	1070522
9	1201230
9	1201526
9	1200218
10	1358127
10	1361604
10	1360706
11	1480813
11	1494046
11	1460136
12	1649665
12	1650151
12	1649105
	a 967535

b 142631

LoD	0,8194 µg/mL
LoQ	2,4831 µg/mL

DIA 2	
ug/mL	mAU
8	1054146
8	1051995
8	1053476
9	1171967
9	1176625
9	1171967
10	1322726
10	1321324
10	1328898
11	1485410
11	1482497
11	1494443
12	1616022
12	1606869
12	1605299

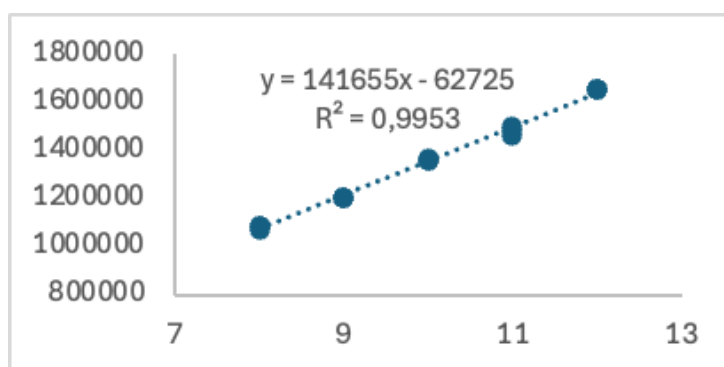
a 96735

b 142631

DIA 3	
ug/mL	mAU
8	1085098
8	1094539
8	1090275
9	1199926
9	1193247
9	1226953
10	1347118
10	1345023
10	1349140
11	1493438
11	1490158
11	1532854
12	1605566
12	1643759
12	1647016

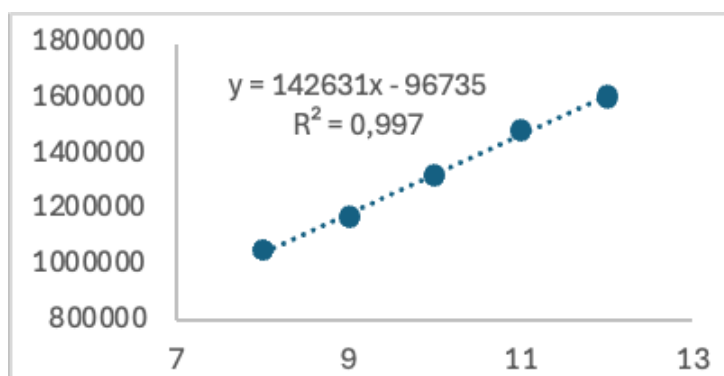
a 26787 b 138306

Gráfico da regressão linear, Dia 1.



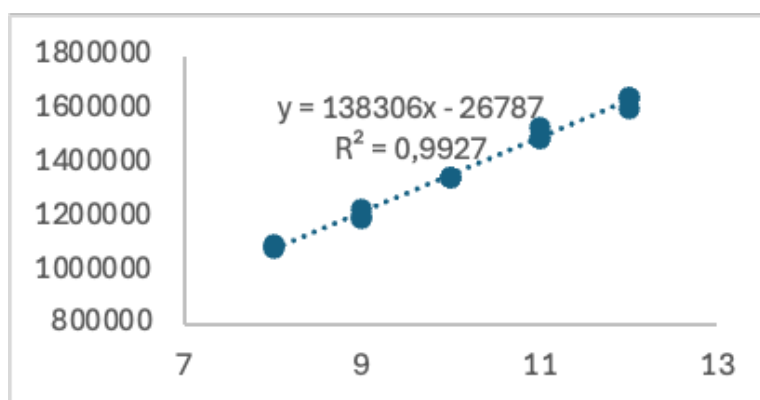
Legenda: Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

Gráfico da regressão linear, Dia 2.



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)

Gráfico da regressão linear, Dia 3.



Fonte: Resultados Experimentais. Autora (2024)