

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS
PROVENIENTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA NO
FÁRMACO CARBOPLATINA VISANDO SUA
APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA”**

Tairine Honda*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** Vínculo Empregatício: Libbs Farmacêutica LTDA.**

São Carlos - SP
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tairine Honda, realizada em 27/02/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (UFSCar)

Profa. Dra. Jéssica Cristina Amaral (ESALQ/USP)

Profa. Dra. Mariana Pompilio Darbem Rocha (Libbs Farmacêutica)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Na vida nada deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Skłodowska-Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo suporte e paciência.

Ao meu orientador, professor Edinho, pela disponibilidade, conselhos e ajuda prestada ao longo do desenvolvimento do projeto.

Aos meus colegas da Libbs Farmacêutica que me encorajaram a iniciar a jornada no mestrado profissional e que me deram total apoio, suporte e colaboração para que este trabalho fosse concluído.

À Libbs Farmacêutica, pela oportunidade e disponibilidade dos recursos para que esse projeto fosse possível.

Ao corpo técnico administrativo do Departamento de Química da UFSCar, pelo suporte oferecido.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2D – Bidimensional
- 3D- Tridimensional
- ACN – Acetonitrila
- ACVA – *4,4'-Azobis(4-cyanovaleric acid)*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – *Atmospheric pressure chemical ionization*
- APPI – *Atmospheric pressure photoionization*
- BP – *British Pharmacopoeia*
- C – Celsius
- CC – Corrente Contínua
- CDI – Centro de Desenvolvimento Integrado
- CG – Cromatografia Gasosa
- CI – *Chemical Ionization*
- CID – Colisão Induzida por Dissociação
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CLAE-FR – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa
- CLAE-FN – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Normal
- CQ – Controle de Qualidade
- CTR1 – *Copper transporter 1*
- Da – Dalton (Unidade de Massa Atômica)
- DA – Desenvolvimento Analítico
- DAD – Detector de Arranjo de Diodos
- DNA – *Deoxyribonucleic acid*
- DMF – *Drug Master File*
- EI – *Electron ionization*
- EM – *Electron Multiplier*
- EMA – *European Medicines Agency*
- ESI – *Electrospray ionization*
- eV – Elétron-volt

FDA – *Food and Drug Administration*

FTICR – *Fourier transform ion cyclotron resonance*

h – Hora

HCl – *Ácido clorídrico*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

H₂O₂ – *Peróxido de hidrogênio*

ICH – *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

IFA – *Insumo Farmacêutico Ativo*

INCA – *Instituto Nacional de Câncer*

IT – *Ion Trap*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K – *Kelvin*

kV – *Kilovolt*

L – *Litro*

LC – *Liquid Chromatography*

LC-MS/MS – *Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry*

m² – *metro quadrado*

M – *Molar*

MALDI – *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

Mg – *Miligrama*

Min – *Minuto*

mL – *Mililitro*

mm – *Milimetro*

mM – *Milimolar*

MS – *Mass Spectrometry*

m/z – *massa/carga*

NaOH – *Hidróxido de sódio*

nm – *nanometro*

pH – *Potencial Hidrogeniônico*

ppm – *Parte por Milhão*

PVDF – *Polyvinylidene fluoride*

Q – *Quadrupole*

QTOF – *Quadrupole time-of-flight*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RF – Radiofrequência

T.A. – Temperatura ambiente

TIC – *Total Ion Chromatogram*

TOF – *Time-of-flight*

u – Unidade de Massa Atômica

U.R. – Umidade Relativa

USP – *United States Pharmacopeia*

UV – Ultravioleta

UV-vis - Ultravioleta visível

V – *Volt*

w – *Watts*

XIC – *Extracted Ion Chromatogram*

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

Fe – Ferro

Pt – Platina

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Expectativa de vida ao nascer (1940 a 2022).....	4
TABELA 3.2 – Isótopos da platina e suas respectivas abundâncias.....	15
TABELA 3.3 – Diferentes tipos de detectores e os compostos que podem ser detectados.....	19
TABELA 4.4 – Parâmetros experimentais utilizados para o estudo de degradação.....	43
TABELA 4.5 – Condições cromatográficas do método analítico 1 (LC-DAD).....	45
TABELA 4.6 – Condições cromatográficas do método analítico 2 (LC-MS/MS).....	46
TABELA 4.7 – Gradiente de eluição empregado no método analítico 2.....	46
TABELA 4.8 – Parâmetros do espectrômetro de massas.....	47
TABELA 5.9 – Íons selecionados no TIC como possíveis impurezas da carboplatina.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – Relação entre o perfil de degradação real e potencial.....	7
FIGURA 3.2 – Estrutura da cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina.....	9
FIGURA 3.3 – Grupos funcionais da carboplatina suscetíveis à degradação.....	10
FIGURA 3.4 – Metabólito ativo da carboplatina.....	11
FIGURA 3.5 – Estrutura do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico.....	12
FIGURA 3.6 – Espectro de massas da platina.....	15
FIGURA 3.7 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.....	16
FIGURA 3.8 – Esquema de um espectrômetro de massas.....	20
FIGURA 3.9 – Fonte de ionização por elétrons.....	22
FIGURA 3.10 – Fonte por fotoionização química à pressão atmosférica.....	24
FIGURA 3.11 – Esquema da fonte de ionização por laser assistida por matriz.....	25
FIGURA 3.12 – Processo de ionização por eletrospray.....	27
FIGURA 3.13 – Aumento da resolução na diferenciação de íons com razão m/z próximas.....	29
FIGURA 3.14 – Esquema de um analisador quadrupolar.....	30
FIGURA 3.15 – Esquema de um analisador armadilha de íons.....	32
FIGURA 3.16 – Esquema dos íons sendo detectados por um analisador por tempo de voo.....	34
FIGURA 3.17 – Esquema de um refletor de íons.....	35
FIGURA 3.18 – Esquema de um quadropolo tempo-de-voo.....	37
FIGURA 3.19 – Esquema de um detector multiplicador de elétrons	40
FIGURA 5.20 – Cromatograma do padrão de carboplatina em UV 210 nm.....	48
FIGURA 5.21 – Cromatograma de íons totais do padrão de carboplatina.....	49
FIGURA 5.22 – Espectro de massas full scan da carboplatina.....	49
FIGURA 5.23 – Espectro de massas full scan da carboplatina com zoom.....	50
FIGURA 5.24 – Espectro de massas MS/MS para o íon molecular com m/z 372,052 Da.....	51

FIGURA 5.25 – Cromatograma da amostra estressada de carboplatina em UV 210 nm.....	52
FIGURA 5.26 – Cromatograma de íons totais da amostra estressada de carboplatina.....	52
FIGURA 5.27 – Espectro de massas full scan ESI ⁻ do tempo de retenção 23,3 minutos.....	54
FIGURA 5.28 – Fórmula estrutural e molecular do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico.....	55
FIGURA 5.29 – Fórmula estrutural e molecular do ácido ciclobutano monocarboxílico.....	55
FIGURA 5.30 – Cromatograma da amostra estressada de carboplatina em UV 210 nm com zoom.....	56
FIGURA 5.31 – Cromatograma de íons totais da amostra estressada de carboplatina evidenciando o íon em 3,4 minutos.....	57
FIGURA 5.32 – Espectro de massas full scan ESI ⁺ do tempo de retenção 3,4 minutos.....	58
FIGURA 5.33 – Espectro de massas full scan ESI ⁻ do tempo de retenção 3,4 minutos.....	59
FIGURA 5.34 – Cromatograma XIC do íon com m/z 404,041 Da para a amostra estressada de carboplatina.....	60
FIGURA 5.35 – Espectro de massas MS/MS para o íon molecular com m/z 404,041 Da.....	61
FIGURA 5.36 – Estrutura química proposta para a possível impureza da carboplatina.....	62
FIGURA 5.37 – Mecanismo de formação da impureza da carboplatina.....	62

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS PROVENIENTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA NO FÁRMACO CARBOPLATINA VISANDO SUA APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. Medicamentos contra o câncer, como a carboplatina, são essenciais para melhorar as taxas de sobrevivência e qualidade de vida dos pacientes. A carboplatina, um complexo de platina amplamente empregado na clínica, está sujeita a processos de degradação que podem gerar impurezas com potencial impacto na segurança e eficácia do medicamento. Diante disso, este estudo focou na aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas de alta resolução para elucidar os produtos de degradação formados sob condições de estresse térmico seco no produto Fauldcarbo, que contém o princípio ativo carboplatina. Utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) com fonte de ionização por eletrospray e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), que permite alta precisão na determinação de massas e identificação estrutural.

Foi possível identificar a estrutura da impureza conhecida da carboplatina ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico, de m/z 143,0345 Da (ESI⁻) e da impureza desconhecida de m/z 404,0415 Da (ESI⁺) de maneira assertiva. A impureza desconhecida foi formada a partir da reação da carboplatina com um oxigênio radicalar, reação que pode ser favorecida devido a alta temperatura empregada durante a condição de estresse.

Esta pesquisa não apenas ampliou o entendimento sobre a degradação da carboplatina, mas também demonstrou a viabilidade de técnicas analíticas para monitorar impurezas, contribuindo para a qualidade e inovação no desenvolvimento farmacêutico.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR SEPARATION AND IDENTIFICATION OF IMPURITIES FROM FORCED DEGRADATION OF THE DRUG CARBOPLATIN FOCUSING ON ITS APPLICABILITY IN THE PHARMACEUTICAL INDUSTRY. Cancer medications such as carboplatin are essential for improving patient survival rates and quality of life. Carboplatin, a platinum complex widely used in clinical practice, is susceptible to degradation processes that may generate impurities with potential impacts on drug safety and efficacy. Therefore, this study focused on applying high-resolution chromatographic and spectrometric techniques to elucidate degradation products formed under dry thermal stress conditions in the product Fauldcarbo, which contains the active ingredient carboplatin. We employed high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using electrospray ionization and a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) analyzer, which enables high precision in mass determination and structural identification.

We successfully identified the structure of both the known carboplatin impurity 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid m/z 143,0345 (ESI⁻) and a previously unknown impurity m/z 404,0415 (ESI⁺). The unknown impurity was formed through the reaction of carboplatin with radical oxygen species, a process that may be favored by the high temperatures employed during stress conditions.

This research not only enhanced our understanding of carboplatin degradation but also demonstrated the feasibility of analytical techniques for impurity monitoring, contributing to pharmaceutical quality and innovation

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS.....	2
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 CENÁRIO FARMACÊUTICO.....	3
3.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	6
3.3 O CÂNCER NO BRASIL.....	7
3.4 CARBOPLATINA.....	8
3.4.1 SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA CARBOPLATINA.....	12
3.4.2 PLATINA E SEUS ISÓTOPOS.....	14
3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	16
3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS).....	19
3.6.1 FONTES DE IONIZAÇÃO.....	21
3.6.2 ANALISADORES DE MASSAS.....	28
3.6.3 DETECTORES.....	38
4 – PARTE EXPERIMENTAL.....	42
4.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE POR DEGRADAÇÃO FORÇADA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO SECO.....	42
4.2 AVALIAÇÃO VIA LC-MS-QTOF DOS PRODUTOS PROVENIENTES DE ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO SECO.....	44
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 PADRÃO DE CARBOPLATINA.....	48
5.2 AMOSTRA DEGRADADA DE FAULDCARBO A 70°C POR 14 DIAS.....	51
5.3 IMPUREZA 1: ÍON <i>M/Z</i> 143,0345 DA.....	53

5.4 IMPUREZA 2: ÍONS M/Z 404,0415 DA E M/Z 402,0261 DA	56
6 – CONCLUSÃO	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 – INTRODUÇÃO

A carboplatina é um quimioterápico amplamente empregado no tratamento de diversos tipos de câncer, como os de ovário, pulmão, testículo, dentre outros. Sua utilização se consolidou devido à boa eficácia clínica e a um perfil de toxicidade mais tolerável em comparação a outros compostos da mesma classe, como a cisplatina. Dada sua relevância terapêutica, é fundamental garantir que esse fármaco mantenha suas propriedades ao longo do tempo, o que torna indispensáveis os estudos voltados à avaliação da sua estabilidade.

Os estudos de degradação forçada têm papel essencial nesse processo, pois simulam condições adversas às quais o medicamento pode ser exposto durante a fabricação, armazenamento e transporte. A partir desses estudos, é possível identificar possíveis produtos de degradação que podem comprometer a eficácia ou até gerar efeitos indesejados. Esses dados são importantes tanto para atender às exigências regulatórias quanto para assegurar a qualidade e a segurança do produto ao paciente.

Entre as técnicas utilizadas para análise desses produtos de degradação, destaca-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Trata-se de uma ferramenta analítica de alta sensibilidade e precisão, capaz de identificar e caracterizar impurezas mesmo em concentrações muito baixas. Sua aplicação em estudos de estabilidade e de degradação é especialmente relevante para fármacos como a carboplatina, cujos produtos de degradação podem impactar diretamente o tratamento oncológico.

Dessa forma, a carboplatina foi submetida a estresse térmico seco durante 14 dias e os produtos de degradação formados foram estudados com a finalidade de identificar as estruturas e os mecanismos de formação das impurezas, com auxílio das técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC-QTOF).

2 – OBJETIVOS

Este projeto de mestrado profissional tem como objetivo o desenvolvimento de método analítico via HPLC-QTOF para separação e posterior identificação estrutural de impurezas relacionadas provenientes de degradação forçada da carboplatina, um medicamento oncológico de forma farmacêutica líquida injetável.

Além disso, espera-se obter conhecimento a respeito da técnica de espectrometria de massas e sua aplicabilidade na indústria farmacêutica.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CENÁRIO FARMACÊUTICO

A indústria farmacêutica é influenciada pela crescente demanda por saúde, pelas mudanças no setor e pelas principais inovações tecnológicas. As transformações demográficas e o aumento da incidência de doenças estão alterando tanto as oportunidades quanto os desafios enfrentados pela indústria. Sob a perspectiva da demanda, existem duas mudanças estruturais interligadas: a transição demográfica e a transição epidemiológica. A primeira diz respeito à alteração na estrutura etária das populações, relacionada ao progresso das sociedades.

Devido a diversos fatores sociais, culturais e tecnológicos, as pessoas começaram a ter menos filhos e a viver por mais tempo. Essa combinação de redução na taxa de natalidade e aumento na expectativa de vida resulta no envelhecimento da população, com uma proporção crescente de idosos, que passa a ocupar uma parte significativa da pirâmide demográfica [1] [2]. Conforme apresentado na TABELA 3.1, é possível observar que a expectativa de vida do brasileiro tem aumentado significativamente com o passar dos anos. Com o processo de envelhecimento da população, inevitavelmente, o consumo de medicamentos e serviços de saúde estão em constante crescimento [3].

Ano	Expectativa de vida ao nascer – 1940 a 2022			Diferencial entre os sexos (anos)
	Total	Homem	Mulher	
1940	45,5	42,9	48,3	5,4
1950	48,0	45,3	50,8	5,5
1960	52,5	49,7	55,5	5,8
1970	57,6	54,6	60,8	6,2
1980	62,5	59,6	65,7	6,1
1991	66,9	63,2	70,9	7,7
2000	69,8	66,0	73,9	7,9
2010	73,9	70,2	77,6	7,4
2022	75,5	72,0	79,0	7,0

TABELA 3.1 – Expectativa de vida ao nascer (1940 a 2022). Adaptado de IBGE [3]

O Brasil se destaca no panorama mundial farmacêutico, movimentando mais de 100 bilhões em 2022, representando aproximadamente 2% do mercado mundial, sendo o 10º em faturamento no ranking das 20 principais economias. A projeção de crescimento das vendas da indústria farmacêutica deve aumentar cerca de 9,3% em 2025, conforme divulgado pela Sindusfarma [4] [5].

Em 2022, foram contabilizadas 341 empresas farmacêuticas no Brasil, com faturamento de medicamentos prescritos e isentos de prescrição a partir de 50 mil reais/ano. Dentre elas, 95 (representando 27,86%) eram de origem internacional e 246 (representando 72,14%) de capital nacional [5].

A Libbs Farmacêutica Ltda. é uma empresa 100% brasileira, com capital privado, e mais de 66 anos no mercado nacional, sendo o 10º maior laboratório no varejo farmacêutico no Brasil. Possui mais de 3700 colaboradores, mais de 100 marcas em mais de 260 apresentações. Seu parque fabril possui as unidades Galênica, Fármacos e Biotec, sendo a primeira fábrica de anticorpos monoclonais

em escala industrial do país, além dos centros logísticos. Em 2023 investiu 198 milhões na área de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação [6].

As indústrias farmacêuticas são responsáveis pelo desenvolvimento e comercialização dos medicamentos. Em todo o mundo, diversos órgãos reguladores têm como função proteger a saúde pública através de regulamentos na indústria farmacêutica. Nos Estados Unidos a agência reguladora ligada ao departamento de saúde é a *Food and Drug Administration* (FDA) [7], já na Europa é a *European Medicines Agency* (EMA) [8]. No Brasil temos a ANVISA, criada pela Lei nº 9.782, de 26 de janeiro 1999, que é uma autarquia sob regime especial, e tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população. Essa proteção é realizada por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos, serviços, dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos, fronteiras e recintos alfandegários [9].

Há também o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), uma iniciativa que reúne autoridades reguladoras e a indústria farmacêutica para discutir aspectos científicos e técnicos de produtos farmacêuticos. Esta organização, tem como missão alcançar maior harmonização em todo o mundo para garantir que medicamentos seguros, eficazes e de alta qualidade sejam desenvolvidos, registrados e mantidos da maneira mais eficiente em termos de recursos, atendendo a altos padrões de qualidade [10]. A ANVISA é membro regular do ICH desde 2016 [11].

A ANVISA dispõe de diversas regulamentações e normas que regem desde o desenvolvimento de um novo medicamento até a liberação e distribuição à população.

Dentre as legislações voltadas para registro e pós registro de um medicamento, para este projeto, é importante destacar a RDC N° 53 de 2015, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências [12]; e a RDC N° 318 de 2019, que estabelece os critérios para a

realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências [13].

3.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo de degradação forçada consiste na exposição do medicamento a diversas condições de estresse a fim de avaliar a suscetibilidade do ativo e formação de produtos de degradação (também chamados de impurezas) e traçar o perfil potencial de impurezas que podem ser formadas no produto. Além disso, o estudo de degradação forçada permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade e fornece informações sobre as possíveis rotas de degradação do fármaco [12]. Conhecer o perfil potencial de impurezas que podem ser formadas durante o ciclo de vida do produto é essencial para garantir a qualidade, segurança e eficácia do medicamento para o paciente.

Durante o estudo de estabilidade, é possível traçar o perfil real de degradação do fármaco, gerando evidências relacionadas a variação da qualidade do IFA (insumo farmacêutico ativo) ou do medicamento ao longo do tempo. Esse processo considera a influência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, além de características do próprio produto, incluindo as propriedades físicas e químicas do IFA e dos excipientes. Também são avaliados a forma farmacêutica, o processo de fabricação e as propriedades dos materiais de embalagem. O objetivo é estabelecer o prazo de reteste do IFA e a validade do IFA e do medicamento [13].

Devido as condições drásticas a que o medicamento ou IFA são expostos nas condições de estresse, as impurezas encontradas durante o estudo de degradação nem sempre serão encontradas durante o estudo de estabilidade de longa duração ou estabilidade acelerada, mas todas as impurezas encontradas no estudo de estabilidade devem ser encontradas durante o estudo de degradação forçada [14], conforme FIGURA 3.1.

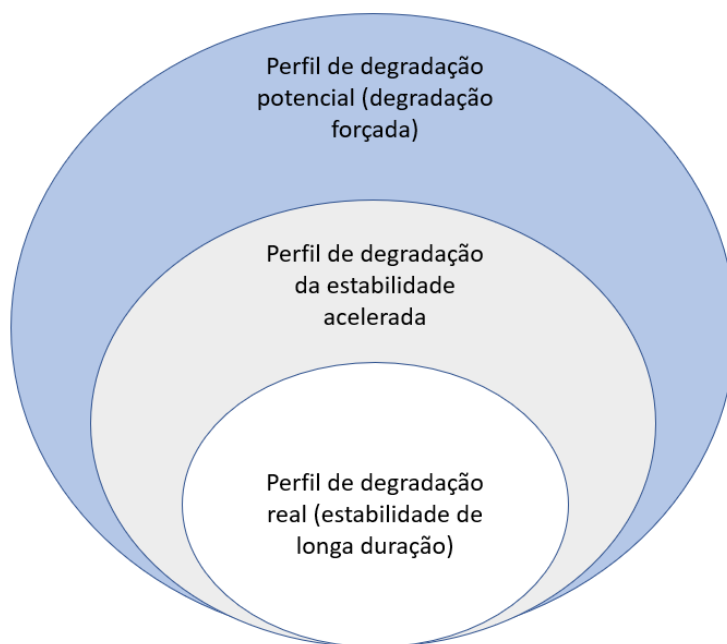


FIGURA 3.1: Relação entre o perfil de degradação real e potencial. Adaptado de ANVISA [14]

Metodologias analíticas precisas e seletivas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (MS), permitem a separação e identificação estrutural de impurezas, que vem sendo cada vez mais discutidos durante o desenvolvimento dos produtos farmacêuticos.

O método analítico indicativo de estabilidade deve ser capaz de identificar, ao longo do tempo, alterações nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas do IFA ou medicamento. Além disso, deve ser capaz de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência [13].

3.3 O CÂNCER NO BRASIL

O câncer é a segunda maior causa de mortes no Brasil e no mundo, depois das doenças cardiovasculares, e é um grande obstáculo para o aumento da expectativa de vida da população mundial [15]. A incidência da mortalidade por

câncer cresce rapidamente, decorrente do envelhecimento e mudança de comportamento e do ambiente, incluindo mudanças estruturais, que têm impacto na mobilidade, na recreação, na dieta e na exposição a poluentes ambientais [16].

O câncer é uma doença que pode resultar da proliferação anormal de qualquer um dos diferentes tipos de células no corpo. A distinção entre tumores benignos e malignos é fundamental para o entendimento da doença. Um tumor é qualquer proliferação anormal de células, que pode ser benigna ou maligna. Um tumor benigno permanece confinado em sua localização original, sem invadir o tecido normal circundante nem se espalhar para locais distantes do corpo. Um tumor maligno, no entanto, é capaz de invadir o tecido normal circundante e se espalhar por todo o corpo através dos sistemas circulatório ou linfático (metástase). Apenas os tumores malignos são adequadamente chamados de cânceres, e é sua capacidade de invadir e metastatizar que torna o câncer tão perigoso. Enquanto os tumores benignos geralmente podem ser removidos cirurgicamente, a disseminação de tumores malignos para locais distantes do corpo frequentemente os torna resistentes a esse tratamento localizado [17] [18] [19].

O INCA (Instituto Nacional de Câncer) realiza estimativas de câncer desde 1995, de caráter atualmente trienal, o instituto estima 704 mil novos casos no Brasil para o triênio 2023-2025. São diversas as opções de tratamento para os diferentes tipos de câncer, a fim de prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente [20] [21].

Sendo assim, devido a relevância dos tratamentos de câncer para a vida da população, permitindo aumentar significativamente a taxa de sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, a carboplatina foi o medicamento alvo para estudo desta dissertação de mestrado profissional.

3.4 CARBOPLATINA

Dentre os diferentes tipos de agentes antineoplásicos, os complexos de platina são amplamente utilizados no tratamento de tumores há mais de 45 anos. A cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e a nedaplatina são exemplos de fármacos

utilizados para o tratamento de cânceres como o melanoma, sarcoma e leucemia e tem mostrado eficácia clínica para tumores na cabeça, pescoço, bexiga, pulmão, ovário, colorretal e testículos [22] [23] [24].

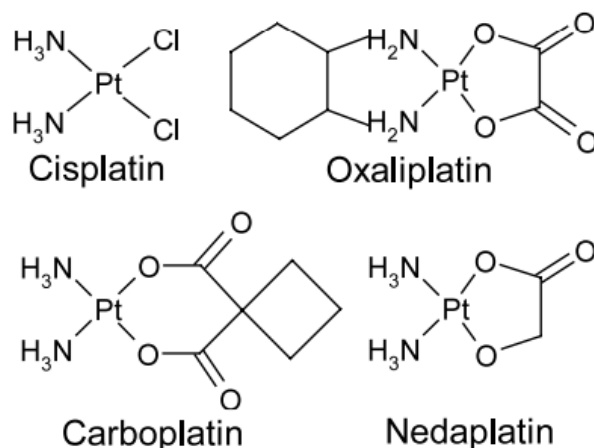


FIGURA 3.2 – Estrutura da cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e nedaplatina

A cisplatina foi o primeiro composto de platina aprovado pelo FDA para tratamento de câncer em 1978 [25]. Devido seus efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade, há limitações em sua administração [24].

A carboplatina é um composto análogo à cisplatina, porém apresenta menor toxicidade quando comparada a esta. Essa diferença de toxicidade deve-se à substituição de um grupo: o 1,1-ciclobutanodicarboxilato, que tem uma maior força de ligação na carboplatina do que os substituintes cloro presentes na cisplatina [26].

A carboplatina tem como indicação terapêutica tratamentos de estados avançados do carcinoma de ovário de origem epitelial (incluindo tratamentos de segunda linha e paliativo em pacientes que já tenham recebido medicamentos contendo cisplatina). Está também indicado no tratamento do carcinoma de pequenas células de pulmão, nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e nos carcinomas de cérvix uterina. Trata-se de um medicamento em solução injetável [27].

A carboplatina é um complexo tetracoordenado quadrado planar da platina (Pt), tendo como ligantes duas amônias e o íon bidentado 1,1-

ciclobutanodicarboxilato. Essa substância, como outros compostos de coordenação, está sujeita à química de complexos sendo, portanto, bastante suscetível a deslocamentos de equilíbrio e instabilidade em função do pH e luminosidade. É característica dos complexos de platina serem eletricamente neutros, como é o caso da carboplatina, embora a forma ativa possa ser carregada após a troca de ligantes no meio biológico. Compostos de coordenação possuem um átomo central de metal ou íon metálico, neste caso, a platina, que atua como um ácido de Lewis. Ao redor desse átomo central, encontram-se átomos orgânicos ou inorgânicos conhecidos como ligantes, que funcionam como bases de Lewis [28]. A FIGURA 3.3 demonstra os grupos funcionais da carboplatina suscetíveis à degradação.

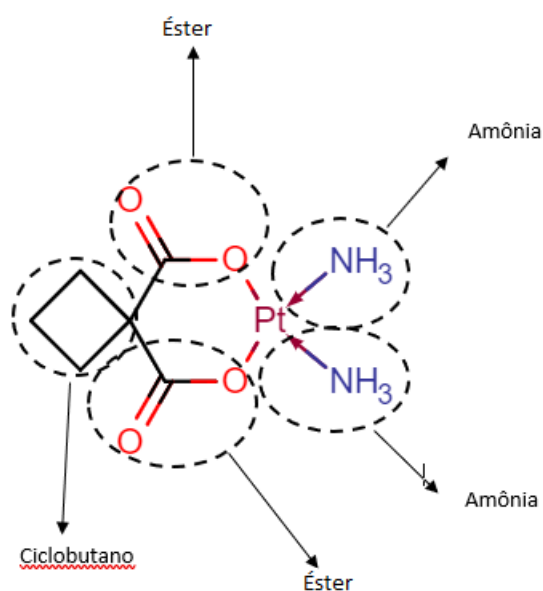


FIGURA 3.3 - Grupos funcionais da carboplatina suscetíveis à degradação

A carboplatina se mostrou menos tóxica para os rins e sistema nervoso do que a cisplatina devido a formação de estrutura de anel quelato de carboplatina de seis membros, que protege o átomo de platina do ataque nucleofílico, pois a estrutura da molécula dificulta a ligação da platina com a estrutura do DNA, reduzindo a toxicidade da carboplatina em comparação com a cisplatina, que sofre

quebra mais rapidamente liberando a platina altamente reativa, que reage de forma agressiva com várias moléculas do corpo, incluindo o DNA e outras estruturas celulares [29]. A carboplatina é quimicamente conhecida como *cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid;platinum(2+)*. Fórmula e peso molecular: $C_6H_{12}O_4N_2Pt$; 371,256 g/mol [30]. Complexos de platina agem formando adutos com o DNA desencadeando a apoptose (morte celular programada) [31].

A entrada dos compostos de platina nas células-alvo é uma etapa crucial para sua eficácia, para que o fármaco consiga exercer seu efeito nas células cancerosas, ocorrendo não apenas por difusão passiva, mas também através de mecanismos ativos. Um exemplo disso é a participação de transportadores de cobre, como o CTR1 (*Cooper Transporter 1*). Estudos mostram que essa proteína, que é responsável pela absorção de cobre em células de mamíferos e leveduras, desempenha um papel significativo no transporte dos compostos de platina para o interior celular por meio da endocitose. Isso se deve à sua alta concentração de resíduos de histidina e metionina, aminoácidos que possuem grande afinidade pela carboplatina [31] [32].

Após a entrada dos compostos de platina na célula através de difusão passiva e por mecanismos ativos, o metabólito ativo *diaquo-diamine-platinum* é formado por meio de reações de hidrólise [33], representado na FIGURA 3.4.

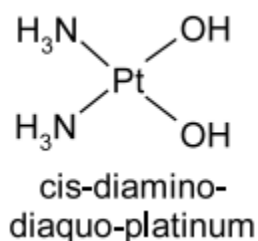


FIGURA 3.4 – Metabólito ativo da carboplatina

No DNA, o metabólito ativo de platina tem uma afinidade especial pelo átomo N7 das bases guanina ou adenina, resultando na formação de um aduto monofuncional. Essas interações ocorrem predominantemente no sulco maior da dupla hélice, onde as bases são mais acessíveis, e podem acontecer entre bases

da mesma fita (intrafita) ou de fitas opostas (interfita), sendo as interações intrafita as mais frequentes [33].

Os adutos formados impedem a replicação celular, induzindo uma torção em sua estrutura e afetando os processos normais de transcrição e replicação. Essas alterações no processamento do DNA podem resultar em citotoxicidade, levando à morte da célula cancerosa [34].

3.4.1 SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA CARBOPLATINA

O produto de degradação mais conhecido da carboplatina é o ácido 1,1 ciclobutano dicarboxílico, representado na FIGURA 3.5, que apesar de ser um material intermediário na síntese da carboplatina, pode também ser formado por hidrólise da ligação entre a platina e o próprio ácido 1,1 ciclobutano dicarboxílico. Possui fórmula química $C_6H_8O_4$ e massa monoisotópica 144,042260u. Este composto é monitorado nas monografias da carboplatina tanto da farmacopeia americana (USP) [35] e farmacopeia britânica (BP) [36], com um limite de especificação de 1,0%.

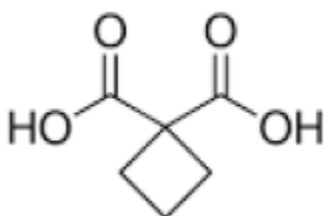
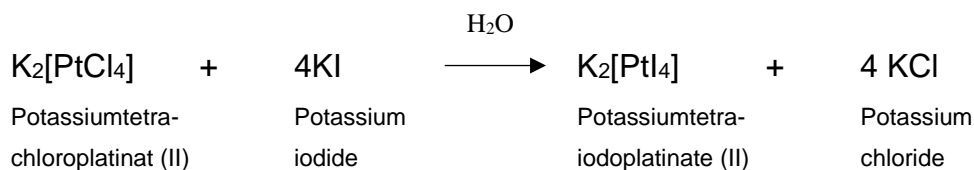


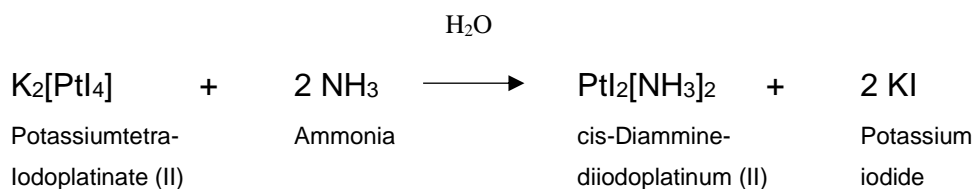
FIGURA 3.5 – Estrutura do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico

O fabricante do insumo farmacêutico ativo é responsável por fornecer o *Drug Master File* (DMF) do IFA, que corresponde ao dossiê do insumo farmacêutico ativo ou arquivo mestre da droga, que contém informações sobre o produto que será comercializado, sobre a fabricação, caracterização, controle de qualidade, embalagem, estabilidade, dentre outros documentos. Abaixo segue uma breve descrição sobre a síntese do IFA, conforme patente EP2913336A1 [37]:

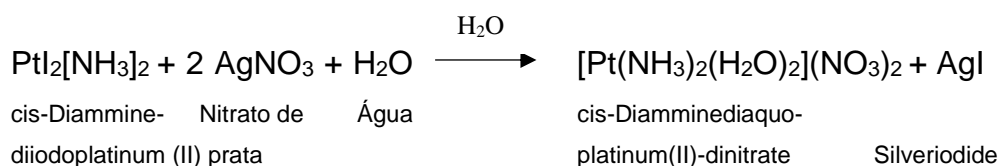
- A primeira reação na rota sintética da carboplatina é a reação de $K_2[PtCl_4]$ com KI, formando $K_2[PtI_4]$ e KCl.



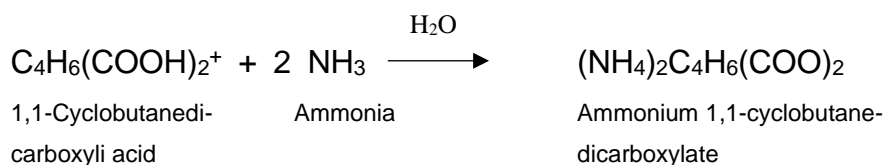
- Na segunda etapa, $K_2[PtI_4]$ reage com solução de NH_3 para formar $PtI_2(NH_3)_2$ e KI. $PtI_2(NH_3)_2$ precipita e é separado do KI através de filtração e lavagem.



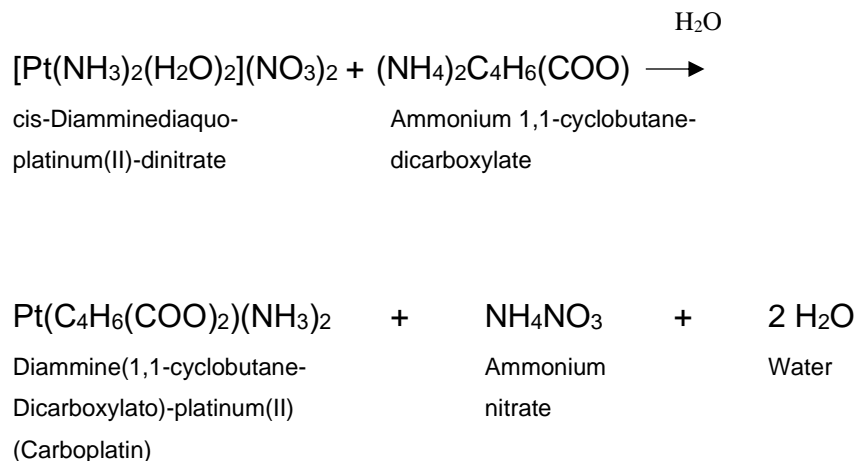
- O $PtI_2(NH_3)_2$ é suspenso em água e reage com solução de nitrato de prata. Nesta reação AgI e $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2](NO_3)_2$ é formado. AgI precipita e é separado do composto de platina por filtração.



- Na quarta etapa, ácido 1,1 ciclobutano dicarboxílico reage com solução de NH_3 para formar amônio-1,1-ciclobutanodicarboxilato.



- A quinta etapa é a reação entre solução de $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$ e solução de amônio-1,1-ciclobutanodicarboxilato. Carboplatina e NH_4NO_3 são formados e separados.



- O produto é lavado com água e metanol antes de secar. Nenhum catalisador é usado na síntese de carboplatina.

É indiscutível a necessidade da verificação da qualidade nos produtos farmacêuticos. Esta verificação é realizada pelo setor de Controle de Qualidade (CQ) por meio de métodos analíticos desenvolvidos pelo setor de Desenvolvimento Analítico (DA).

3.4.2 PLATINA E SEUS ISÓTOPOS

A platina é um elemento químico classificado como um metal de transição, que, conforme a IUPAC, é um elemento cujo átomo possui um subnível d incompleto ou que possa vir a formar cátions com um subnível d incompleto [38]. Possui número atômico 78 e massa atômica 195,08 u [30]. A massa atômica dos elementos químicos é calculada através da média ponderada das massas atômicas dos isótopos [39].

A platina possui naturalmente 6 isótopos [40], demonstrados na TABELA 3.2.

Isótopo	Abundância
^{190}Pt	0,01%
^{192}Pt	0,78%
^{194}Pt	32,9%
^{195}Pt	33,8%
^{196}Pt	25,2%
^{198}Pt	7,2%

TABELA 3.2 – Isótopos da platina e suas respectivas abundâncias

Isótopos são átomos de um mesmo elemento químico, que possuem o mesmo número atômico (número de prótons) mas diferentes números de massa (diferem no número de nêutrons) [39]. O isótopo mais abundante da platina é o ^{195}Pt , seguido pelo ^{194}Pt , ^{196}Pt e ^{198}Pt , respectivamente. Os isótopos ^{190}Pt e ^{192}Pt possuem abundância irrelevante quando comparado aos demais isótopos [40].

Na FIGURA 3.6 é possível observar o espectro de massas dos isótopos da platina e sua distribuição isotópica [41].

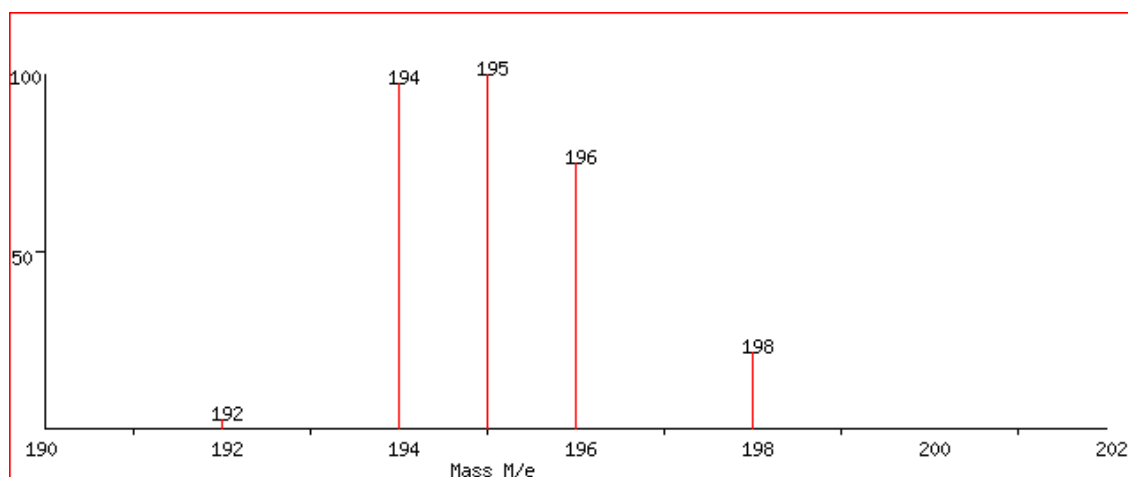


FIGURA 3.6 – Espectro de massas da platina

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) é uma técnica que permite a separação, identificação e quantificação de componentes de uma mistura. A técnica consiste em duas fases, uma fase móvel e outra estacionária, onde diferentes componentes de uma amostra são separados à medida que são transportados pela fase móvel através da fase estacionária. Os analitos geralmente tem diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária, sendo que os compostos que possuem interações mais fortes com a fase estacionária tenderão a se mover mais lentamente pelo sistema cromatográfico do que aqueles compostos que têm menor ou nenhuma interação com a fase estacionária, que se moverão mais rapidamente. As interações entre analitos e fases determinam o tempo que os analitos passam dentro da coluna e, conseqüentemente, os compostos eluem da coluna e chegam em momentos diferentes ao detector [42].

O equipamento para realização da cromatografia líquida consiste em diversos módulos, como reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento de fase móvel, sistema de injeção, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição e registro dos dados, conforme representado na FIGURA 3.7 [43].

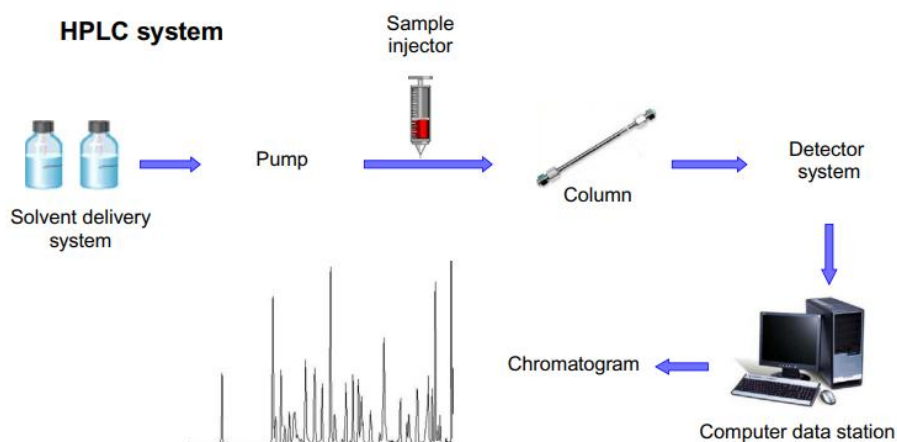


FIGURA 3.7 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

O desenvolvimento de um método cromatográfico envolve uma série de etapas que são de extrema importância para garantir que a técnica seja eficaz, precisa e adequada para a análise da amostra que se pretende estudar. O passo inicial é definir qual é o objetivo da análise cromatográfica e entender sobre as propriedades físico-químicas da molécula estudada, como solubilidade, polaridade, pKa e pH [44].

A solubilidade e a polaridade do analito são fundamentais para garantir a escolha dos solventes adequados para serem utilizados como diluente e fase móvel, a fim de que o analito possa ser solubilizado durante o preparo da amostra e tenha interação adequada pela fase móvel e fase estacionária. A polaridade do analito também auxilia na escolha da fase estacionária, pois compostos polares tendem a interagir mais com fases estacionárias polares, resultando em tempos de retenção mais longos e boa separação em condições de fase reversa [45].

O pKa do analito, ou constante de dissociação, está relacionado ao equilíbrio químico envolvendo ácidos e bases, ajudando a entender a ionização de compostos em solução, o que influencia como eles se comportam em diferentes condições experimentais. A ionização de compostos modifica suas propriedades de interação com a fase móvel e estacionária e vai depender do pH da solução. O pH da fase móvel pode ser ajustado para controlar a ionização do analito, influenciando sua interação com a coluna e a separação. Selecionar um pH apropriado para analitos ionizáveis permite que ele interaja de maneira mais eficiente com a fase estacionária, resultando em picos simétricos e bem separados [44] [46].

Devido à sua alta eficiência na separação cromatográfica, a sílica é o material mais utilizado no preenchimento das colunas. Este material não apenas apresenta um elevado grau de pureza durante seu processo de fabricação, mas também demonstra excelente estabilidade térmica e mecânica [47]. As fases estacionárias de fase reversa podem variar em comprimento de cadeia, como C18 ou C8, ou ainda conter ligantes específicos projetados para aprimorar a seletividade e o poder de separação. Na escolha da coluna cromatográfica, é possível optar por diferentes comprimentos de coluna, sendo que colunas mais longas proporcionam tempos de retenção mais elevados. Além disso, colunas com partículas de menor tamanho

aumentam a eficiência cromatográfica, pois diminuem a dispersão dos analitos dentro das partículas [48].

Selecionar as condições cromatográficas é uma etapa fundamental para garantir o sucesso da separação cromatográfica. A escolha do modo de separação cromatográfico vai depender da polaridade do analito, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa a técnica mais comumente utilizada para separação e quantificação de compostos farmacêuticos [49]. Na CLAE-FR (cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa), a fase estacionária possui menor polaridade e a fase móvel uma polaridade maior, sendo que na CLAE-FN (cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal) as polaridades são invertidas, onde fase estacionária possui maior polaridade e a fase móvel menor polaridade [50]. A CLAE-FR é frequentemente utilizada para separar compostos ionizáveis (ácidos e bases) utilizando fases móveis tamponadas, para evitar que o analito se torne ionizado, ou reagentes de pareamento iônico [44]. Ao utilizar um tampão, deve-se levar em consideração alguns fatores, como a solubilidade, a capacidade do tampão, interação com amostra e interação com a coluna, além da concentração do tampão, que é adequada, na maioria dos casos, de 10 a 50 mM, pois essa faixa de concentração permite um bom equilíbrio entre estabilidade do pH e compatibilidade com diferentes detectores. É importante que os tampões utilizados no preparo das fases móveis estejam em concentração adequada e sejam filtrados, para evitar precipitação de sais da coluna cromatográfica (que podem levar ao seu entupimento), evitar falha dos componentes do instrumento e eliminar partículas em suspensão não visíveis [51].

A fase móvel influencia diretamente a resolução, seletividade e eficiência. A composição da fase móvel é crítica na separação por CLAE-FR, sendo comumente utilizados os solventes orgânicos acetonitrila e metanol, pois possuem baixa viscosidade, miscibilidade completa com água, baixa interferência nos espectros UV (*cut off* do metanol em 205 nm, *cut off* acetonitrila em 190 nm) fornecem melhor formato dos picos e tendem a não reagir com a maioria das amostras [52].

Por fim, a escolha do detector é fundamental para o sucesso da análise, e será determinado pelo objetivo da análise e pelo tipo de amostra. Detectores como

UV, fluorescência, índice de refração e espalhamento de luz evaporativo são os mais comuns utilizados na CLAE [43]. A TABELA 3.3 apresenta os diferentes tipos de detectores e os tipos de compostos que podem ser detectados por cada um deles.

Detector	Tipo de composto que pode ser detectado
UV-Vis e DAD	Compostos que possuem grupos cromóforos (que absorvem na região do UV-Vis), como anéis aromáticos ou múltiplas ligações duplas alternadas.
Fluorescência	Compostos fluorescentes (que absorvem luz UV e emitem luz visível), com anéis fundidos.
Condutividade	Compostos com cargas, como íons inorgânicos e ácidos orgânicos.
Eletroquímico	Compostos oxidáveis, como quininos e aminas.
Índice de refração e por espalhamento de luz evaporativo	Compostos que não possuem características utilizáveis pelos outros detectores, como polímeros e sacarídeos.

TABELA 3.3 – Diferentes tipos de detectores e os compostos que podem ser detectados. Adaptado de SADAPHA [44]

Definir o objetivo da análise e conhecer as características físico-químicas do analito vão permitir um desenvolvimento robusto do método analítico, garantindo eficiência, reprodutibilidade e exatidão nos resultados gerados.

3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

A espectrometria de massa é uma técnica analítica qualitativa e quantitativa altamente eficaz usada para identificar e quantificar compostos. O espectrômetro de massas é capaz de separar espécies ionizadas, como átomos e moléculas, usando diferenças nas proporções de suas cargas para suas respectivas massas

(massa/carga ou m/z) e são utilizados para determinar o peso molecular exato dessas espécies [53].

O espectrômetro de massas consiste em módulos: fonte de ionização, analisador de massas, detector e um sistema de aquisição de dados. A fonte de ionização é o componente responsável por converter moléculas neutras em íons gasosos, que podem então ser analisados pelo espectrômetro de massas, onde campos elétricos serão usados para acelerar os íons e guiá-los para o analisador de massas; o analisador de massas classifica os íons de acordo com valores de m/z através de campos eletromagnéticos; o detector mede e armazena os valores e é capaz de fornecer dados para calcular os íons presentes e faz a conversão para um espectro, o sistema de aquisição de dados gerencia os dados obtidos através do detector [53]. A FIGURA 3.8 esquematiza um espectrômetro de massas [54].

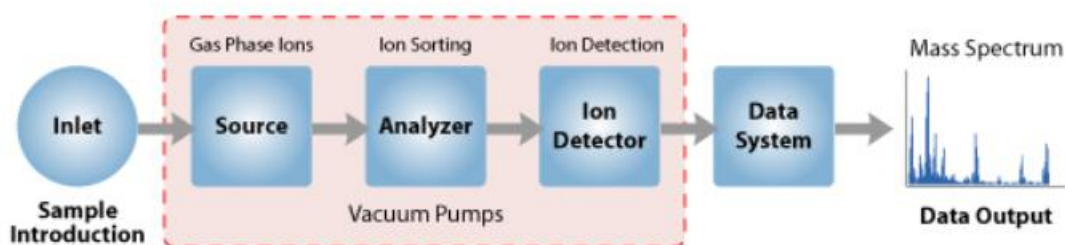


FIGURA 3.8 – Esquema de um espectrômetro de massas

O cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia, como alta seletividade e eficiência de separação, com vantagens da espectrometria de massas que permite a obtenção de informação estrutural e massa molecular, além de garantir um aumento da seletividade [55].

3.6.1 FONTES DE IONIZAÇÃO

A conversão do analito de interesse da fase líquida ou sólida em espécies ionizadas em fase gasosa é a primeira etapa em uma análise por espectrometria de massas. Há uma variedade de técnicas de ionização e alguns fatores precisam ser considerados para a escolha mais adequada, como as propriedades físico-químicas do analito que será ionizado e a energia interna que será transferida durante o processo de ionização [56].

Algumas técnicas de ionização são muito enérgicas e causam extensa fragmentação (hard ionization), enquanto outras são mais suaves e produzem apenas íons das espécies moleculares (soft ionization). A ESI e MALDI são técnicas de soft ionization que são capazes de ionizar analitos com pouca ou nenhuma fragmentação. Já a EI é uma técnica de hard ionization, e resulta em forte fragmentação do analito [57].

3.6.1.1 Electron ionization (EI) – Ionização por elétrons

A ionização por elétrons é uma técnica de ionização que envolve alta energia (aproximadamente 70 eV) comumente usada em análises por CG-MS, empregada para moléculas orgânicas pequenas, voláteis e termicamente robustas. Por induzir fragmentação intensa, os íons moleculares nem sempre são observados [57].

Esta fonte de ionização consiste em um filamento aquecido que emite elétrons, onde os elétrons são acelerados em direção a um ânodo e colidem com as moléculas gasosas da amostra analisada, conforme representado na FIGURA 3.9. Se um elétron transfere energia suficiente para a molécula, a excitação eletrônica pode ocorrer com a expulsão de um elétron, gerando íons positivos e fragmentos iônicos [58].

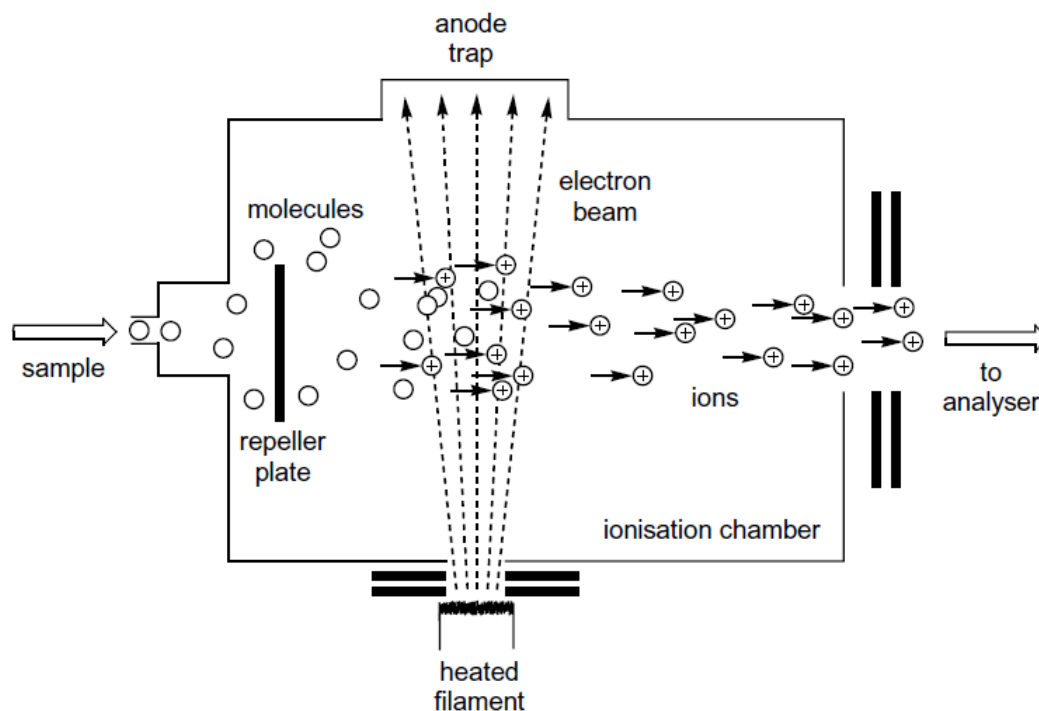


FIGURA 3.9 – Fonte de ionização por elétrons [59]

Embora a fragmentação possa afetar a detecção do íon molecular, ela é geralmente considerada vantajosa, por ser altamente reprodutível e oferecer informações estruturais valiosas [60].

3.6.1.2 Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) – Ionização química à pressão atmosférica

Na ionização química (CI), as moléculas do analito reagem com íons na fase gasosa para gerar um íon do analito por meio da transferência de uma espécie carregada entre reagentes. A ionização química à pressão atmosférica é uma variante que opera em pressão atmosférica. Uma fonte APCI é compatível com um espectrômetro ESI e, dessa forma, o instrumento pode ter a capacidade de alternar entre os modos APCI e ESI de forma bastante simples, e sondas de dupla finalidade já são comercializadas por muitos fabricantes de espectrômetros de massas [59].

Na APCI, a solução do analito é introduzida na fonte de ionização através de uma agulha nebulizadora, por meio de uma descarga corona. A solução líquida é convertida em aerossol finamente disperso, usando um gás nebulizador. A nebulização é fundamental para aumentar a superfície de contato entre amostra e o gás ionizante. Um feixe de elétron de alta energia (aproximadamente 70 eV) colide com as moléculas do gás reagente, gerando íons positivos ou radicais, que vão interagir com as moléculas da amostra. Os íons protonados ou radicais positivos gerados a partir do gás reagente transferem carga para as moléculas da amostra, gerando íon de amostra carregado. É adequada para uma ampla gama de compostos, incluindo moléculas menos polares e apolares e compostos voláteis e semivoláteis [61].

3.6.1.3 Atmospheric pressure photoionization (APPI) – Fotoionização química à pressão atmosférica

A fotoionização química à pressão atmosférica usa fótons para excitar e ionizar moléculas após a nebulização. A amostra em solução é vaporizada por um nebulizador aquecido semelhante ao usado em APCI. Após a vaporização, o analito interage com fótons emitidos por uma lâmpada de descarga. Esses fótons induzem uma série de reações em fase gasosa que levam à ionização das moléculas da amostra. A principal diferença com a APCI é o uso de uma lâmpada de descarga que emite fótons em vez da agulha de descarga corona que emite elétrons [57] [62].

A energia dos fótons é escolhida para minimizar a ionização simultânea de solventes e gases da fonte de íons. A técnica também fornece íons predominantemente carregados individualmente e tem o potencial de ionizar compostos apolares, pequenas moléculas e que são termicamente estáveis que não são bem ionizadas pela ESI [62] [63]. O esquema da APPI está representado na FIGURA 3.10.

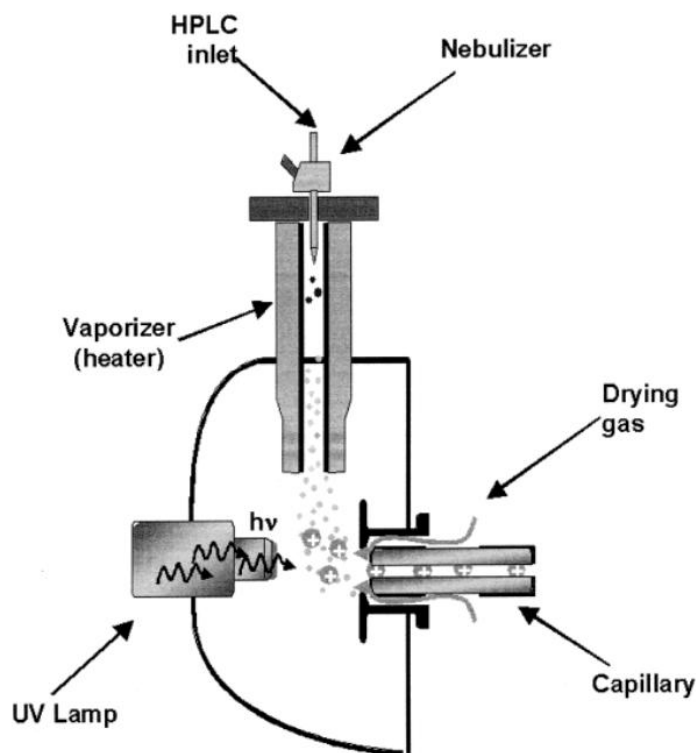


FIGURA 3.10 – Fonte por fotoionização química à pressão atmosférica [64]

3.6.1.4 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) – Ionização por laser assistida por matrix

Na ionização por laser assistida por matrix o analito é misturado em um solvente contendo em solução pequenas moléculas orgânicas, chamada de matrix, no qual essas moléculas devem ter uma forte absorção no comprimento de onda do laser. Essa mistura é seca antes da análise e qualquer solvente líquido usado na preparação da solução é removido, resultando em um depósito de cristais de matrix dopados com analito. As moléculas do analito são incorporadas em toda a matrix para que fiquem completamente isoladas umas das outras [57].

A irradiação pelo laser induz o rápido aquecimento dos cristais pelo acúmulo de uma grande quantidade de energia na fase condensada por meio da excitação das moléculas da matrix, que ocorre sob condições de vácuo dentro da fonte do espectrômetro de massas. O aquecimento rápido causa sublimação localizada dos

cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície do cristal e expansão da matriz para a fase gasosa, arrastando o analito intacto na pluma da matriz em expansão. Entre as vias de ionização química e física sugeridas para MALDI estão a fotoionização em fase gasosa, transferência de prótons em estado excitado, reações íon-molécula, dessorção de íons pré-formados, e assim por diante [65].

O mecanismo de formação de íons mais aceito envolve transferência de prótons na fase sólida antes da dessorção ou transferência de prótons na fase gasosa na pluma em expansão de moléculas de matriz fotoionizadas. Os íons na fase gasosa são então acelerados por um campo eletrostático em direção ao analisador, conforme representado na FIGURA 3.11. A principal vantagem da MALDI é que o processo de ionização produz principalmente íons carregados individualmente, de modo que até mesmo misturas bastante complexas podem ser examinadas, sendo utilizada para biomoléculas grandes como proteínas e ácidos nucleicos [66].

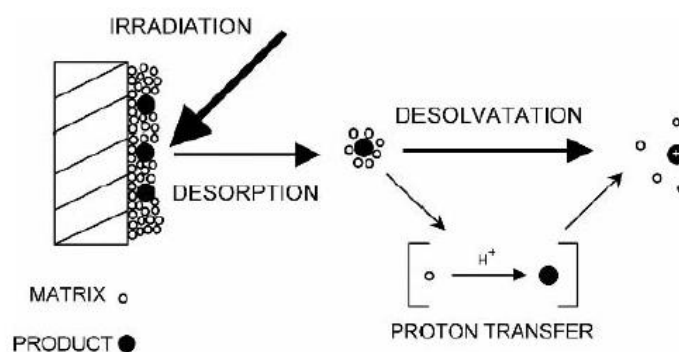


FIGURA 3.11 – Esquema da fonte de ionização por laser assistida por matriz [57]

3.6.1.5 Electrospray ionization (ESI) – Ionização por eletrospray

A ionização por eletrospray utiliza energia elétrica para auxiliar a transferência de íons da solução para a fase gasosa antes de serem conduzidos aos analisadores de massas. Para que as espécies iônicas da solução sejam transferidas para a fase gasosa, é preciso que ocorra a dispersão de um spray fino

de gotículas carregadas, seguido pela evaporação do solvente e ejeção de íons das gotículas carregadas [67].

Na fonte de ESI, um fluxo contínuo de solução de amostra é passado através de um tubo capilar que é mantido em alta voltagem (por volta de 3,0 a 6,0 kV) em relação à parede da câmara circundante. Quando a voltagem é suficientemente alta, a solução na agulha sofre um fenômeno chamado cone de Taylor, onde as gotículas de solvente se deformam devido à força da tensão superficial e da eletricidade, formando um cone de gotículas carregadas na ponta da agulha. Uma névoa de gotículas altamente carregadas com a mesma polaridade que a voltagem capilar é gerada, e há a aplicação de um gás nebulizador (por exemplo, nitrogênio), que cisalha ao redor da solução de amostra eluída.

As gotículas carregadas, geradas na saída da ponta do eletrospray, passam por um gradiente de pressão e gradiente de potencial em direção à região do analisador do espectrômetro de massa. Com o auxílio de uma temperatura elevada da fonte ESI e/ou outro fluxo de gás de secagem de nitrogênio, as gotículas carregadas são continuamente reduzidas em tamanho pela evaporação do solvente, levando a um aumento da densidade de carga da superfície e uma diminuição do raio da gotícula.

A repulsão de cargas dentro da gotícula, devido a intensidade do campo elétrico dentro da gotícula carregada, atinge um ponto crítico no qual a gotícula explode e há a formação de gotículas menores ainda. À medida que as gotículas diminuem de tamanho, a carga nas gotículas se acumula e, eventualmente, a força de Coulomb (a repulsão entre as cargas) supera a tensão superficial da gotícula, levando à formação de *sprays* de íons. O processo de evaporação do solvente continua até que um único íon carregado seja formado e conduzido aos analisadores de massas [59] [68] [69]. O processo ESI está representado na FIGURA 3.12.

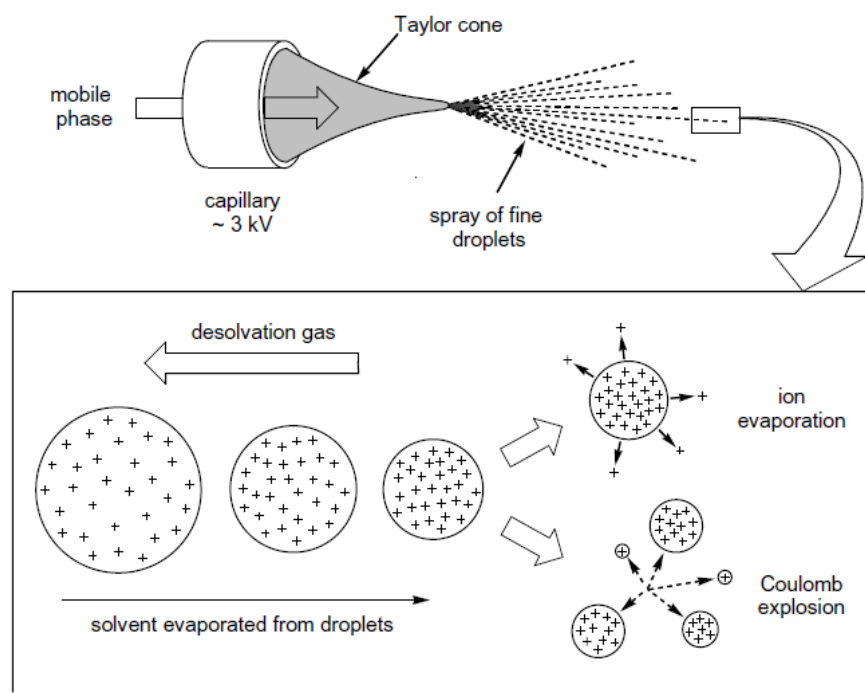


FIGURA 3.12 – Processo de ionização por eletrospray [59]

A ESI é utilizada para compostos polares e moléculas biológicas, desde pequenos fármacos até polímeros e biomoléculas [70].

3.6.2 ANALISADORES DE MASSAS

Após o processo de ionização, os íons são transmitidos aos analisadores de massas, onde serão separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Para que isso ocorra, são empregados campos elétricos e magnéticos, que vão permitir a discriminação entre íons de diferentes razões m/z [71].

Assim como as fontes de ionização, há diferentes tipos de analisadores de massas para atender as necessidades específicas de cada tipo de análise. A escolha do analisador de massas vai depender do objetivo da análise, da resolução, precisão e sensibilidade pretendida. Dentre eles, podemos citar os analisadores quadupolo, ion trap, orbitrap, tempo de voo e por ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier, além dos analisadores de massas híbridos, que combinam dois ou mais tipos de analisadores de massas em um único sistema, como o quadupolo tempo de voo. O sistema híbrido supera as limitações de cada analisador isolado, aproveitando as vantagens das diferentes tecnologias de separação de íons para melhorar o desempenho da análise, como aumento de resolução, sensibilidade, capacidade de fragmentação e a flexibilidade para análise de diferentes tipos de amostras. Dessa forma, cada tipo de analisador tem suas próprias vantagens e limitações, que tornam alguns mais adequados para determinadas situações e experimentos [72].

Durante a escolha de um analisador de massas, a resolução de massa é um parâmetro fundamental, pois determina a capacidade do instrumento em diferenciar e identificar com precisão compostos com massas muito próximas. É definido como $m/\Delta m$, onde m é a massa nominal de uma dada molécula e Δm é a diferença entre as massas exatas das moléculas. A resolução (R) é o valor obtido do cálculo de $m/\Delta m$ [73] [74]. A FIGURA 3.13 ilustra o efeito do aumento da resolução na diferenciação de íons com massa nominal de 130 Da e em mesma concentração (massas monoisotópicas: 130,0266, 130,0630 e 130,1722 m/z , respectivamente), é possível observar que quanto maior o poder de resolução do equipamento, os íons conseguem ser diferenciados e apresentados de forma independente no espectro de massas. Em baixa resolução (por exemplo, quadupolo, com resolução de 1000)

não é possível discriminar os três íons, e apenas um pico é observado no espectro de massas. Em resolução ligeiramente maior (por exemplo, quadrupolo em modo de resolução máxima, com resolução de 2500), o íon de m/z é diferenciado, mas os dois outros íons aparecem como um pico apenas. Em resolução mais alta (por exemplo, TOF com refletor, com resolução de 5000), é possível observar os três íons, mas apenas em alta resolução (por exemplo, TOF de alta resolução, com resolução de 10000) os três íons estão bem discriminados e bem resolvidos [59].

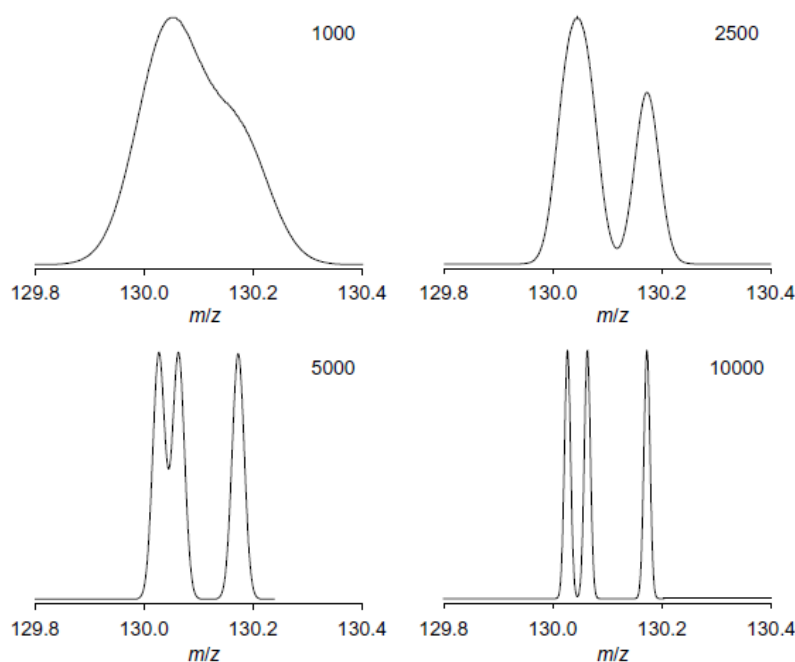


FIGURA 3.13 – Aumento da resolução na diferenciação de íons com razão m/z próximas [59]

A resolução afeta diretamente a qualidade da análise, seja para identificação, quantificação, ou caracterização de moléculas. Quando se escolhe um analisador, é necessário considerar as necessidades específicas da aplicação, equilibrando a resolução com outros fatores como sensibilidade, velocidade, custo e complexidade da amostra.

3.6.2.1 Quadrupole (Q) – Quadrupolo

O quadrupolo é um analisador de massas que consiste em quatro hastes condutoras paralelas de seção transversal hiperbólica espaçadas em torno de um eixo central ao longo do qual os íons são conduzidos. As hastes são conectadas a geradores de radiofrequência (RF) e corrente contínua (CC), e as hastes adjacentes são de fase de RF oposta. Para um determinado conjunto de potenciais de RF e CC, apenas íons dentro de uma faixa estreita de m/z terão uma trajetória estável e atingirão o detector; todos os outros íons atingirão as hastes e serão neutralizados. No modo de varredura de massa total, a amplitude de RF e a tensão CC são varridas, mantendo uma proporção constante, de modo que os íons com m/z crescente atinjam o detector. No entanto, uma desvantagem do modo de varredura de massa total é que os íons de cada m/z passam apenas um tempo muito curto no analisador e, portanto, apenas uma pequena fração realmente atinge o detector por ciclo de varredura. Para melhorar a sensibilidade, o monitoramento de íons selecionados pode ser usado, no qual as tensões de RF e CC para íons específicos de interesse são aplicadas. Como uma menor quantidade de íons em uma determinada faixa de m/z são escaneados durante um determinado ciclo de escaneamento, uma proporção maior de íons de m/z alvo atinge o detector, levando a uma sensibilidade aumentada [75] [76]. O analisador quadrupolar está representado na FIGURA 3.14.

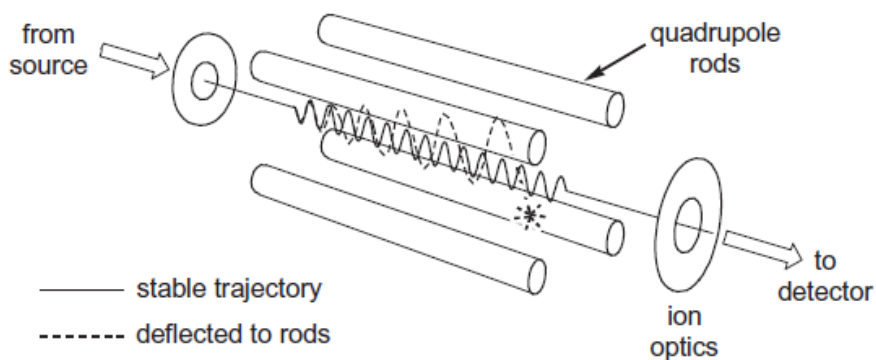


FIGURA 3.14 – Esquema de um analisador quadrupolar [59]

Uma vantagem do analisador quadrupolo é seu baixo custo e tamanho compacto. São robustos e exigem pouca manutenção, e possuem excelente estabilidade por longos períodos, reduzindo a necessidade de calibrações frequentes. No entanto, os analisadores quadrupolo abrangem faixas de massa limitadas e baixa resolução, colocando-o em desvantagem ao analisar compostos de alto peso molecular, que podem não formar íons com múltiplas cargas ou com misturas complexas de compostos com massas semelhantes [72].

3.6.2.2 Ion trap (IT) – Armadilha de íons

O analisador de massas armadilha de íons utiliza um campo elétrico oscilante para armazenar íons, funcionando com um campo quadrupolar de RF que captura íons em duas ou três dimensões, podendo ser classificado como 2D (linear) ou 3D. As armadilhas 3D, inicialmente desenvolvidas, possuem um eletrodo circular com tampas elipsoides, formando um campo quadrupolar 3D. As armadilhas 2D, por sua vez, consistem em um quadrupolo de quatro hastes e lentes que refletem os íons, confinando-os radialmente e axialmente. Íons com diferentes m/z ficam presos na armadilha e, ao variar o potencial de RF, são liberados de acordo com suas massas para serem detectados. Para evitar a perda de íons devido à expansão de suas trajetórias, mantém-se uma pressão de gás hélio na armadilha para remover o excesso de energia dos íons. [77] [78]. O analisador de massas armadilha de íons está representado na FIGURA 3.15.

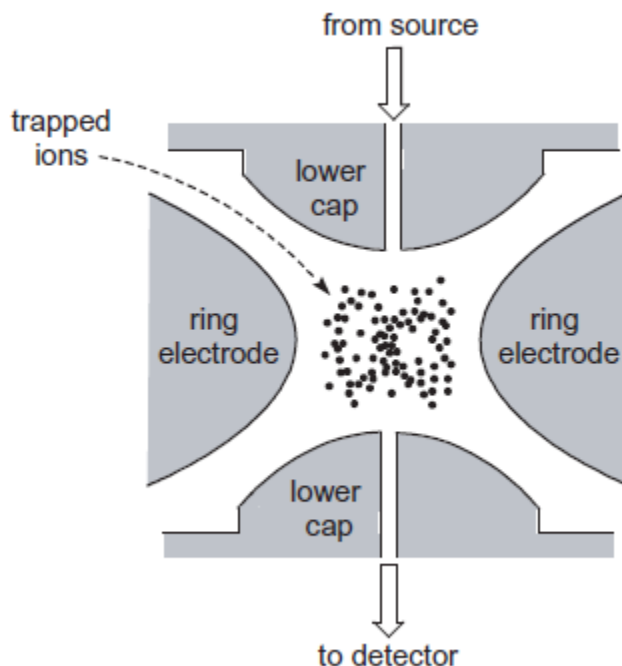


FIGURA 3.15 – Esquema de um analisador armadilha de íons [59]

As armadilhas de íons possuem uma boa sensibilidade devido a sua capacidade de armazenar os íons. São capazes de realizar experimentos de MS^n , que são ciclos repetidos de MS/MS , onde um íon gerado é selecionado e fragmentado, um dos fragmentos é selecionado e fragmentado novamente, e esse processo pode ser repetido. Experimentos de MS/MS são obtidos mantendo-se apenas íons de uma certa razão m/z na armadilha, ejetando seletivamente todos os outros. Os íons restantes são energizados e fragmentados por CID (colisão induzida por dissociação) com gás inerte. A CID ocorre quando parte da energia translacional de um íon acelerado é convertida em energia interna após a colisão com um gás residual, induzindo a fragmentação do íon. Os íons de fragmentos são então escaneados para gerar um espectro de massa de íons produtos. MS^3 é obtido ejetando da armadilha todos os íons de fragmentos, exceto o de interesse, repetindo o ciclo de colisão e varredura [56] [59] [79].

Instrumentos modernos são capazes de fragmentar progressivamente os íons ao longo de 10 ciclos (MS^{10}), embora a perda de íons em cada estágio geralmente limite o experimento a não ir muito além de MS^3 ou MS^4 . Isso ocorre

porque, à medida que os estágios avançam, os espectros se tornam progressivamente mais pobres em informações e podem se tornar incoerentes. É um analisador pequeno, compacto e de baixo custo, quando comparado com outros analisadores de massas. Tem como desvantagem seu baixo poder de resolução de massas [56] [59].

3.6.2.3 Orbitrap – Armadilha de íons

O analisador de massas orbitrap é uma versão avançada do ion trap, sendo capaz de realizar medições com elevada sensibilidade e resolução. Utiliza um campo elétrico para capturar íons e medir suas razões m/z de maneira extremamente precisa. Sua principal característica é o movimento orbital dos íons, que se movem em torno de um eixo central. À medida que os íons se movem ao redor do eletrodo central, um campo elétrico oscilante é gerado, o que induz uma corrente elétrica detectada por eletrodos periféricos. O tempo que cada íon leva para completar uma órbita depende de sua razão m/z . Possui alto custo como desvantagem, além de maior complexibilidade do sistema e limitações em relação ao número de íons selecionados [80].

3.6.2.4 Time-of-Flight (TOF) – Tempo de voo

Após a aceleração inicial dos íons por meio de um campo elétrico, o analisador de tempo de voo separa os íons com base em suas velocidades enquanto se deslocam através de uma região livre de campo, conhecida como tubo de voo. Os íons são acelerados em direção do tubo de voo por uma diferença de potencial aplicada entre um eletrodo e a grade de extração. Como todos os íons adquirem a mesma energia cinética, íons caracterizados por uma distribuição de suas massas apresentam uma distribuição de suas velocidades. Ao deixar a região de aceleração, eles entram em uma região livre de campo onde são separados de acordo com suas velocidades, antes de atingir o detector posicionado na outra extremidade do tubo de voo. As relações m/z são determinadas medindo o tempo

que os íons levam para se mover através de uma região livre de campo entre a fonte e o detector. Dessa forma, íons que possuem m/z menores chegarão mais rápido ao detector do que íons que possuem m/z maior [81], conforme apresentado na FIGURA 3.16.

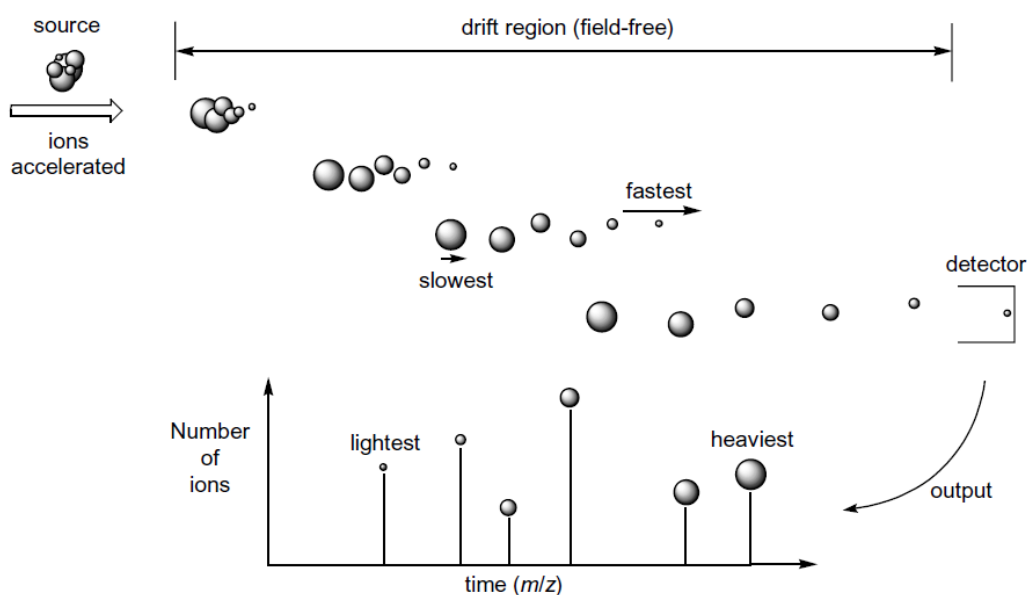


FIGURA 3.16 – Esquema dos íons sendo detectados por um analisador por tempo de voo [59]

Para melhorar a resolução de massa do TOF, foi introduzido o refletor (reflectron), ou espelho de íons, que compensa a propagação da energia cinética dos íons da fonte ao refletir os íons de volta ao longo do mesmo caminho de voo antes da detecção. O refletor é um dispositivo óptico de íon no qual os íons interagem com um espelho iônico eletrônico e seu voo é revertido. Íons com energias cinéticas maiores penetram mais profundamente no refletor do que íons com energias cinéticas menores. Se um pacote de íons de uma dada razão m/z contiver íons com energias cinéticas variáveis, então o refletor diminuirá a dispersão nos tempos de voo dos íons e, portanto, melhorará a resolução do espectrômetro de massa de tempo de voo [82] [83], conforme representado na FIGURA 3.17.

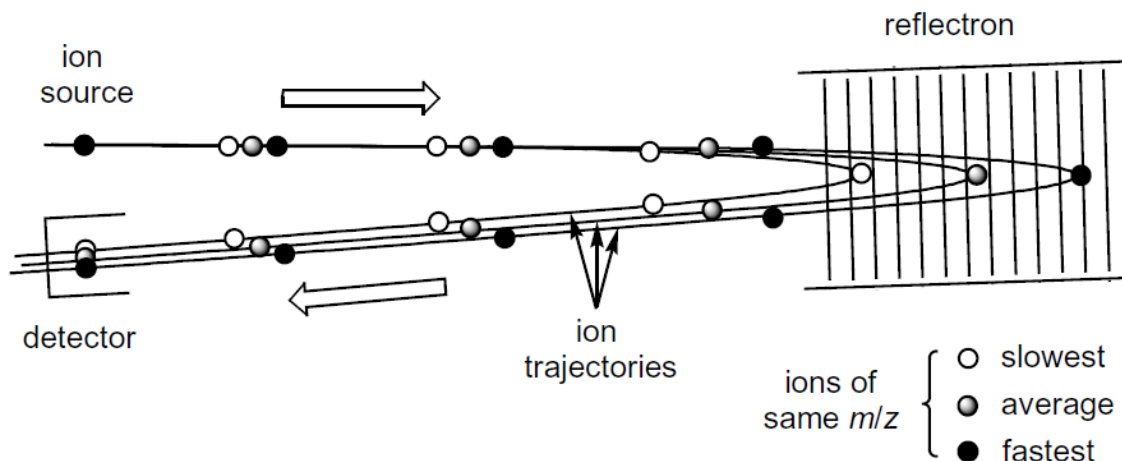


FIGURA 3.17 – Esquema de um refletor de íons [59]

As vantagens do TOF incluem a faixa de massa ilimitada do analisador, onde os únicos limites na faixa de massa são impostos pela fonte de íons e pelo detector; alta velocidade de aquisição, alta precisão de massa, resolução moderada a alta e sensibilidade moderada a alta [84].

3.6.2.5 Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) - Ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier

No analisador ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier os íons são desviados para um caminho circular quando se movem perpendicularmente a um campo magnético. Os instrumentos FTICR operam em campos muito altos, fornecidos por grandes ímas supercondutores, onde os íons podem ficar presos em uma órbita circular devido a influência desse campo. Essa órbita representa o movimento do cíclotron e a frequência do íon em órbita é característica de sua massa, em que íons de m/z menores se distanciarão de íons com m/z maiores [85].

Os espectrômetros de massas com analisador FTICR oferecem resolução e precisão de massa superior a qualquer outro analisador disponível no mercado, e são capazes de capturar íons por períodos prolongados e medi-los de forma não destrutiva, além de realizar experimentos de múltiplas fragmentações. Possui custo

elevado e alta complexidade operacional, limitando seu acesso na rotina laboratorial [59].

3.6.2.6 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) – Quadrupolo tempo-de-voo

O quadrupolo tempo-de-voo combina os benefícios de dois analisadores de massas. A alta eficiência de fragmentação de compostos do quadrupolo combinada com a rápida velocidade de análise e alta capacidade de resolução do tempo-de-voo, fez com que esse analisador híbrido fosse rapidamente adotado pela comunidade analítica como um instrumento robusto e poderoso para diversas aplicações [86].

A instrumentação do Q-TOF se assemelha muito à de um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo, embora o terceiro quadrupolo tenha sido substituído por um tubo de tempo de voo. O primeiro quadrupolo (Q1) é capaz de operar como um filtro de massa para a seleção de íons específicos com base em sua razão m/z , ou no modo somente de RF (radiofrequência) ou *full scan*, onde todos os íons são transmitidos através do quadrupolo. O segundo quadrupolo (Q2) atua como uma célula de colisão onde os íons são bombardeados por moléculas de gás neutro, como nitrogênio ou argônio, resultando na fragmentação dos íons através da CID. O Q2 também pode atuar no modo somente RF sem fragmentação subsequente de íons.

Após deixar o quadrupolo, os íons são reacelerados para a região do modulador de íons do analisador de tempo de voo, onde são pulsados por um campo elétrico e acelerados ortogonalmente à sua direção original. Todos os íons que adquiriram a mesma energia cinética agora entram no tubo de voo, que é uma região de deriva livre de campo, onde ocorre a separação de massa. Os íons que exibem uma massa mais leve terão um tempo de voo mais curto, enquanto os íons mais pesados levarão mais tempo para percorrer o caminho de voo em direção ao detector [87]. O esquema do Q-TOF está representado na FIGURA 3.18.

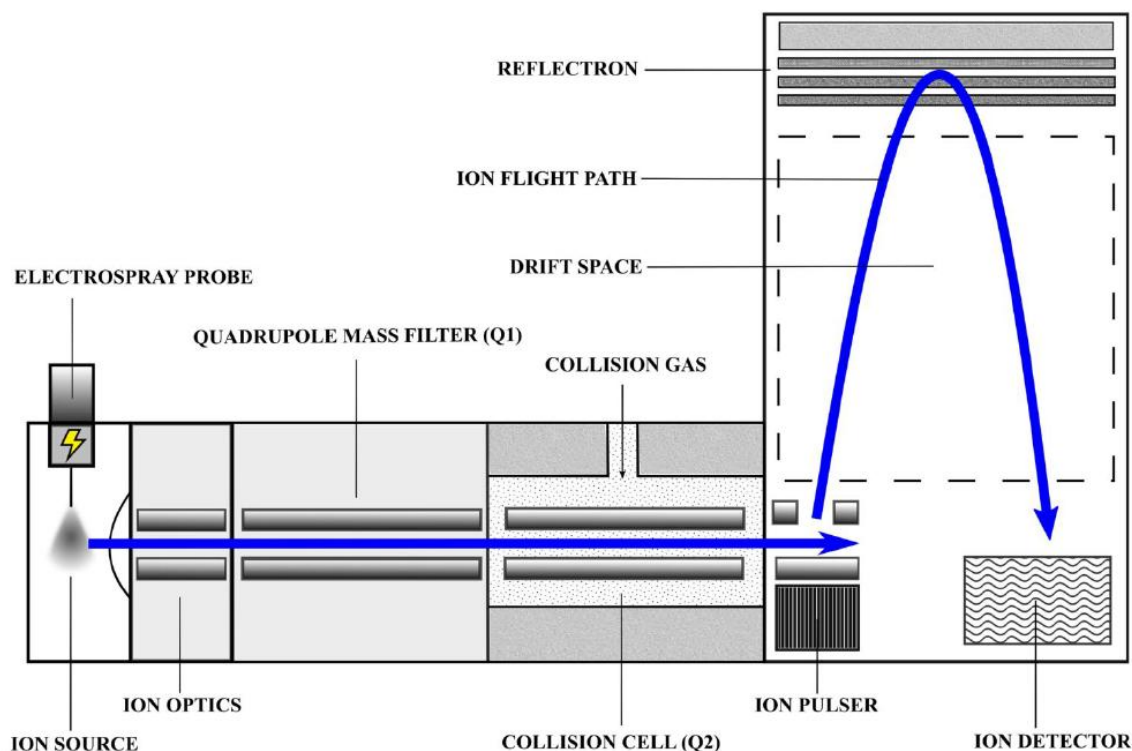


FIGURA 3.18 – Esquema de um quadropolo tempo-de-voo [86]

Os instrumentos Q-TOF permitem uma medição de massas precisas dentro de 5 ppm, valor aceito em literatura para MS e de 15 ppm para MS/MS, e que pode colaborar na verificação da composição elementar [56] [88]. A precisão de massa em um espectrômetro de massas consiste na diferença entre a massa calculada de um íon e sua massa observada, $\Delta m = m_{\text{calculada}} - m_{\text{observada}}$, expresso em relação a massa observada. Geralmente é relatada em ppm [59]:

$$\text{Precisão de massa (ppm)} = 10^6 \times \Delta m / m_{\text{observada}}$$

Para atingir dados de massa precisos, os instrumentos precisam de calibração e ajuste frequente, para assegurar que o espectrômetro de massas forneça medidas exatas de massas dos íons analisados, permitindo a manutenção da qualidade, confiabilidade e precisão das análises [56] [88].

3.6.3 DETECTORES

Após a separação dos íons pelos analisadores de massas, a abundância de íons para cada valor de m/z será medida através do detector. Há diversos tipos de detectores, e sua escolha vai depender do design do instrumento e das aplicações analíticas que serão realizadas. Alguns detectores são feitos para contar íons de uma única massa por vez e detectam a chegada de todos os íons sequencialmente em um ponto (coletores de íons pontuais) e outros detectores têm a capacidade de contar várias massas e detectar a chegada de todos os íons simultaneamente ao longo de um plano [56]. Os principais tipos de detectores são explicados brevemente a seguir.

3.6.3.1 Detector de placa fotográfica

O detector de placa fotográfica consiste em placas sensíveis a íons, inseridas na região de vácuo do MS para detecção direta de íons. Íons que compartilham a mesma razão m/z alcançam a placa no mesmo lugar e a posição dos pontos permite a determinação de seus valores m/z após a calibração, sendo que a intensidade da marca no filme é proporcional à abundância dos íons [89] [90].

Possui desvantagens como sensibilidade baixa a moderada, uma faixa dinâmica linear curta, desenvolvimento de imagem em câmara escura, baixa precisão e fragilidade. Devido esses e outros fatores, como a diversidade de detectores disponíveis e mais precisos e sensíveis, esse tipo de detector não é comumente utilizado nos dias de hoje [90].

3.6.3.2 Detector copo de Faraday

O detector copo de Faraday é um copo cilíndrico de metal com um pequeno orifício. Os íons alcançam o interior do cilindro e são neutralizados ao aceitar ou doar elétrons conforme eles atingem as paredes, levando corrente através de um resistor. A corrente de descarga é amplificada e detectada, fornecendo uma medida da abundância de íons. Como a carga associada a um elétron que sai da parede do detector é idêntica à chegada de um íon positivo neste detector, os elétrons secundários que são emitidos quando um íon atinge a parede do detector são uma fonte importante de erros se não forem suprimidos. Conseqüentemente, a precisão deste detector pode ser melhorada ao evitar a fuga de íons refletidos e elétrons secundários ejetados. Vários dispositivos foram usados para capturar íons de forma eficiente e minimizar as perdas de elétrons secundários [91].

As desvantagens deste detector simples e robusto são a baixa sensibilidade e seu tempo de resposta lento. Esses detectores são, no entanto, muito precisos porque a carga no cilindro é independente da massa, da velocidade e da energia dos íons detectados [56].

3.6.3.3 Multiplicadores de elétrons

Atualmente, o detector de íons mais utilizado em espectrometria de massas é o multiplicador de elétrons (EM), onde os íons do analisador são acelerados a uma alta velocidade para aumentar a eficiência da detecção, obtido através de eletrodo chamado dínodo de conversão em um alto potencial, de 3 a 30 kV, oposto à carga dos íons detectados. O processo físico básico que permite que um multiplicador de elétrons opere é chamado de emissão secundária de elétrons. Um íon positivo ou negativo atingindo o dínodo de conversão causa a emissão de várias partículas secundárias, que podem incluir íons positivos, íons negativos, elétrons e neutros. Quando íons positivos atingem o dínodo de conversão de alta voltagem negativo, as partículas secundárias de interesse são íons negativos e elétrons. Quando íons negativos atingem o dínodo de conversão de alta voltagem positivo,

as partículas secundárias de interesse são íons positivos. Essas partículas secundárias são convertidas em elétrons no primeiro dínodo, que são então amplificadas por um efeito cascata no multiplicador de elétrons para produzir uma corrente [56] [92], representado na FIGURA 3.19.

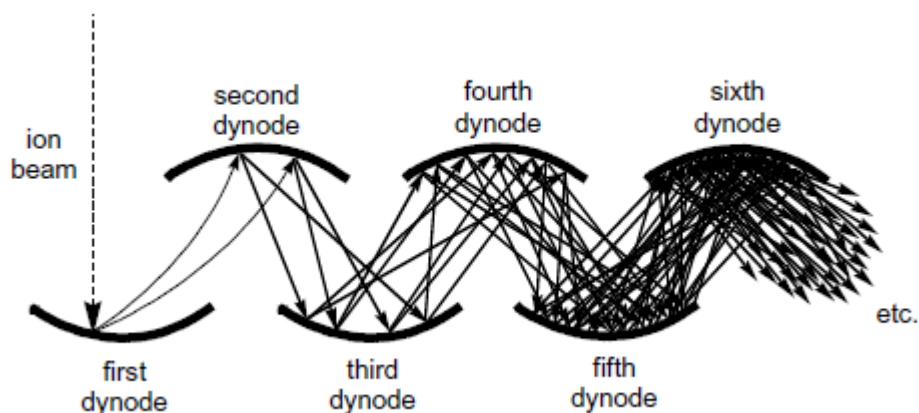


FIGURA 3.19 – Esquema de um detector multiplicador de elétrons [59]

As vantagens do multiplicador de elétrons, utilizado no modo de corrente ou contagem de pulsos, são o alto ganho, ruído relativamente baixo e faixa dinâmica linear relativamente alta. Possui bom tempo de vida útil de armazenamento e operação, podendo ser utilizado em uma ampla variedade de aplicações e designs de instrumentos [90].

3.6.3.4 Criodetectores

Os detectores criogênicos operam detectando excitações de rede em filmes finos supercondutores. Quando uma partícula ou íon colide em uma superfície, energia é depositada; calor é gerado; e nêutrons, íons, elétrons e fótons são pulverizados. Com um detector convencional em uma temperatura normal, o aumento de temperatura associado a este processo é indiscernível. No entanto, com um detector pequeno em uma temperatura muito baixa (<3 K), o aumento instantâneo de temperatura após o impacto da partícula pode ser medido e pode

fornecer informações sobre a taxa de chegada e a energia do íon. Todos os íons incidentes depositam alguma energia na forma de rupturas de rede e calor [90].

Em contraste com detectores, como o multiplicador de elétrons, que são marcadamente menos eficientes na geração de elétrons secundários de íons biomoleculares maiores e complexos, os criodetectores não apresentam queda na resposta em massa alta. O interesse recente em usar criodetectores para MS foi fortemente motivado pelo desejo de melhorar a detecção de medição, sensibilidade e uniformidade de resposta para biomoléculas muito grandes [93].

4 – PARTE EXPERIMENTAL

4.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE POR DEGRADAÇÃO FORÇADA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO SECO

O estudo de degradação forçada e análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) foram realizados no Centro de Desenvolvimento Integrado (CDI) da Libbs Farmacêutica, localizado em Embu das Artes, São Paulo.

Para utilização durante a rotina do Controle de Qualidade e Estabilidade, foi desenvolvido, previamente a este projeto, um método indicativo de estabilidade, validado de acordo com a RDC nº 166 de 2017, para quantificação da carboplatina e seus produtos de degradação através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando duas colunas analíticas em série: Zorbax SB. A fase móvel consiste em tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,55 e acetonitrila, em um gradiente de eluição.

O método utilizado para identificar e separar as impurezas desconhecidas provenientes do estudo de degradação da carboplatina foi desenvolvido para este projeto através de cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (Waters® modelo Acquity) acoplada ao espectrômetro de massas em tandem (LC-MS/MS) com fonte de ionização por electrospray (ESI) e analisadores quadrupolo e tempo de voo (QTOF, Waters® modelo Xevo G2 XS). Devido a incompatibilidade da fase móvel utilizada nas análises de rotina para análises por espectrometria de massas, foi preciso adequar a fase móvel para um componente volátil, sendo o ácido fórmico o solvente de escolha, juntamente com metanol, ambos da Merck® grau LC-MS, com a coluna analítica Synergi Hydro-RP, 4 µm, 250,0 mm e 4,6 mm.

O estudo de degradação do IFA, placebo e medicamento foi realizado conforme a RDC nº 53 de 2015, nas condições demonstradas na TABELA 4.4.

Condição de estresse	Agente estressante	Condição de estresse empregada	
		IFAs	Produto
			Placebo
Ácida	Solução HCl 0,01 M	Temperatura ambiente 23 horas	
Alcalina	Solução NaOH 0,1 M	40 °C 7 horas	
Térmica úmida	Calor e umidade	70 °C/75%U.R. 14 dias	De acordo com o guia da ANVISA, esta condição não precisa ser realizada no caso de formas farmacêuticas líquidas de base aquosa.
Térmica úmida	Calor e umidade	Não realizado	50 °C/90%U.R. 30 dias. Produto lacrado
Térmica seca	Calor	70 °C 14 dias	70 °C 2, 5 e 7 dias
Oxidante peróxido	solução de H ₂ O ₂ 0,30%	T.A. 60 minutos	T.A. 60 minutos
Oxidante radicalar	20 mol% ACVA	40 °C 1 dia	40 °C 1 dias
Oxidação mediada por metais de transição	solução 1 mM de Fe III	25 °C 1 dia	
Fotolítica	luz UV/Visível	2,4 milhões de lux.hora e 400 w.h/m ²	0,3 milhões de lux.hora e 50 w.h/m ² 0,6 milhões de lux.hora e 100 w.h/m ² 1,2 milhões de lux.hora e 200 w.h/m ²

TABELA 4.4 – Parâmetros experimentais utilizados para o estudo de degradação

As condições de estresse foram ajustadas com o intuito de obter uma degradação do ativo superior a 10%, conforme preconizado na RDC Nº 53 de 2015 [12].

Para a identificação das impurezas, um lote do medicamento Fauldcarbo Solução Injetável (lote 20J1072) foi submetido apenas a estresse térmico seco, a 70 °C durante 14 dias, em câmara controlada (Mecalor), para que houvesse maior formação das impurezas de interesse. Apenas esta condição foi empregada para a identificação das impurezas pois é a condição que mais se assemelha ao estudo de

estabilidade do medicamento, onde o perfil de degradação real do medicamento é gerado. Devido às demais condições não serem possíveis de ocorrer durante o tempo de prateleira (*shelf life*) do medicamento, elas não serão avaliadas nesse trabalho.

4.2 AVALIAÇÃO VIA LC-MS-QTOF DOS PRODUTOS PROVENIENTES DE ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO SECO

As análises realizadas para identificar as impurezas e posteriormente elucidar seu mecanismo de formação foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (LC-DAD, Acquity da Waters®) acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS, Xevo G2-XS Q-TOF da Waters®) com fonte de ionização por eletrospray e analisador de massas híbrido Q-TOF (quadrupolo e tempo de voo).

A metodologia utilizada na rotina dos laboratórios para condução do estudo de degradação, estudos de estabilidade e liberação dos lotes pelo controle de qualidade está descrita na TABELA 4.5 e será nomeado como método analítico 1.

Coluna	Zorbax SB
Detector	DAD 220 nm
Fase móvel	Tampão pH 3,55 (Fase móvel A) Tampão pH 3,55 e ACN (Fase móvel B) Em gradiente de eluição
Diluyente	Água ultrapura
Volume de injeção	15 µL
Temperatura da coluna	25° C
Temperatura do amostrador	10° C
Tempo de corrida	95 minutos

Observação: Os dados de coluna e gradiente foram ocultados por questões de sigilo da Libbs Farmacêutica

TABELA 4.5 – Condições cromatográficas do método analítico 1 (LC-DAD)

O gradiente de eluição empregado no método 1 foi ocultado por questões de sigilo da Libbs Farmacêutica.

A metodologia utilizada para a condução dos experimentos desse projeto, que será nomeada como método analítico 2, está descrita na TABELA 4.6.

Coluna	Synergi Hydro-RP 4 μ m, 250 mm x 4,6 mm
Detector	DAD 210 nm
Fase móvel	Ácido fórmico 0,02% (Fase móvel A) Metanol (Fase móvel B) Gradiente, conforme TABELA 4.8
Fluxo	1,0 mL/min
Diluyente	Água ultrapura
Volume de injeção	10 μ L
Temperatura da coluna	35° C
Temperatura do amostrador	10° C
Tempo de corrida	45 minutos

TABELA 4.6 – Condições cromatográficas do método analítico 2 (LC-MS/MS)

O gradiente de eluição empregado no método 2 está descrito na TABELA 4.7.

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	100	0
15	100	0
20	75	25
30	75	25
40	100	0
45	100	0

TABELA 4.7 – Gradiente de eluição empregado no método analítico 2

O modo de ionização utilizado foi ESI, com polaridades de ionização no modo positivo e negativo. Durante as análises, foram ajustadas as condições ideais de

ionização e fragmentação das moléculas, utilizando rampas de energia de colisão e modificando parâmetros de ionização, com a finalidade de observar o íon precursor e os íons produtos no mesmo espectro de massas.

Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas, tanto da fonte de ionização por eletrospray quanto dos parâmetros MS/MS, estão descritos na TABELA 4.8.

ESI	Voltagem do capilar	3 kV
	Voltagem do cone	30 V
	Fluxo do gás do cone	50 L/h
	Gás do cone	Nitrogênio
	Temperatura da fonte	150° C
	Temperatura de dessolvatação	600° C
	Fluxo do gás de dessolvatação	800 L/h
	Gás de dessolvatação	Argônio
MS/MS	Range de massa - Scan	50 – 1200 <i>m/z</i>
	Energia de fragmentação	Rampa 10 – 30 V

TABELA 4.8 – Parâmetros do espectrômetro de massas

Para a condução dos testes, um padrão de carboplatina foi preparado em concentração de 0,01 mg/mL. As amostras de carboplatina foram preparadas a uma concentração de 1,0 mg/mL utilizando-se água ultrapura como solvente, obtida em sistema Milli-Q (Merck®).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRÃO DE CARBOPLATINA

O cromatograma do padrão de carboplatina obtido em HPLC-UV em 210 nm está representado na FIGURA 5.20.

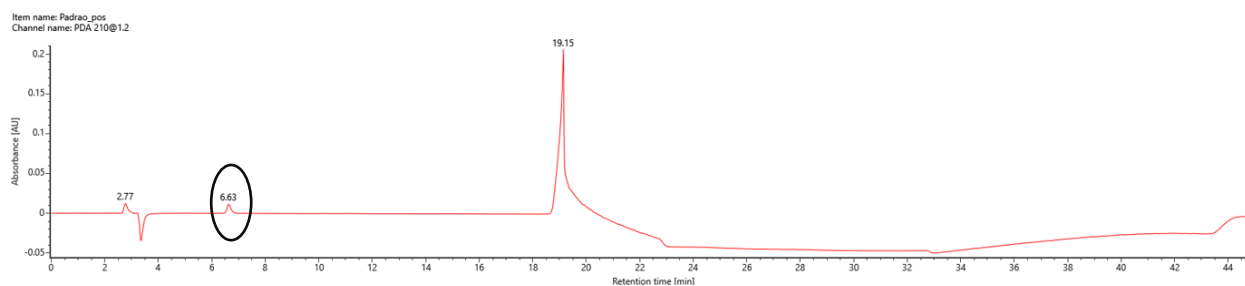


FIGURA 5.20 – Cromatograma do padrão de carboplatina em HPLC-UV em 210 nm

É possível observar o pico da carboplatina no tempo de retenção 6,6 minutos. Devido a carboplatina ser uma molécula muito polar, as impurezas provenientes da degradação da carboplatina aparecem majoritariamente no início da corrida cromatográfica. Conforme explicado anteriormente, o método utilizado para quantificação não é o mesmo utilizado nos experimentos por LC-MS/MS e, por esse motivo, as impurezas provenientes da degradação da carboplatina aparecerem majoritariamente no início da corrida cromatográfica no método analítico 2 não impactam o intuito deste trabalho.

Foi utilizado o modo positivo de ionização para a identificação das impurezas desconhecidas pois apresentou uma maior quantidade de íons que permitiram uma elucidação estrutural mais fidedigna, porém os dados em modo negativo também foram avaliados e inseridos neste trabalho, quando relevantes.

A FIGURA 5.21 apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) do padrão da carboplatina.

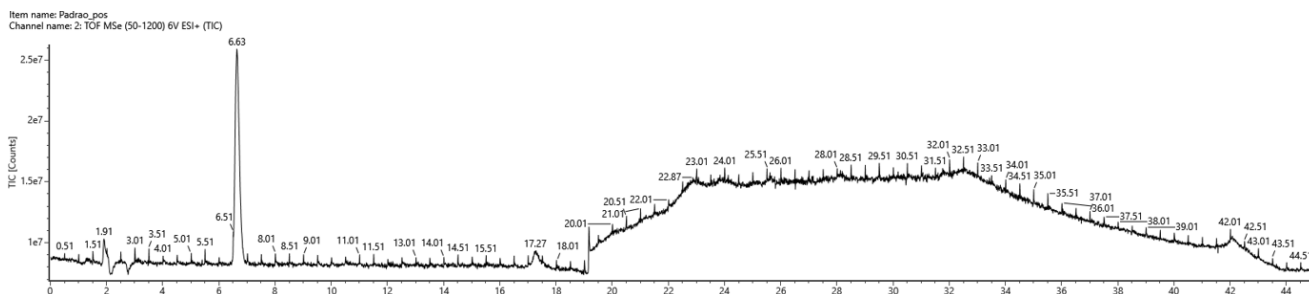


FIGURA 5.21 – Cromatograma de íons totais ESI⁺ do padrão de carboplatina

No TIC, a carboplatina apresentou tempo de retenção no mesmo tempo do cromatograma UV, em 6,6 minutos. A fim de caracterizar esse pico como sendo da carboplatina, foi extraído o espectro de massas, representado na FIGURA 5.22.

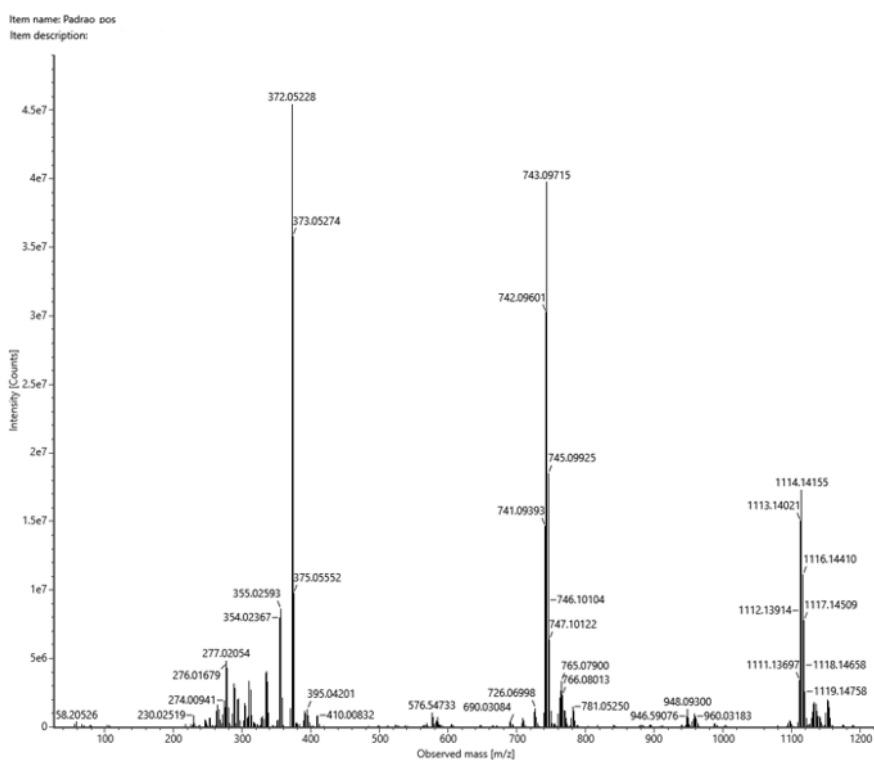


FIGURA 5.22 – Espectro de massas *full scan* ESI⁺ da carboplatina

Avaliando o espectro de massas *full scan* ESI⁺ da carboplatina na amostra de padrão, é possível observar os íons mais intensos com m/z 372,0523 Da correspondente ao íon molecular $[M+H]^+$, seu dímero $[2M+H]^+$ com m/z 743,0972

Da e seu trímero $[3M+H]^+$ com m/z 1114,1416 Da. É possível observar também o perfil isotópico da platina, onde o isótopo ^{195}Pt é o mais abundante no íon de m/z 372,0523, seguido pelo ^{194}Pt mais abundante no íon de m/z 371,0503 e ^{196}Pt mais abundante no íon de m/z 373,0527, demonstrando a contribuição dos isótopos de platina na composição química do complexo de carboplatina, levando a este padrão isotópico no íon molecular. Dessa forma, conclui-se que o íon 372,0523 Da corresponde ao íon molecular da carboplatina, e sua massa neutra corresponde a 371,0445 Da, de fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_2\text{Pt}$.

O desvio de massa entre massa experimental (m/z 372,0523) e massa teórica (m/z 372,0518) é de 1,34 ppm, ou seja, um desvio muito baixo que permite afirmar que a estrutura se refere à carboplatina. Na FIGURA 5.23 é possível observar o mesmo espectro de massas da carboplatina apresentado na FIGURA 5.22, porém com zoom, para melhor visualização dos íons.

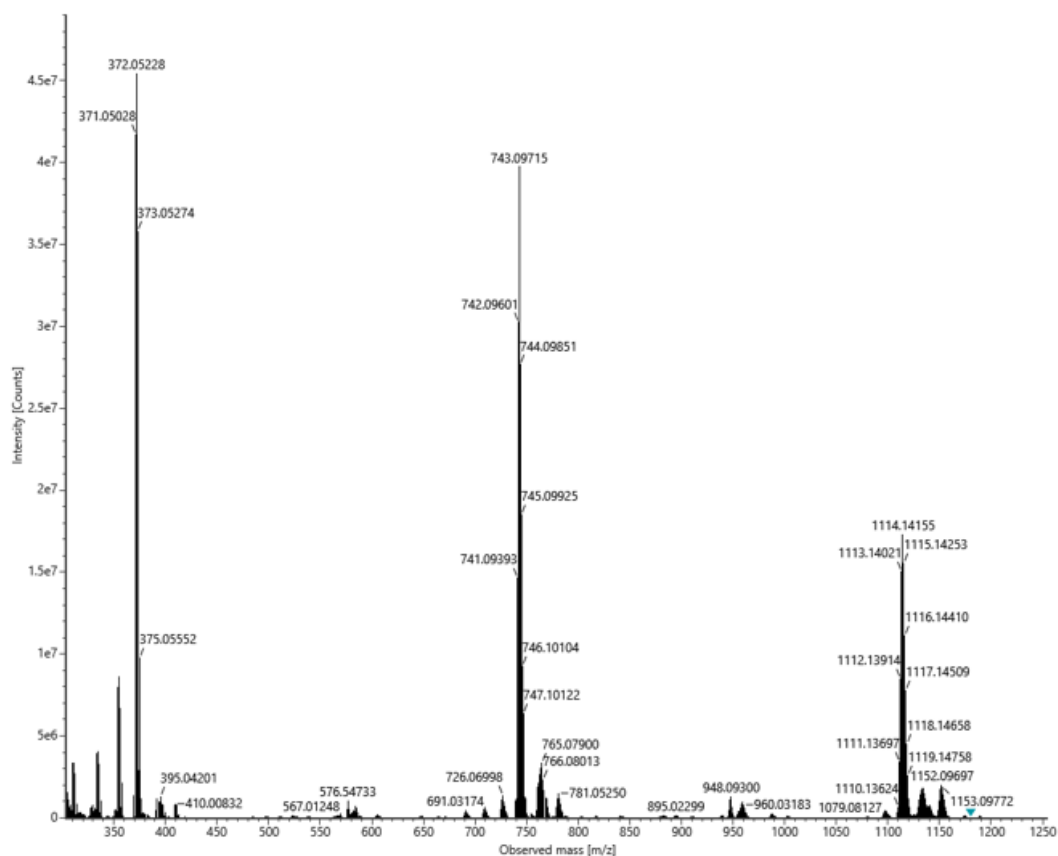


FIGURA 5.23 – Espectro de massas *full scan* ESI⁺ da carboplatina com zoom

Foi realizado o experimento MS/MS ESI⁺ para o íon 372,0523 a fim de avaliar os fragmentos gerados, apresentados na FIGURA 5.24.

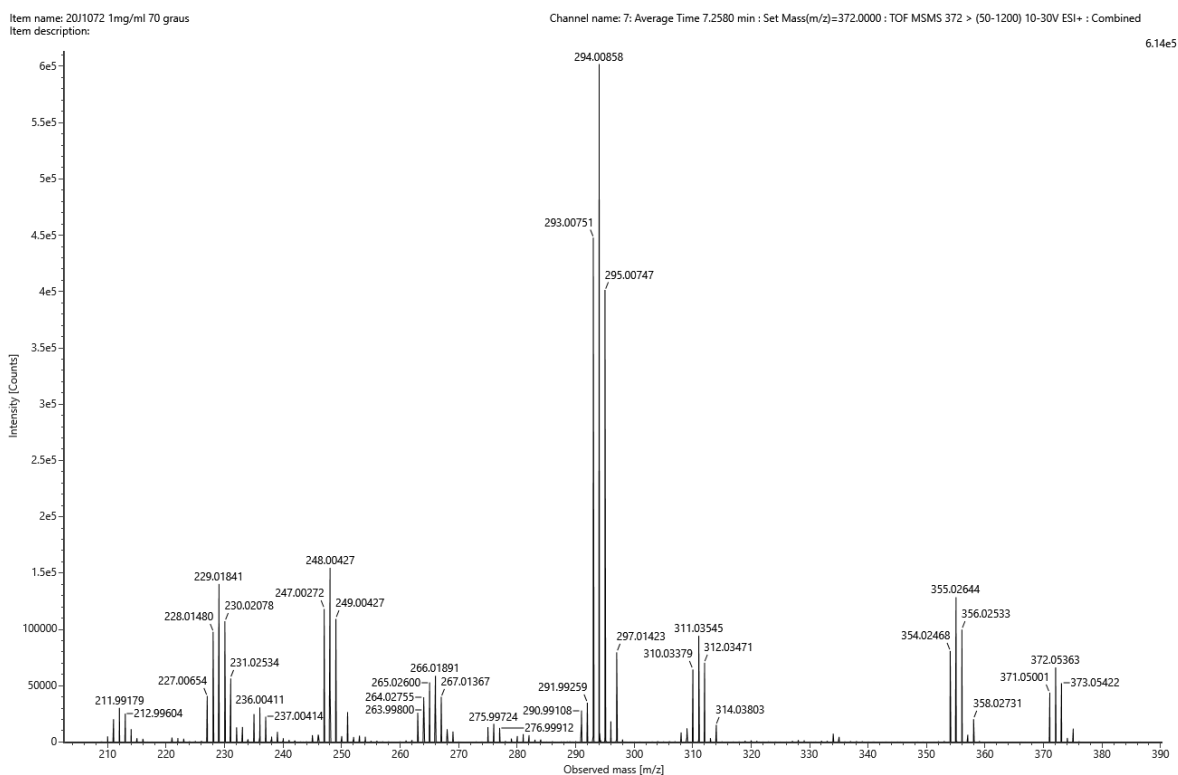


FIGURA 5.24 – Espectro de massas MS/MS ESI⁺ para o íon molecular com m/z 372,0523 Da

Na FIGURA 5.24 observa-se o íon precursor, de m/z 372,0536 Da e o íon produto de m/z 294,0086 Da, que se refere a perda de 78,0450 Da, referente a estrutura de fórmula molecular $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$. No fragmento mais intenso há o padrão isotópico da platina, assim como em fragmentos minoritários, indicando a presença da platina.

5.2 AMOSTRA DEGRADADA DE FAULDCARBO A 70°C POR 14 DIAS

A amostra degradada de Fauldcarbo, lote 20J1072, foi submetida a estresse térmico, 70°C durante 14 dias. A FIGURA 5.25 apresenta o cromatograma UV em 210 nm da amostra degradada de carboplatina, evidenciando o pico da carboplatina em 6,6 minutos.

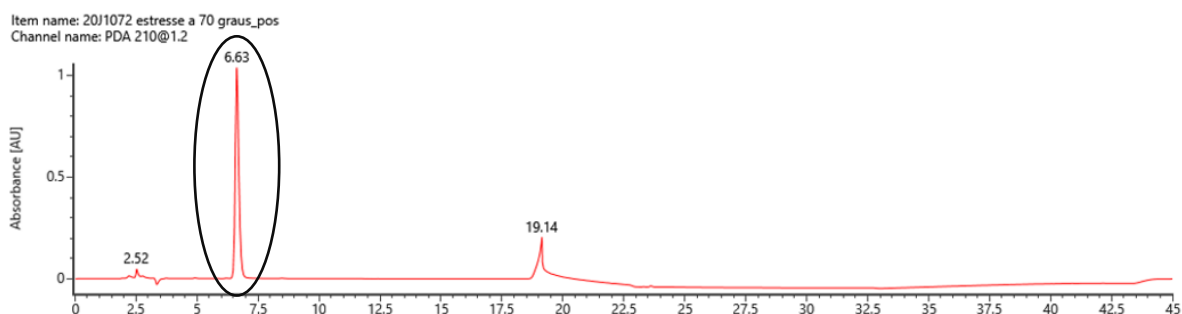


FIGURA 5.25 – Cromatograma da amostra degradada de Fauldcarbo em HPLC-UV em 210 nm

A FIGURA 5.26 apresenta o cromatograma de íons totais ESI⁺ da amostra degradada de Fauldcarbo. Em comparação ao TIC do padrão de carboplatina, no cromatograma da amostra degradada houve a formação de diversos picos, que possivelmente são impurezas advindas da degradação da carboplatina.

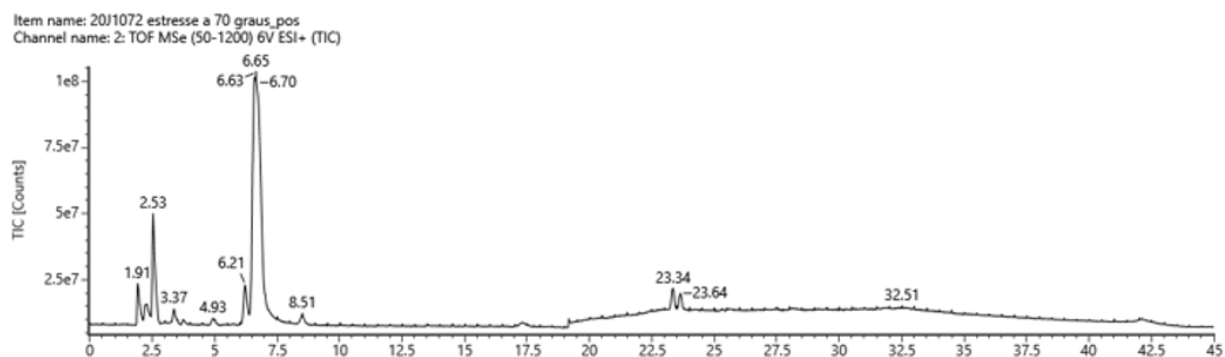


FIGURA 5.26 – Cromatograma de íons totais ESI⁺ da amostra degradada de Fauldcarbo

Após avaliação prévia do cromatograma de íons totais ESI⁺ e ESI⁻ da amostra estressada a 70°C durante 14 dias, foram selecionados íons como possíveis impurezas da carboplatina, demonstrados na TABELA 5.9:

Ionização	Íon (<i>m/z</i>)	Massa exata	Tempo de retenção (min)	Referência da impureza
ESI ⁻	143,0345	144,0423 Da	23,3	1
ESI ⁺ e ESI ⁻	404,0415 e 402,0261	403,0343 Da	3,4	2
ESI ⁺	309,0202	-	2,5	3
ESI ⁺	389,0787	-	2,1	4
ESI ⁺	515,0628	-	24,6	5
ESI ⁺	616,0324	-	2,2	6

TABELA 5.9 – Íons selecionados no TIC como possíveis impurezas da carboplatina

5.3 IMPUREZA 1: ÍON *M/Z* 143,0345 DA

Os íons mencionados possuem o perfil isotópico da platina, indicando que o átomo de platina está presente nas estruturas dessas moléculas, exceto no íon com *m/z* 143,0345 Da. A FIGURA 5.27 apresenta o espectro de massas no modo negativo do tempo de retenção 23,3 minutos.

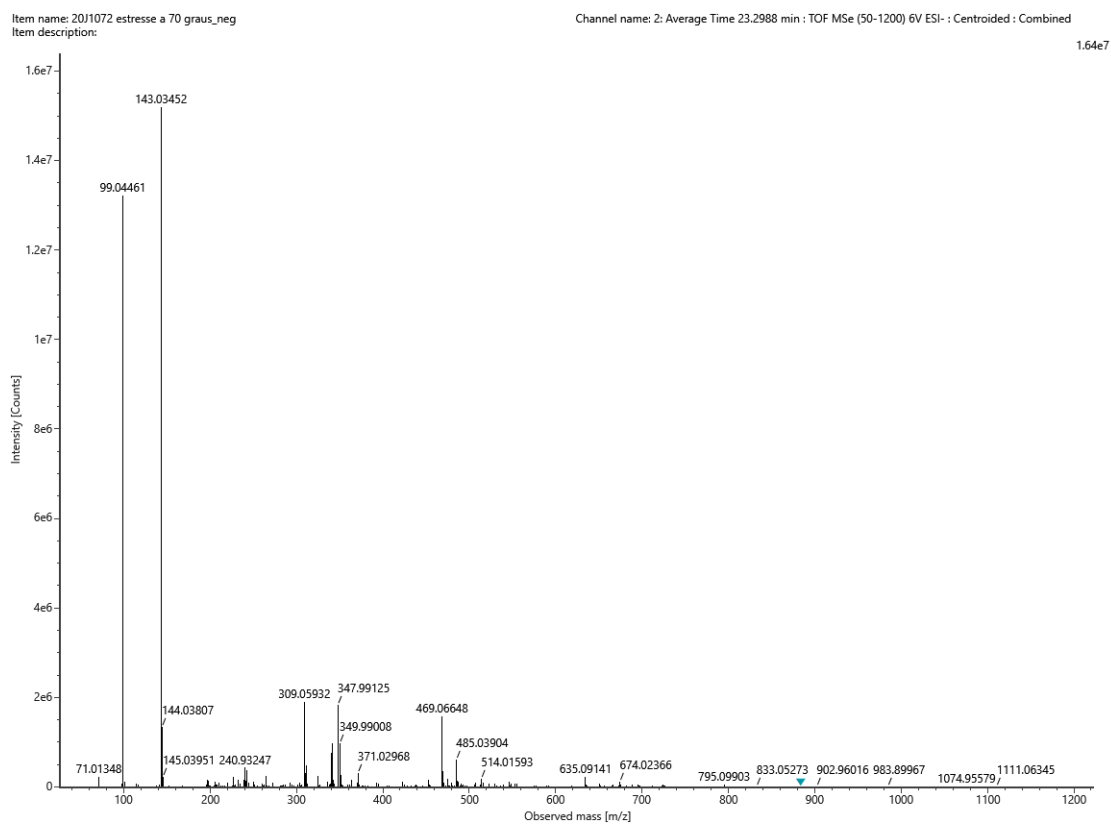


FIGURA 5.27 – Espectro de massas *full scan* ESI⁻ do tempo de retenção 23,3 minutos

Na FIGURA 5.27 é possível observar os íons majoritários de m/z 143,0345 Da e de m/z 99,0446 Da. O íon molecular da impureza em questão apresenta m/z de $[M-H]^- = 143,0345$ Da e, conseqüentemente, sua forma neutra apresenta uma massa de 144,0423 Da, correspondente ao ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico, de fórmula molecular $C_6H_8O_4$. De acordo com o cálculo abaixo, é possível determinar experimentalmente o desvio de massa em ppm.

$$\text{Desvio de massa (ppm)} = \frac{\left[\frac{m}{z} \text{ experimental} - \frac{m}{z} \text{ teórica} \right]}{\frac{m}{z} \text{ teórica}} * 1000000$$

Ao calcular o desvio de massa entre massa experimental (m/z 143,0345) e massa teórica (m/z 143,0350), o desvio foi de -3,50 ppm, ou seja, um desvio muito baixo que evidencia com maior segurança que a estrutura se trata da impureza em questão. A fórmula estrutural e molecular do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico estão representadas na FIGURA 5.28.

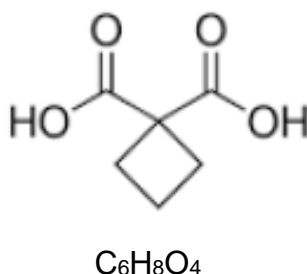


FIGURA 5.28 – Fórmula estrutural e molecular do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico

O ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico é um produto de degradação conhecido da carboplatina [94] [95] [96]. Nas monografias da carboplatina presentes nas farmacopeias americana, britânica e europeia, o ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico é uma impureza controlada tanto no IFA quanto no produto acabado.

Já o segundo íon mais intenso, de m/z 99,0446 Da, refere-se ao ácido ciclobutano monocarboxílico, de massa neutra 100,0524 Da e fórmula molecular C₅H₈O₂, representado na FIGURA 5.29.

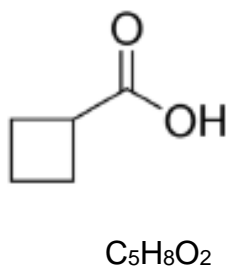


FIGURA 5.29 – Fórmula estrutural e molecular do ácido ciclobutano monocarboxílico

O desvio de massa entre a massa experimental (m/z 99,0446) e massa teórica (m/z 99,0451) apresentou erro de -5,05 ppm, garantindo se tratar da molécula do ácido ciclobutano monocarboxílico. Essa estrutura é gerada do ácido 1,1-ciclobutano dicarboxílico com a perda 44,9977 Da, referente a um grupo carboxila (-COOH).

5.4 IMPUREZA 2: ÍONS M/Z 404,0415 DA E M/Z 402,0261 DA

Dentre as impurezas avaliadas como possíveis impurezas da carboplatina, a impureza 2 foi selecionada para ter sua estrutura identificada a seu mecanismo de formação esclarecido. Foram avaliados os íons de m/z 404,0415 Da (ESI⁺) e m/z 402,0261 Da (ESI⁻). A identificação estrutural das demais impurezas (3, 4, 5 e 6) será realizada na Libbs Farmacêutica posteriormente.

Na FIGURA 5.30 é possível observar o cromatograma HPLC-UV em 210 nm da amostra degradada de Fauldcarbo com zoom; e na FIGURA 5.31 observa-se no TIC ESI⁺ o tempo de retenção do íon de interesse destacado, em aproximadamente 3,4 minutos.

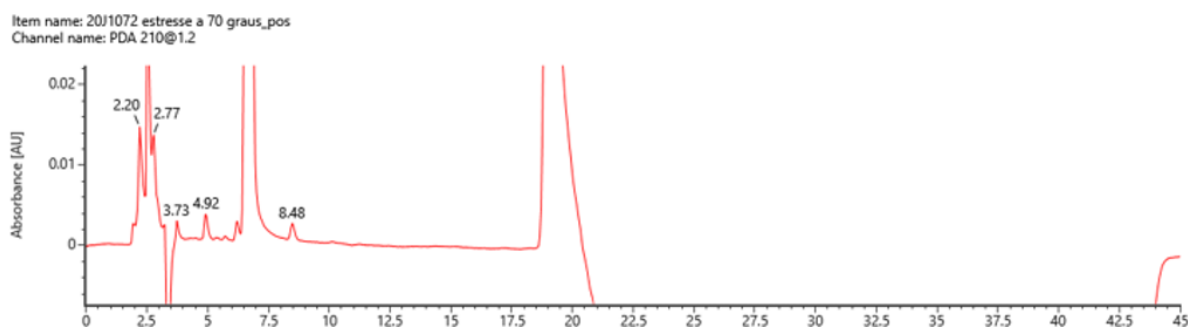


FIGURA 5.30 – Cromatograma da amostra degradada de Fauldcarbo em HPLC-UV em 210 nm com zoom

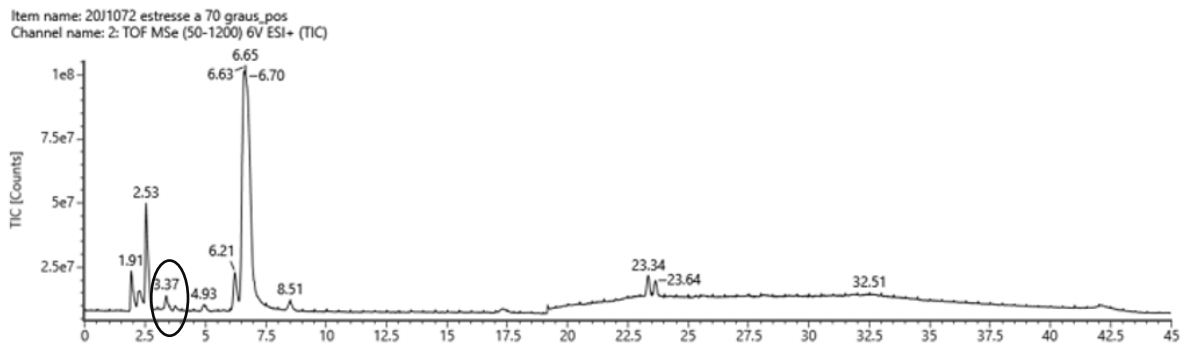


FIGURA 5.31 – Cromatograma de íons totais ESI⁺ da amostra degradada de Fauldcarbo evidenciando o íon em 3,4 minutos

O espectro de massas *full scan* ESI⁺ do tempo de retenção 3,4 minutos foi obtido e está representado na FIGURA 5.32.

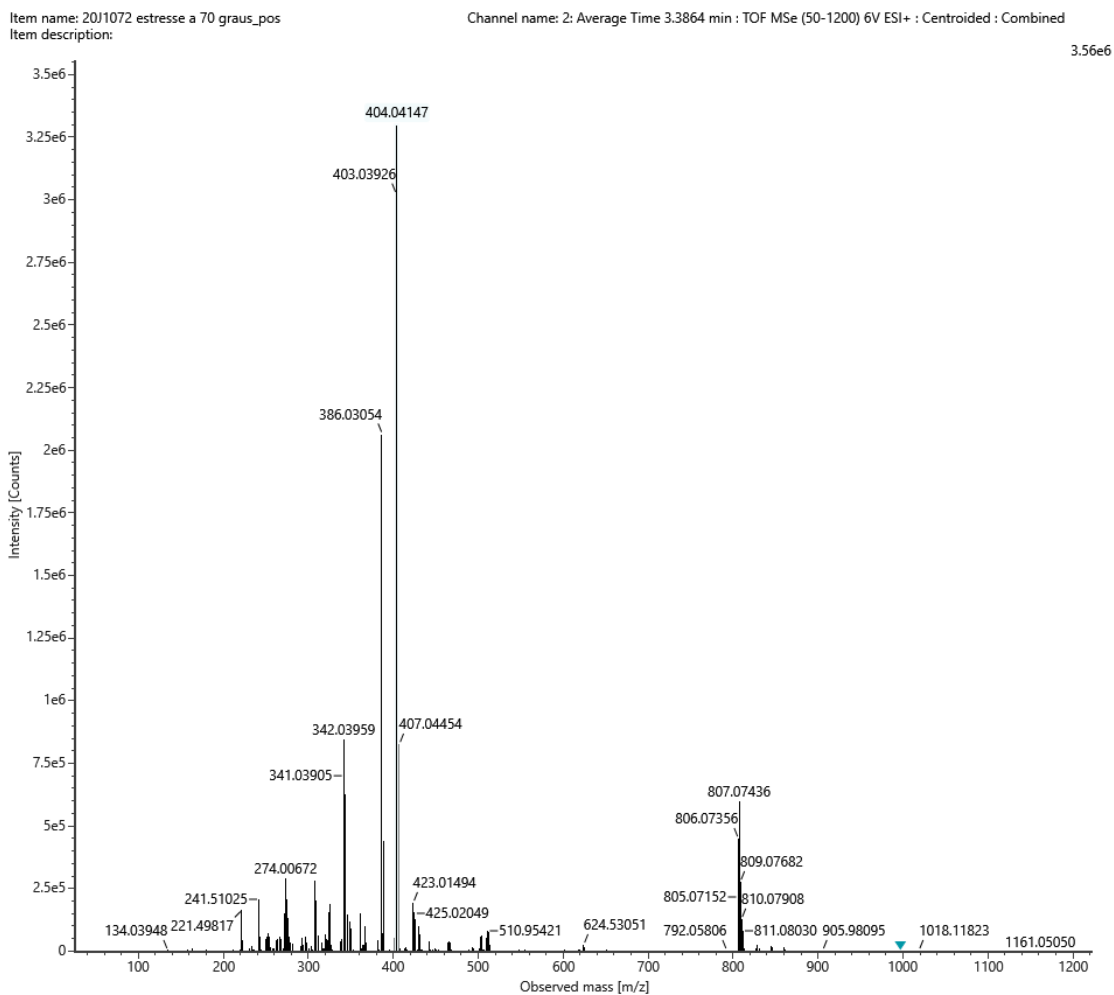


FIGURA 5.32 – Espectro de massas *full scan* ESI⁺ do tempo de retenção 3,4 minutos

O íon majoritário corresponde ao íon molecular de m/z $[M+H]^+ = 404,0415$ Da, e sua forma neutra apresenta massa de 403,0343 Da. É possível observar o perfil isotópico da platina, devido a intensidade de cada isótopo, inferindo-se que há platina na molécula da impureza 2.

O espectro de massas *full scan* no modo negativo de ionização (ESI⁻) também foi avaliado, conforme FIGURA 5.33.

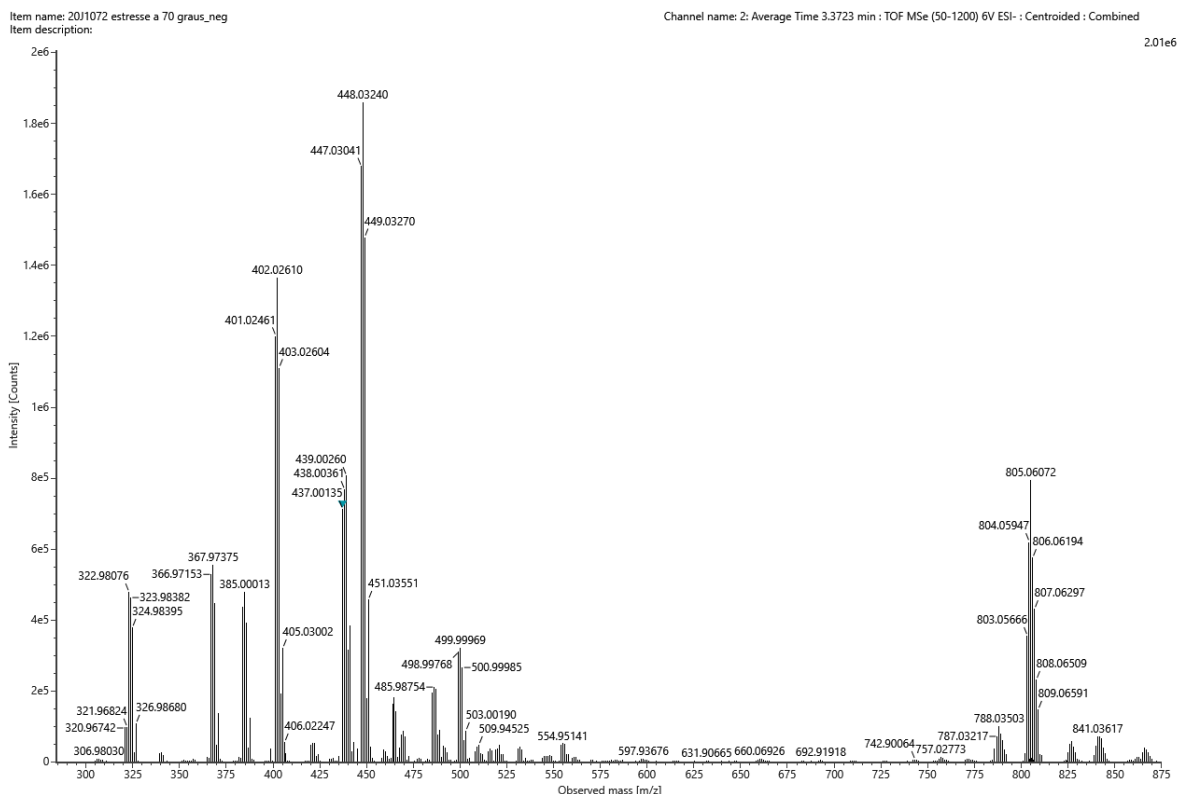


FIGURA 5.33 – Espectro de massas *full scan* ESI⁻ do tempo de retenção 3,4 minutos

O íon mais abundante no espectro de massas *full scan* ESI⁻, de m/z 448,0324 Da, corresponde a um íon aduto de ácido fórmico [M+FA]⁻. A formação de adutos na espectrometria de massas é comum, e são gerados através da interação entre a molécula alvo e outra molécula, como o solvente usado na fase móvel. O segundo íon mais abundante é o de m/z 402,0261 Da, correspondente ao íon molecular [M-H]⁻. Ambos os modos de ionização foram favoráveis para o aparecimento da impureza 2, de massa neutra 403,0343 Da. No entanto, o modo positivo apresentou maior intensidade de íons com m/z 404,0415 Da do que no modo negativo de íons com m/z 402,0261 Da, permitindo uma elucidação estrutural mais fidedigna em modo positivo.

Com base nos dados obtidos e discutidos, definido a m/z do íon molecular $[M+H]^+$ de 404,0415 Da, a próxima etapa para colaborar na identificação desse íon como uma possível impureza da carboplatina foi a obtenção de um cromatograma do íon extraído (XIC = *extracted ion chromatogram*) em ESI⁺. Essa ferramenta permite obter um cromatograma apenas com íons da m/z de interesse, ou seja, obteve-se um cromatograma apenas com íons de m/z igual a 404,0415 Da, conforme FIGURA 5.34.

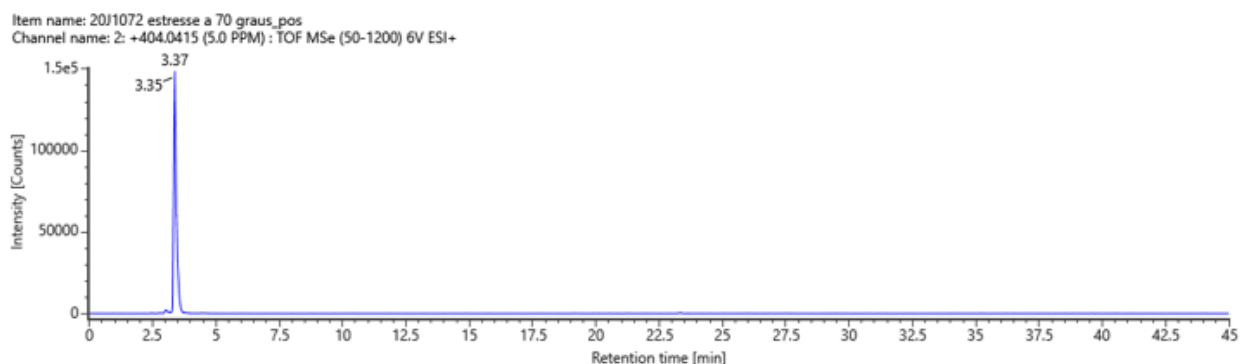


FIGURA 5.34 – Cromatograma XIC ESI⁺ do íon com m/z 404,0415 Da para a amostra degradada de Fauldcarbo

Na FIGURA 5.34, observa-se que o íon extraído aparece apenas no tempo de retenção inicialmente avaliado, de aproximadamente 3,4 minutos, o que sugere que o íon observado advém exclusivamente da possível impureza 2 estudada e não de uma possível contaminação do sistema, como coluna, solventes, agulha de nebulização, capilar, dentre outros.

Visando a identificação estrutural completa da possível impureza da carboplatina, um experimento de fragmentação MS/MS ESI⁺ do íon com m/z 404,0415 Da foi realizado. A FIGURA 5.35 apresenta o espectro de massas obtido para esse estudo.

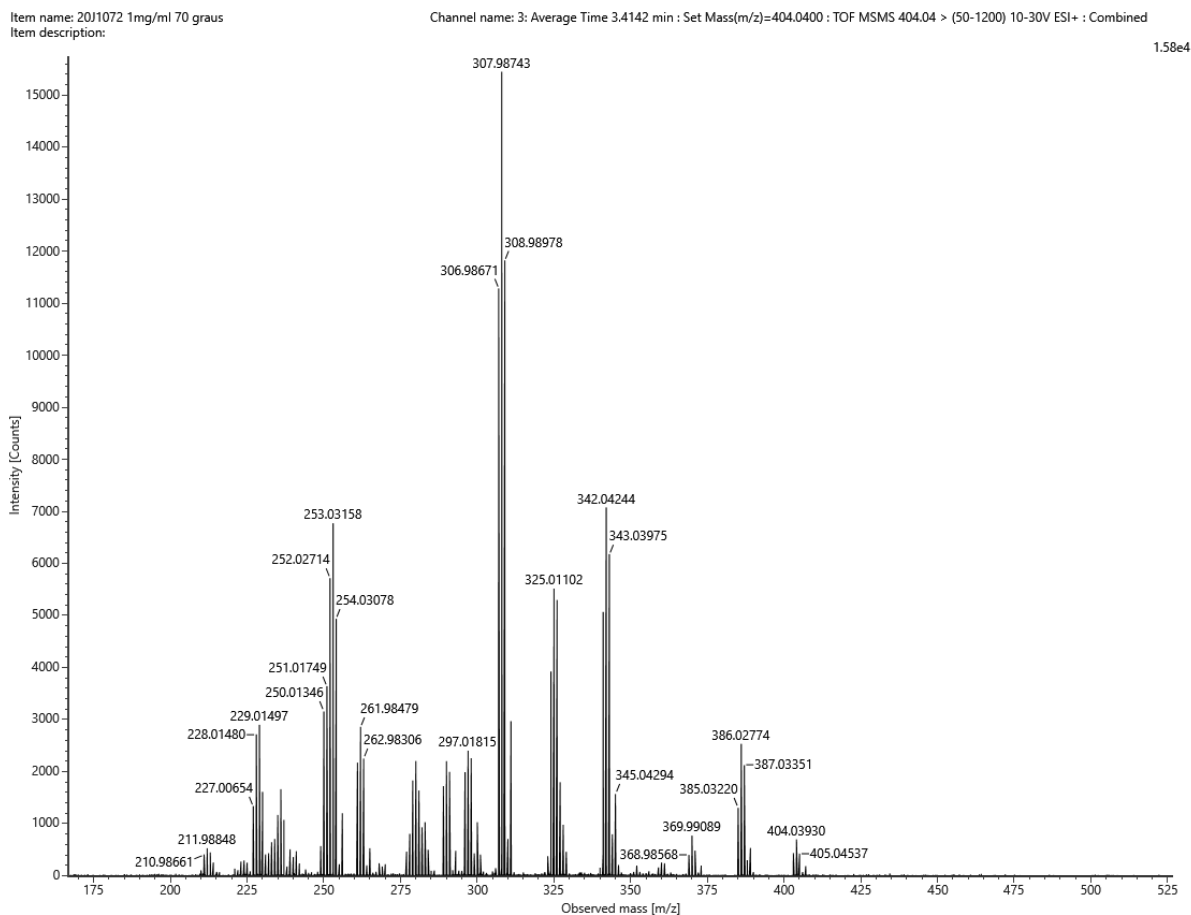


FIGURA 5.35 – Espectro de massas MS/MS ESI⁺ para o íon molecular com m/z 404,0415 Da

No experimento MS/MS o íon produto (fragmento mais intenso) de m/z 307,9874 Da indica a perda de 96,0519 Da, referente a estrutura de fórmula molecular $\text{CH}_7\text{N}_2\text{O}_3$.

O segundo fragmento mais intenso de m/z 342,0424 Da indica a perda de 61,9969 Da, referente a estrutura de fórmula molecular CH_3NO_2 .

O terceiro fragmento mais intenso de m/z 253,0316 Da indica a perda de 151,0077 Da.

O quarto fragmento mais intenso de m/z 325,0110 Da indica a perda de 79,0283 Da, referente a estrutura de fórmula molecular $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_2$.

Os fragmentos indicam o padrão de fragmentação para o íon m/z 404,0415 Da, apresentando a platina em sua composição, devido ao perfil isotópico apresentado.

Observando os espectros de massas, é possível propor para o candidato à impureza 2 da carboplatina estudado, a estrutura representada na FIGURA 5.36.

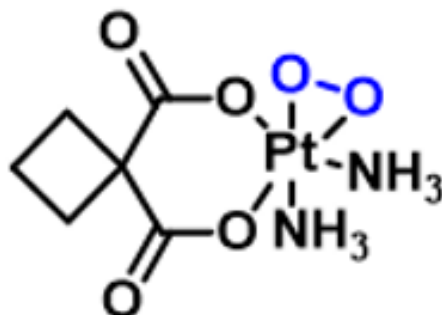


FIGURA 5.36 – Estrutura química proposta para a impureza 2 da carboplatina

Dessa forma, é possível propor o mecanismo de formação dessa estrutura durante os estudos de degradação térmico seco, conforme FIGURA 5.37.

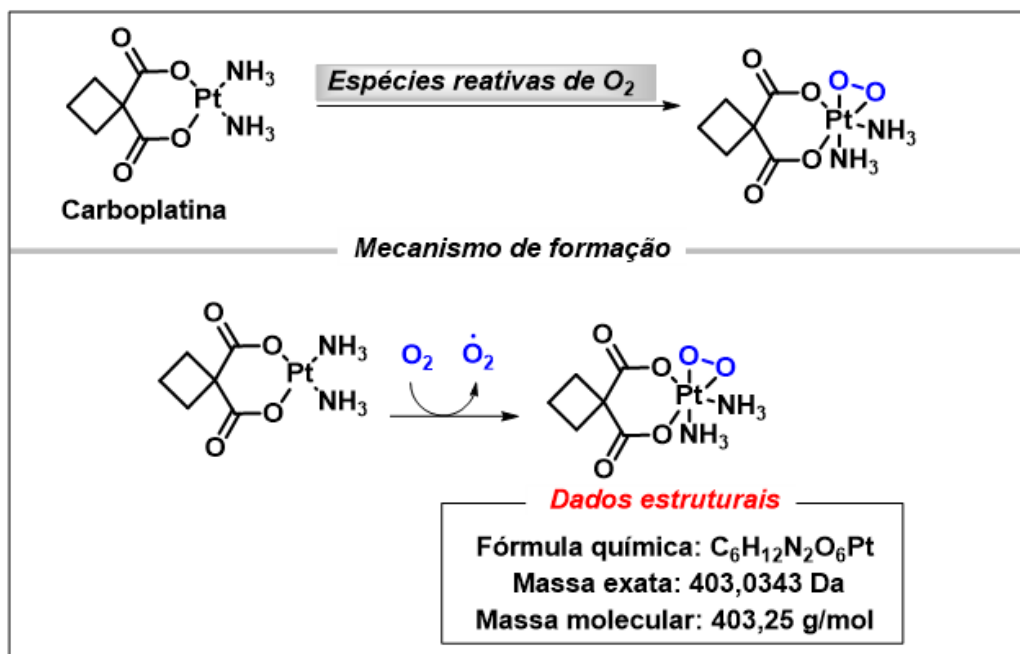


FIGURA 5.37 – Mecanismo de formação da impureza 2 da carboplatina

A impureza 2 estudada, proveniente da degradação da carboplatina, possui massa exata de 403,0343 Da, e consiste em uma espécie reativa de oxigênio, evidenciando que o aumento de massa observado para a impureza, em relação à massa da carboplatina, de 31,9898 Da, refere-se a massa de dois oxigênios.

De acordo com o valor de m/z obtido experimentalmente para a impureza 2 no espectro de massas *full scan* ESI⁺ (m/z 404,0415) e o valor de massa monoisotópica teórico (404,0416), o desvio de massa apresentado foi de -0,25 ppm, valor muito satisfatório, sugerindo que a impureza estudada está em concordância com a estrutura proposta.

Essa estrutura foi formada a partir da interação da molécula da carboplatina com um oxigênio radicalar. A condição de estresse aplicada à amostra de Fauldcarbo, 70°C durante 14 dias, em geral, favorece a degradação do fármaco pois fornece energia suficiente para promover reações químicas que, em condições normais de temperatura, seriam menos frequentes. Esse aumento de energia pode excitar moléculas, quebrando ligações e resultando em espécies químicas altamente reativas. O oxigênio presente no ambiente de estresse em que a amostra foi submetida pode ser ativado em temperaturas elevadas, formando a espécie reativa de oxigênio, favorecendo a interação com a molécula de carboplatina [97] [98].

6 – CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, é possível confirmar a estrutura para a impureza proposta gerada sob a condição de estresse térmico. A alta temperatura empregada no estudo fornece energia suficiente para acelerar as reações químicas, contribuindo para uma taxa de formação de impurezas maior do que em condições normais de temperatura.

Afirma-se que a estrutura obtida em ESI⁺ de m/z 404,0415 Da é uma impureza proveniente da carboplatina, formada a partir da interação com uma espécie reativa de oxigênio, o que justifica o aumento da massa da impureza em 31,9898 Da quando comparada à massa da carboplatina, que se refere a massa de dois oxigênios. Além disso, o padrão isotópico da platina na impureza evidencia a presença desse átomo na estrutura, corroborando na conclusão de que é uma impureza proveniente da carboplatina.

A espectrometria de massas é essencial para a indústria farmacêutica, pois permite a detecção, quantificação e análise de impurezas, assegurando a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Sua habilidade de identificar substâncias em concentrações muito baixas e detectar impurezas inesperadas é crucial para atender aos padrões regulatórios, mantendo a confiança do consumidor na integridade dos produtos. Além disso, essa técnica desempenha um papel importante em todas as fases do desenvolvimento e aprimoramento da pesquisa no ambiente farmacêutico.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES). *Panoramas Setoriais 2030: Indústria farmacêutica*. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/14242/2/Panoramas%20Setoriais%202030%20-%20Ind%C3%BAstria%20farmac%C3%AAutica_P_BD.pdf.

Acesso em: 20 jul. 2024.

[2] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18318-piramide-etaria.html>. Acesso em: 20 jul. 2024.

[3] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/38455-em-2022-expectativa-de-vida-era-de-75-5-anos>.

Acesso em: 20 jul. 2024.

[4] SINDUSFARMA. Disponível em: <https://sindusfarma.org.br/noticias/indice/exibir/22971-industria-farmaceutica-projeta-crescimento-de-12-este-ano-e-9-no-proximo>. Acesso em: 22 jan. 2024.

[5] SINDUSFARMA. *Perfil da Indústria Farmacêutica 2023*. Disponível em: https://sindusfarma.org.br/uploads/files/229d-gerson-almeida/Publicacoes_PPTs/PERFIL_IF_2023.pdf. Acesso em: 05 nov. 2024.

[6] LIBBS. Disponível em: <https://www.libbs.com.br/>. Acesso em: 10 nov. 2025.

[7] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Disponível em: <https://www.fda.gov/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

[8] EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>. Acesso em: 20 jul. 2024.

[9] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/orgaos/agencia-nacional-de-vigilancia-sanitaria>. Acesso em: 20 jul. 2024.

[10] INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Disponível em: <https://www.ich.org/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

[11] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/temas-do-ich-aprovado-modelo-de-atuacao-regulatoria>. Acesso em: 04 maio de 2025.

[12] BRASIL, Resolução RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 234, 8 de dezembro de 2015.

[13] BRASIL, Resolução RDC Nº 318, de 06 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 216, 7 de novembro de 2019.

[14] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Guia 04: Perfil e produtos de degradação em medicamentos*. Brasília, 2016. Disponível em: <https://anexosportal.datalegis.net/arquivos/1860547.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2024.

[15] SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, p. 209-249, 2021.

[16] WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (Ed.). *World cancer report: cancer research for cancer prevention*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2020.

[17] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 20 jul. 2024.

[18] NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 25 jul. 2024.

[19] COOPER, Geoffrey M. *The cell: a molecular approach*. 2. ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. ISBN 0-87893-106-6.

[20] ONCOGUIA. *Oncoguia: informações sobre câncer*. Disponível em: <https://www.oncoguia.org.br/conteudo/o-cancer/12/1/>. Acesso em: 25 jul. 2024.

[21] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em: 25 jul. 2024.

[22] WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews | Drug Discovery*, v. 4, p. 307-320, abr. 2005.

[23] ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer*, v. 55, p. 2303-2316, 15 maio 1985.

- [24] RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Anti-tumour treatment: molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, v. 33, p. 9-23, 2007.
- [25] DASARI, S.; TCHOUNWOUN, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 364-378, 2014.
- [26] BAREFOOT, R. R. Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 751, n. 2, p. 205-211, 25 fev. 2001.
- [27] GAŁCZYŃSKA, K.; DRULIS-KAWA, Z.; ARABSKI, M. Antitumor activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) complexes. *Molecules*, v. 25, p. 3491, 31 jul. 2020.
- [28] SANTOS, L. M.; SARTO, L. E.; BOZZA, G. F.; DE ALMEIDA, E. T. Química de Coordenação: Um Sonho Audacioso de Alfred Werner. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 5, p. 1260-1281, 6 jul. 2014. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- [29] VIVEKANANDAN, K.; SWAMY, M. G.; PRASAD, S.; MAIKAP, G. C.; MUKHERJEE, R.; BURMAN, A. C. Identification of degradation products from aqueous carboplatin injection samples by electrospray mass spectrometry. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 214-221, 2006.
- [30] PUBCHEM. *Carboplatin*. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10339178>. Acesso em: 22 ago. 2024.
- [31] ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE, D. J.; HERSKOWITZ, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), v. 99, n. 22, p. 14298-14302, 29 out. 2002.

[32] SAFAEI, R.; HOWELL, S. B. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 53, p. 13-23, 2005.

[33] DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 42, p. 317-325, 2002.

[34] JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 2467-2498, 1999.

[35] UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). *Carboplatin*. Disponível em: https://online.uspnf.com/uspnf/search?facets=%5B%5B%22document-status_s%22%2C%5B%22OpenForComment%22%2C%22Official%22%2C%22ToBeOfficial%22%5D%5D%5D&query=carboplatin. Acesso em: 22 ago. 2024.

[36] BRITISH PHARMACOPOEIA. *BP 2025: Carboplatin*. Disponível em: <https://www.pharmacopoeia.com/search/bp-2025?text=carboplatin&date=2025-04-01&title=®ion=>. Acesso em: 22 ago. 2024.

[37] EUROPEAN PATENT OFFICE. *EP2913336A1*. Process for the preparation of carboplatin. 2014.

[38] INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). *Gold Book: T06456*. Disponível em: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/T06456>. Acesso em: 05 set. 2024.

[39] ISWANATHAN, B. *Chapter 5: Nuclear fission*. In: *Energy sources: fundamentals of chemical conversion processes and applications*. 1. ed. p. 113-126, 2017.

[40] POOLE, G. M.; STUMPF, R.; REHKÄMPER, M. New methods for determination of the mass-independent and mass-dependent platinum isotope compositions of iron meteorites by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 37, p. 783, 2022.

[41] SISWEB. *Isotope tools*. Disponível em: <https://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>. Acesso em: 05 set. 2024.

[42] BÉLANGER, J. M. R.; PARÉ, J. R. J.; SIGOUIN, M. *Chapter 2: High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications*. In: *Instrumental methods in food analysis*, p. 37-59, 1997.

[43] LOZANO-SÁNCHEZ, J.; BORRÁS-LINARES, I.; SASS-KISS, A.; SEGURA-CARRETERO, A. *Chapter 13: Food authentication by HPLC*. In: *Chromatographic technique: high-performance liquid chromatography (HPLC)*. 2017.

[44] SADAPHA, P.; DHAMAK, K. High-performance liquid chromatography (HPLC) method development and validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 74, n. 2, p. 23-29, maio-jun. 2022.

[45] SCHOENMAKERS, P. J.; BILLIET, H. A. H.; DE GALAN, L. The solubility parameter as a tool in understanding liquid chromatography. *Chromatographia*, v. 15, n. 3, p. 107-112, mar. 1982.

[46] BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ, D.; KASTELAN-MACAN, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Analytical Chemistry*, v. 26, n. 11, p. 2641-2647, 2007.

[47] SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

[48] WATERS. *Beginner's guide to UPLC*. Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/pl/en/education/primers/beginner-s-guide-to-uplc/the-promise-of-small-particles.html>. Acesso em: 04 maio 2024

[49] TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.

[50] MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. High-performance liquid chromatography. In: *Chromatography: High-performance liquid chromatography*. 2003.

[51] AGRAHARI, V.; BAJPAI, M.; NANDA, S. Essential concepts of mobile phase selection for reversed phase HPLC. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, maio 2013.

[52] RIBEIRO, R. L. V.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 2, p. 300-306, 2004.

[52] GROSS, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. 3. ed. Springer, 2017.

[54] BAGHEL, U. S.; SINGH, A.; SINGH, D.; SINHA, M. Application of mass spectroscopy in pharmaceutical and biomedical analysis. In: *Spectroscopic analyses - developments and applications*. 2017. p. 107.

[55] TOLENTINO JÚNIOR, D. S.; SANTOS, S. N.; MARQUES, A. B. S.; FARIAS, K. P.; SOUZA, A. B.; LIMA, G. N.; RODRIGUES, J. L. Revisão sobre cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas aplicada à análise toxicológica de alimentos. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 5, e47910515419, 2021.

[56] AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 50, p. 158-175, 2015.

[57] HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3. ed. Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

[58] MIRSALEH-KOHAN, N.; ROBERTSON, W. D.; COMPTON, R. N. Electron ionization time-of-flight mass spectrometry: Historical review and current applications. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 27, p. 237-285, 2008.

[59] HENDERSON, W.; MCINDOE, J. S. *Mass spectrometry of inorganic and organometallic compounds: tools - techniques - tips*. 1. ed. Kindle Edition, 2007.

[60] RIGANO, F.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; MONDELLO, L. High-performance liquid chromatography combined with electron ionization mass spectrometry: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, p. 112-122, 2019.

[61] BYRDWELL, W. C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, v. 36, n. 4, p. 327-340, 2001.

[62] PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry Reviews*, v. 30, p. 19-34, fev. 2009.

[63] ROBB, D. B.; COVEY, T. R.; BRUINS, A. P. Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 72, p. 3653-3659, 2000.

[64] HANOLD, K. A.; FISCHER, S. M.; CORMIA, P. H.; MILLER, C. E.; SYAGE, J. A. Atmospheric pressure photoionization. General properties for LC/MS. *Analytical Chemistry*, v. 76, p. 2842-2851, 2004.

[65] KNOCHENMUSS, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 2199-2207, 2003.

[66] SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, art. 791, ago. 2015.

[67] HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W.; NG, K. F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *Clinical Biochemistry Reviews*, v. 24, fev., p. 3-12, 2003.

[68] ABAYE, D. A.; AGBO, I. A.; NIELSEN, B. V. Current perspectives on supercharging reagents in electrospray ionization mass spectrometry. *RSC Advances*, v. 11, p. 20355-20369, 2021.

[69] HAN, X.; GROSS, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, v. 44, p. 1071-1079, 2003.

[70] KUJAWINSKI, E. B.; FREITAS, M. A.; ZANG, X.; HATCHER, P. G.; GREEN-CHURCH, K. B.; JONES, R. B. The application of electrospray ionization mass

spectrometry (ESI MS) to the structural characterization of natural organic matter. *Organic Geochemistry*, v. 33, p. 171-180, 2002.

[71] NORIEGA, P.; GORTAIRE, G.; OSORIO, E. Mass spectrometry and its importance for the analysis and discovery of active molecules in natural products. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*.

[72] HAAG, A. M. Mass analyzers and mass spectrometers. *Modern proteomics: Sample preparation, analysis and practical applications*. Chapter 7, 2016.

[73] HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; ABAD, E.; PORTOLÉS, T.; MATTIOLI, L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 403, p. 1251-1264, 2012.

[74] MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L. High-resolution mass spectrometers. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 1, p. 579-599, 2008.

[75] MILLER, P. E.; DENTON, M. B. The quadrupole mass filter: Basic operating concepts. *Journal of Chemical Education*, v. 63, n. 7, p. 617, jul. 1986.

[76] WOODING, K. M.; AUCHUS, R. J. Mass spectrometry theory and application to adrenal diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 371, p. 201-207, 2013.

[77] MARCH, R. E. Ion trap mass spectrometers. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 3. ed., p. 330-337, 2017.

[78] LI, X.; JIANG, G.; LUO, C.; XU, F.; WANG, Y.; DING, L.; DING, C.-F. Ion trap array mass analyzer: Structure and performance. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 12, p. 4840-4846, 15 jun. 2009.

[79] HAYES, R. N.; GROSS, M. L. Collision-induced dissociation. In: *Methods in Enzymology*. v. 193, p. 237-263, 1990.

[80] ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 8, p. 61-80, 2015.

[81] BOESI, U. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 36, p. 86-109, 2017.

[82] PRICE, D. Time-of-flight mass spectrometry. Washington, DC: American Chemical Society, 1993.

[83] STANDING, K. G.; ENS, W. Time of flight mass spectrometers. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 3. ed., p. 458-462, 1999.

[84] ROCKWOOD, A. L.; KUSHNIR, M. M.; CLARKE, N. J. Mass spectrometry. In: *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. p. 33-65, 2018.

[85] MARSHALL, A. G.; HENDRICKSON, C. L.; JACKSON, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 17, p. 1-35, 1998.

[86] ALLEN, D. R.; MCWHINNEY, B. C. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry: A paradigm shift in toxicology screening applications. *Clinical Biochemistry Reviews*, v. 40, n. 3, p. 135-146, 2019.

[87] EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 44, p. 210-230, 2009.

[88] LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 25, p. 866-880, 2006.

[89] KHATRI, Neetu; GUPTA, Ankit. A review on mass spectrometry detectors. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 3, n. 10, 2012.

[90] KOPPENAAL, D. W. et al. MS Detectors. *Analytical Chemistry*, v. 77, n. 21, p. 7117-7131, 1 nov. 2005.

[91] BUSCH, K. L. Detecting ions in mass spectrometers with the Faraday cup. *Spectroscopy*, v. 26, n. 11, p. 11-14, 1 nov. 2011.

[92] SZEPEŠ, L.; TARCZAY, G. Photoelectron spectrometers. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 3. ed., p. 610-617, 2017.

[93] KOY, C. et al. Cryodetector mass spectrometry profiling of plasma samples for HELLIP diagnosis: An exploratory study. *Proteomics*, v. 5, p. 3079-3087, 2005.

[94] PUJOL, M. et al. Degradation pathway of carboplatin in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 146, p. 263-269, 1997.

[95] SCHNURR, B. et al. Investigations on the Decomposition of Carboplatin in Infusion Solutions II. Effect of 1,1-Cyclobutanedicarboxylic Acid Admixture. *Microchimica Acta*. v. 140, p. 141-148, 2002.

[96] GOZLAN, I. et al. Carboplatin-Degradation Products Formed Under Deliberated and Non-deliberated Laboratory Experiments: Structural Elucidation. *Water Air Soil Pollut.* 225:2196, 2014.

[97] BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. 2. ed. 2011.

[98] SINGH, R.; REHMAN, Z. ur. Current trends in forced degradation study for pharmaceutical product development. *J Pharm Educ Res*, v. 3, n. 1, p. 1-10, jun. 2012.