**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional**

Tecnologia em Química e Bioquímica

RAFAEL FINOCCHIARO MARANHO

**Desenvolvimento de um método indicativo
de estabilidade para ondansetrona**

Versão original da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

26/07/2017

RAFAEL FINOCCHIARO MARANHO

**Desenvolvimento de um método indicativo
de estabilidade para ondansetrona**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração Tecnologia em Química e
Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

M311d Maranhão, Rafael Finocchiaro
Desenvolvimento de um método indicativo de
estabilidade para ondansetrona / Rafael Finocchiaro
Maranhão. - São Paulo, 2017.
162 p.

Mestrado Profissional - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Ondansetrona. 2. Método indicativo de
estabilidade. 3. Cromatografia líquida de ultra
eficiência. 4. Espectrometria de massas. 5.
Qualidade analítica por planejamento. I. T. II.
Tavares, Marina Franco Maggi, orientador.

Agradecimentos

À Professora Marina Tavares, que me acolheu, orientou e teve toda a paciência do mundo com este mero aprendiz.

Aos gestores da *United States Pharmacopeia*, que me concederam a oportunidade de desenvolver este trabalho e a flexibilidade necessária à sua execução.

Aos parceiros Tiago Lourenço, André Novaes e Amanda Mesquita, maestros e companheiros neste trabalho.

Aos muitos amigos da *United States Pharmacopeia*, que sempre estiveram dispostos a ajudar, discutir, acompanhar e incentivar.

Às nossas famílias, que cuidaram de nós três e nos protegeram durante essa jornada.

À Gabriela e ao Francisco, que me mostraram que o nosso Amor supera todas as distâncias e todos os obstáculos.

Aprendi, contribuí.

Exigiu humildade, resiliência.

E sob o suor, o Amor, que é maior que tudo.

Gratidão!

RESUMO

Maranho, R.F. **Desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade para ondansetrona.** 2017. 163p. Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação de Tecnologia em Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um método analítico baseado na cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por ultravioleta e espectrometria de massas para análise do teor e limite de impurezas e compostos de degradação para o princípio ativo farmacêutico ondansetrona e três diferentes formas farmacêuticas foi desenvolvido utilizando conceitos de qualidade analítica por planejamento (*aQbD*) e validado de acordo com os requerimentos da USP-NF e do ICH. O método desenvolvido apresentou capacidade de separação de vinte compostos detectados nas amostras envolvidas no estudo: o princípio ativo ondansetrona, sete impurezas descritas nos principais compêndios farmacopéicos mundiais (*United States Pharmacopeia-National Formulary*, *European Pharmacopoeia*, *British Pharmacopoeia* e *Indian Pharmacopoeia*), onze compostos de degradação gerados pelos estudos de estresse e um excipiente. O método final apresentou um tempo de corrida de 14 minutos, com vazão de fase móvel de 0,4 mL/min, detecção de impurezas por ultravioleta a 220 nm e do princípio ativo a 305 nm, com apoio da detecção por espectrometria de massas de alta resolução (QTOF). Em comparação aos métodos requeridos pelas monografias relacionadas à ondansetrona publicadas nos compêndios farmacopéicos citados, o método desenvolvido apresenta uma alternativa eficiente e econômica para a análise de rotina de diferentes formas da matéria-prima ondansetrona (base, cloridrato, diferentes níveis de hidratação) e formas farmacêuticas (comprimidos, comprimidos de desintegração oral e solução injetável), mostrando que a modernização dos métodos cromatográficos, além de garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos e promover a saúde da população, tem um impacto relevante na economia da produção e análise de medicamentos e na diminuição do impacto ao meio ambiente.

Palavras-chave: ondansetrona; método indicativo de estabilidade; cromatografia líquida de ultraeficiência; espectrometria de massas; planejamento experimental; qualidade analítica por planejamento.

ABSTRACT

Maranho, R.F. **Development of a stability indicating method for ondansetron**. 2017. 163p. Professional Master Thesis - Graduate Program Technology in Chemistry and Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

An analytical method by ultraperformance liquid chromatography and detection by UV and mass spectrometry for assay and limit test for impurities and degradation compounds for the active pharmaceutical ingredient ondansetron and three different pharmaceutical products was developed using the analytical Quality by Design (aQbD) approach, and was validated according to the USP-NF and ICH requirements. The analytical method was efficient for the separation of twenty different compounds, detected in the samples involved in this study: the active ingredient ondansetron, seven impurities mentioned in the main global pharmacopeial compendia (*United States Pharmacopeia-National Formulary*, *European Pharmacopoeia*, *British Pharmacopoeia* e *Indian Pharmacopoeia*), eleven degradation compounds detected in the samples from stress studies and one excipient. The final method was composed by a 14 minutes run, using mobile phase flow at 0.4 mL/min, detection by UV at 220 nm for the impurities and degradation compounds and at 305 nm for ondansetron, supported by the high-resolution mass spectrometry detection (QTOF). Comparing the method developed with the chromatographic methods required by the monographs related to ondansetron published in the mentioned pharmacopeial compendia, it represents an efficient and economic alternative to the routine analysis of different ondansetron raw material forms (base, hydrochloride, different hydrates) and pharmaceutical products (tablets, orally disintegrating tablets and injectable), demonstrating the importance of the modernization of analytical procedures, with regard to not only the quality assurance of pharmaceutical products and promotion of public health, but also to the positive impact on the economy and sustainability of the pharmaceutical analysis and manufacturing.

Keywords: ondansetron; stability indicating method; ultra performance liquid chromatography; mass spectrometry; design of experiments; analytical quality by design.

Lista de abreviaturas e siglas

aQbD	<i>Analytical quality by design</i> ou qualidade analítica por planejamento
AJS	<i>Agilent Jet Stream</i>
ATP	<i>Analytical target profile</i> ou perfil analítico desejado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultraeficiência
CPP	<i>Critical process parameters</i> ou parâmetros críticos do processo
CQA	<i>Critical quality attributes</i> ou atributos críticos da qualidade
CZE	<i>Capillary zone electrophoresis</i> ou eletroforese capilar de zona
DAD	<i>Diode array detector</i> ou detector por arranjo de diodos
DOE	<i>Design of experiments</i> ou planejamento experimental
EDQM	<i>European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care</i>
ELS	<i>Evaporative light scattering</i> ou evaporativo de espalhamento de luz
EM	Espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray ionization</i> ou ionização por eletrospray
F	Fluorescência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPTLC	<i>High-performance thin layer chromatography</i> ou cromatografia de alta eficiência em camada delgada
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
Ii	Impureza <i>i</i>

MEKC	<i>Micellar electrokinetic chromatography</i> ou cromatografia eletrocinética micelar
MODR	<i>Method operational design region</i> ou região operacional planejada do método
Ph. Eur.	<i>European Pharmacopoeia</i> ou Farmacopeia Europeia
QTOF	<i>Quadrupole time-of-flight</i> ou quadrupolo tempo de voo
RI	<i>Refractive index</i> ou índice de refração
SIM	<i>Single ion monitoring</i> ou monitoramento de íon simples
TR	Tempo de retenção
USP-NF	<i>United States Pharmacopeia-National Formulary</i>
UV	Ultravioleta
UV-DAD	Detector por ultravioleta-arranjo de diodos
WHO	<i>World Health Organization</i> ou Organização Mundial da Saúde

Sumário

1	Introdução	10
1.1	<i>A United States Pharmacopeial Convention</i>	10
1.2	Os medicamentos essenciais e a modernização da USP	11
1.3	Ondansetrona como o objeto de estudo.....	15
1.3.1	As monografias compendiais para ondansetrona e seus medicamentos	16
1.3.2	Métodos disponíveis na literatura	24
1.4	Desenvolvimento de um novo método indicativo de estabilidade	31
1.4.1	<i>Analytical Quality by Design (aQbD)</i>	33
2	Objetivo	37
2.1	Objetivos específicos.....	37
3	Materiais	38
3.1	Compostos envolvidos	38
3.2	Matérias-primas e produtos acabados	38
3.3	Padrões de referência.....	39
3.4	Reagentes.....	39
3.5	Colunas cromatográficas	40
3.6	Equipamentos	42
4	Métodos	45
4.1	O perfil desejado para o método analítico	46
4.2	Características dos compostos conhecidos	47
4.3	Delineamento experimental.....	58
4.3.1	Colunas cromatográficas	59
4.3.2	Fases móveis	61
4.3.3	Parâmetros fixos.....	62
4.3.4	Solução amostra	63
4.3.5	Corridas resultantes do planejamento experimental	63
4.3.6	Uso de pareadores iônicos.....	68
4.4	Estudos de estresse	68
4.5	Método por espectrometria de massas.....	70
4.6	Validação do método proposto.....	72
5	Resultados e discussão.....	76

5.1	Configuração do sistema cromatográfico	76
5.2	Comprimentos de onda para o monitoramento dos compostos conhecidos	78
5.3	Análise estatística do modelo de predição adotado	80
5.4	Resultados dos experimentos exploratórios	91
5.5	Cromatografia por pareamento iônico	99
5.6	Parâmetros relacionados à espectrometria de massas	101
5.7	Estudos de estresse	107
5.8	Análise da matéria-prima	129
5.9	Análise dos produtos acabados	131
5.10	Solução de impurezas	137
5.11	Método final e compostos detectados no estudo	139
5.12	Resultados para a validação do método analítico	145
6	Conclusão	149
7	Referências bibliográficas	152

1 Introdução

1.1 A *United States Pharmacopeial Convention*

A *United States Pharmacopeial Convention* (USP) é uma organização científica sem fins lucrativos, que estabelece normas para a identidade, potência, qualidade e pureza para medicamentos, ingredientes e suplementos alimentares que são fabricados, distribuídos e consumidos em todo o mundo. A USP trabalha hoje com cientistas e profissionais da academia e da indústria de diversos países com o objetivo de melhorar a saúde global através de padrões públicos e programas relacionados, importantes especialmente nos países com recursos limitados para estabelecer esta regulamentação. Com sua equipe e laboratórios no Brasil, tem interesse na capacitação de seus cientistas na metodologia e fundamentação científica para o desenvolvimento e aprimoramento de processos de Garantia de Qualidade envolvidos na produção de medicamentos no país. Em relação aos processos relativos à análise farmacêutica, em que é referência para garantir e controlar a qualidade dos produtos farmacêuticos em todo o mundo, sua missão é disponibilizar padrões documentais e métodos analíticos utilizados por diversas empresas e laboratórios farmacêuticos através de suas publicações oficiais. As publicações mais importantes da USP são:

- *United States Pharmacopeia-National Formulary* (USP-NF): é uma combinação de dois compêndios - a *United States Pharmacopeia* (USP) e o *National Formulary* (NF) - abrangendo procedimentos padrões para a garantia da qualidade, assuntos regulatórios, pesquisa e desenvolvimento de métodos analíticos aplicados a princípios ativos, excipientes, medicamentos, medicamentos biológicos, equipamentos médicos, suplementos alimentares e outras formas terapêuticas. A USP-NF é adotada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) como referência para o controle de medicamentos comercializados nos

Estados Unidos.

- *Food Chemical Codex (FCC)*: é um compêndio reconhecido internacionalmente para a determinação da pureza e qualidade de uma ampla variedade de ingredientes alimentícios, como conservantes, edulcorantes, agentes de cor e nutrientes. O FCC é revisado e atualizado através de revisões colaborativas abertas que envolvem profissionais da indústria, do governo, da academia e do público em geral.
- *Dietary Supplements Compendium (DSC)*: publicado a cada três anos, é um recurso importante para os fabricantes de suplementos alimentares e fornecedores destes ingredientes. Contém monografias, guias regulatórios e ferramentas relevantes para a cadeia de suprimento de suplementos alimentares.
- *USP Dictionary of United States Adopted Names (USAN)*: é uma referência para nomes de drogas e suas estruturas químicas. Além do USANs, fornece os *International Nonproprietary Names (INNs)*, *British Approved Names*, *Japanese Accepted Names*, *Unique Ingredient Identifier (UNII)*, nomes comerciais, fabricantes, nomes oficiais utilizados na USP-NF, pesos moleculares, categorias farmacêuticas e terapêuticas e a pronúncia dos nomes.
- *USP Compounding Compendium*: direcionada aos profissionais da manipulação de medicamentos, agregando os capítulos gerais e monografias da USP-NF relacionados a medicamentos manipulados. Inclui mais de 40 capítulos gerais e 170 monografias para diferentes fórmulas, além dos capítulos de notas gerais e requerimentos da USP.

1.2 Os medicamentos essenciais e a modernização da USP

Os medicamentos essenciais são aqueles relacionados aos cuidados básicos da saúde

da população (WHO, 2017). A *World Health Organization* (WHO) classifica e seleciona alguns medicamentos como *essenciais* considerando a incidência das doenças que eles tratam, sua relevância à saúde pública, as evidências de eficácia e segurança e a relação custo-benefício destes medicamentos. São produtos utilizados para o tratamento de doenças relevantes, como aquelas apontadas nos estudos de carga global (WANG et al, 2012; NAGHAVI et al, 2013; WANG et al, 2015), e que a WHO preconiza que deveriam estar sempre disponíveis à população pelo sistema de saúde em dosagens apropriadas, com qualidade assegurada, a um preço acessível e em quantidades adequadas para suprir sua demanda. Por isso, a WHO publica bianualmente a lista dos medicamentos essenciais, incluindo suas formas farmacêuticas, dosagens, indicações e restrições de uso em crianças.

É de responsabilidade das autoridades sanitárias e regulatórias de cada país assegurar que todos os medicamentos comercializados tenham qualidade e que diferentes produtos com mesma indicação sejam intercambiáveis. A presença de um medicamento na lista de medicamentos essenciais evidencia que garantir sua qualidade, segurança e eficácia impacta positivamente na saúde da população de todo o mundo, e por isso a USP busca publicar procedimentos e monografias relacionadas a estes medicamentos e às matérias-primas utilizadas em suas formulações. Este processo envolve a prospecção de monografias relacionadas a estes produtos junto aos comitês de especialistas e fabricantes, o recebimento e a avaliação da documentação e a verificação da adequabilidade dos procedimentos analíticos sugeridos, que são ferramentas fundamentais para dar suporte aos sistemas da qualidade associados aos processos de fabricação e controle de qualidade destes medicamentos e das matérias-primas utilizadas em sua composição.

Com o crescimento e o dinamismo da indústria farmacêutica, muitos medicamentos essenciais tornaram-se produtos globalizados e atualmente podem ser produzidos e consumidos em diferentes partes do mundo. Sob a ótica regulatória, os compêndios da USP

podem ser adotados como referência para compor os processos de registro e garantia da qualidade de produtos farmacêuticos em diversos países do mundo, inclusive no Brasil. Por isso, o grande desafio da USP é se posicionar também como organização globalizada, na medida em que trabalha para contribuir com as iniciativas de harmonização de capítulos gerais e monografias entre os diversos compêndios farmacopéicos mundiais e comprovar a adequabilidade das suas publicações (em especial dos procedimentos analíticos utilizados em suas monografias) na identificação de matérias-primas e medicamentos falsificados, no controle da qualidade de princípios ativos farmacêuticos obtidos por diferentes processos, diversas rotas sintéticas de diversos fabricantes localizados em diferentes países, assim como no controle de qualidade de medicamentos de mesma forma farmacêutica, mas com diferentes formulações. Uma atividade importante neste contexto é o desenvolvimento analítico, tanto para a elaboração de novos métodos que irão compor novas monografias quanto para modernizar métodos baseados em tecnologias obsoletas ou dispendiosas que já fazem parte de monografias publicadas nos compêndios. Além disso, o aprimoramento dos métodos analíticos descritos nas publicações da USP pode ser sugerido pelo próprio mercado através da análise crítica e do desenvolvimento e validação de métodos alternativos, com o objectivo de aprimorar os processos da garantia da qualidade dos produtos envolvidos.

Um aspecto muito importante no planejamento desta atividade é a busca do equilíbrio entre a necessidade da adoção de técnicas e tecnologias de ponta e a capacidade do setor regulado em adotá-las e implementá-las em suas atividades de rotina. Os aspectos relacionados ao avanço das tecnologias aplicadas às análises farmacêuticas para melhoria da qualidade de medicamentos e alimentos comercializados nos Estados Unidos têm sido objeto de diversas discussões entre a USP, seus comitês de especialistas, o FDA e os representantes da indústria farmacêutica e alimentícia, com respeito da necessidade da imposição de tais técnicas e os impactos para adequação do parque analítico das empresas, além de discussões

internas na USP sobre o direcionamento adequado dos recursos disponíveis para modernização da instrumentação analítica, a montagem das equipes e como os aspectos da modernização impactam na missão da organização. Desde 2010 os trabalhos de desenvolvimento analítico, ainda que de forma intermitente, são realizados também nas plantas internacionais da USP na China, Índia e Brasil, executando projetos para a modernização de métodos para monografias existentes e para a criação de monografias alternativas para alguns medicamentos essenciais.

No final do ciclo de 2010-2015, os executivos da USP, em conjunto com seu Conselho, determinou uma mudança estratégica em seus valores e suas diretrizes de atuação de forma a priorizar os recursos disponíveis e direcionar os esforços para maximizar o impacto de suas ações em sua Missão. Desta forma, os *Core Values* (Valores Centrais) foram redefinidos e sete *Winning Ambitions* (Ambições Vencedoras) foram estabelecidas, sendo a primeira *Up-to-date* (Atualização). Estas determinações guiarão as ações da organização até o final do ciclo 2015-2020, quando serão revistas. Os conceitos embutidos na ambição *Up-to-date* são promover a atualização dos procedimentos obsoletos, eliminar produtos sem utilidade e aprimorar as publicações e os padrões de referência de maior relevância para o mercado farmacêutico. Assim, diversos grupos de trabalho vêm desenvolvendo projetos para identificar monografias de produtos obsoletos, métodos analíticos ultrapassados e processos com oportunidades de melhoria. Neste contexto, oportunidade como o presente estudo pode compor uma alternativa de parceria entre a USP e a universidade para contribuir neste âmbito, para desenvolver e validar um procedimento de referência através de uma abordagem científica apropriada, contribuindo para a eficiência da garantia de qualidade de produtos farmacêuticos relevantes e demonstrar que a adoção de métodos analíticos mais modernos pode demandar um maior investimento inicial em implementação de novas tecnologias, mas pode trazer economia de tempo e recursos às empresas que fabricam estes produtos.

1.3 Ondansetrona como o objeto de estudo

A ondansetrona é um ingrediente ativo farmacêutico (IFA) desenvolvido pela companhia *Glaxo Group Limited* (atualmente *GlaxoSmithKline*), que resultou em uma patente depositada em 1987, declarando inicialmente sua utilidade no tratamento da enxaqueca e de transtornos mentais como a esquizofrenia (COATES; BELL; HUMBER, 1987). Foi administrado em humanos pela primeira vez no ano de 1984 e em mais de 220 voluntários saudáveis nos quatro anos subsequentes (BLACKWELL; HARDING, 1989). As primeiras publicações a respeito de testes clínicos e de eficácia com o composto datam do final dos anos 1980 (BARNES et al. 1990; ROILA et al., 1991) e diversos estudos foram realizados nos anos 1990 comprovando sua eficácia como antiemético (SMITH et al., 1991; MORROW; HICKOK; ROSENTHAL, 1995; SULLIVAN et al., 1996; TRAMÈR et al., 1999). Seu mecanismo de ação é como antagonista dos receptores 5-HT₃ da serotonina. Atinge os nervos centrais e periféricos, reduzindo a atividade do nervo vago, que desativa o centro emético do bulbo raquidiano e também bloqueia os receptores da zona do disparador do quimiorreceptor (SNEADER, 2006). Medicamentos contendo ondansetrona são utilizados principalmente como antiemético no tratamento de náuseas e vômitos e para os cuidados paliativos dos sintomas comuns decorrentes do tratamento quimioterápico (VRABEL, 2007; AAPRO et al., 2013), nos quadros de enjoos do pós-operatório (TRAMÈR, 2001; HABIB; GAN, 2004), no tratamento da hiperêmese gravídica (SIU et al., 2012; PASTERNAK; SVANSTRÖM; HVIID, 2013) e também na redução do consumo de álcool e no prolongamento da abstinência dos dependentes químicos (JOHNSON et al., 2000; FILHO; BALTIERI, 2013). Tem pouco efeito sobre as náuseas causadas pelo movimento. Estudos clínicos (FARHAT et al., 2013; IBRAHIM; ELDESUKY; IBRAHIM, 2013; NGAMPRAMUAN et al., 2013; FREEDMAN et al., 2014; AZIMARAGHI et al., 2014) e de desempenho para medicamentos em formas farmacêuticas modernas (OBATA et al., 2010;

HU et al., 2011; PATTNAIK et al., 2011; ABOOD et al., 2013; BEG et al., 2013; BOURDON et al., 2013) contendo ondansetrona continuam sendo realizados. Sua presença na lista de medicamentos essenciais da WHO e a criticidade dos quadros clínicos dos pacientes que fazem uso da ondansetrona evidenciam a importância da disponibilidade e da segurança destes medicamentos em todos os países em que são comercializados.

A 19ª edição da lista dos medicamentos essenciais (WHO, 2015) menciona três formas farmacêuticas contendo ondansetrona: solução injetável (2 mg da base/mL na forma de cloridrato de ondansetrona), solução oral (4 mg da base/5 mL) e comprimidos (4 e 8 mg de base/comprimido), indicados para cuidados paliativos e como antiemético para adultos e crianças com mais de 1 mês de idade. A forma farmacêutica comprimidos contendo 24 mg de ondansetrona base é somente utilizada como antiemético, com restrição para o uso em crianças.

1.3.1 As monografias compendiais para ondansetrona e seus medicamentos

A publicação da primeira monografia relacionada ao composto ondansetrona no compêndio USP-NF foi proposta pela companhia *GlaxoSmithKline*, e em 1999 as monografias *Ondansetron Hydrochloride* e *Ondansetron Injection* foram publicadas oficialmente no 10º suplemento da edição USP 23-NF 18. Em 2004, a companhia *Barr Laboratories Inc.* (atualmente uma subsidiária da *Teva Pharmaceutical Industries Ltd*) submeteu propostas para a publicação das monografias *Ondansetron* e *Ondansetron Tablets*, que foram publicadas oficialmente no ano de 2005, no segundo suplemento da edição USP 28-NF 23.

Entre os principais compêndios farmacopéicos do mundo, apenas a USP-NF, a *European Pharmacopoeia* (Ph. Eur.), a *British Pharmacopoeia* (BP) e a *Indian Pharmacopoeia* (IP) apresentam monografias relacionadas à ondansetrona e medicamentos contendo este IFA. Já as edições atuais da Farmacopeia Brasileira (5ª Edição, 2010), da

Farmacopeia Japonesa (JP XVI, 2014) e da Farmacopeia Internacional (5ª Edição, 2015) não apresentam monografias mencionando este IFA nem medicamentos relacionados a ele.

A tabela 1 resume os compêndios farmacopéicos que possuem monografias para as diferentes formas do IFA e os produtos farmacêuticos que o contém.

Tabela 1. Monografias relacionadas à ondansetrona e sua disponibilidade nas edições atuais dos principais compêndios farmacopéicos mundiais. (✓) disponível na edição atual; (-) ausente.

Princípio ativo / Produto	Compêndio farmacopéicos			
	USP 39-NF 34	IP 2014	Ph. Eur. 9 th	BP 2016
Ondansetrona	✓	-	-	-
Cloridrato de ondansetrona	✓	✓	-	-
Cloridrato de ondansetrona di-hidratado	-	-	✓	✓
Comprimidos	✓	✓	-	✓
Comprimidos de desintegração oral	✓	✓	-	-
Solução injetável	✓	✓	-	✓
Solução oral	✓	✓	-	-
Suspensão oral	✓	-	-	-

No caso da matéria-prima ondansetrona e cloridrato de ondansetrona, as monografias da USP-NF listam diversos parâmetros que devem ser monitorados para que o lote analisado seja considerado adequado para a fabricação de um produto farmacêutico. A identidade do composto deve ser comprovada pela comparação dos espectros no infravermelho da amostra contra um padrão de referência, obtidos através da técnica de pastilhas em brometo de potássio (para a ondansetrona base) e da dispersão em óleo mineral (para o cloridrato de ondansetrona). Há limites para o conteúdo de água, de resíduos não voláteis e de cloridrato (para a ondansetrona base). Devem também possuir teor entre 98,0 e 102,0%.

Os parâmetros requeridos nas monografias da USP-NF para os medicamentos contendo ondansetrona incluem diferentes testes para identificação do IFA, utilizando

espectrofotometria no infravermelho, coincidência do tempo de retenção do pico principal por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e coincidência da mancha principal por cromatografia em camada delgada (CCD), e outras determinações específicas relacionadas a cada uma das formas farmacêuticas, como pH, limite de micro-organismos, limite de material particulado, limite de toxinas bacterianas; desintegração, dissolução e uniformidade de conteúdo. Um dos requerimentos em comum tanto para os ingredientes ativos quanto para os medicamentos é a determinação de impurezas orgânicas e produtos de degradação, e ao todo são mencionados oito compostos que devem ser monitorados (figura 1). Para isso, diferentes métodos analíticos por CLAE e por CCD são requeridos em cada uma das monografias para a determinação de teor do ingrediente ativo e do conteúdo de impurezas específicas. A tabela 2 mostra os diferentes métodos cromatográficos listados nas diversas monografias de cada um dos compêndios.

Tabela 2. Métodos cromatográficos descritos em monografias dos compêndios mundiais.

Princípio ativo / forma farmacêutica	Compêndio farmacopéico			
	USP-NF	IP	Ph. Eur.	BP
Ondansetrona	CLAE 1 CLAE 2	-	-	-
Cloridrato de ondansetrona	CLAE 1 CLAE 3 CCD 1	CLAE 3	-	-
Cloridrato de ondansetrona di-hidratado	-	-	CCD 2 CLAE 8	CCD 2 CLAE 8
Comprimidos	CLAE 4	CLAE 7	-	CCD 2 CLAE 8
Comprimidos de desintegração oral	CLAE 2 CLAE 5	CLAE 2 CLAE 5	-	-
Solução injetável	CLAE 1 CLAE 3	CLAE 3	-	CCD 2 CLAE 8
Solução oral	CCD 1 CLAE 1 CLAE 3	CCD 1 CLAE 1 CLAE 7	-	-
Suspensão oral	CLAE 6	-	-	-

Figura 1. Ondansetrona e as oito impurezas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph. Eur.

A tabela 3 lista a aplicação de cada um dos diferentes métodos analíticos dentro do universo das monografias publicadas somente no compêndio USP-NF. São seis métodos diferentes por CLAE e um por CCD. Existem muitas semelhanças e parâmetros em comum entre os métodos, porém as diferenças na composição e vazão da fase móvel, temperatura da coluna cromatográfica e comprimento de onda para detecção exigem que diferentes métodos sejam executados de maneira independente na rotina do laboratório para análise e liberação dos respectivos produtos ao mercado, pois cada método analítico requer principalmente uma

etapa de estabilização inicial com a composição específica da fase móvel e a realização de corridas para confirmação da adequabilidade do sistema.

Tabela 3. Métodos analíticos e suas aplicações em cada uma das monografias descritas no compêndio USP-NF. TO = teor de ondansetrona; Li = limite de impureza i ; OI = outras impurezas; OND = ondansetrona; CLO = cloridrato de ondansetrona; COM = comprimidos; CDO = comprimidos de desintegração oral; INJ = solução injetável; ORA = solução oral; SUS = suspensão oral. (-) = composto não mencionado na monografia.

Determinação	Monografias publicadas na USP-NF						
	OND	CLO	COM	CDO	INJ	ORA	SUS
TO	CLAE 2	CLAE 3	CLAE 4	CLAE 2	CLAE 3	CLAE 3	CLAE 6
LA	-	CLAE 3	CLAE 4	-	-	CLAE 3	-
LB	-	-	-	-	-	-	-
LC	-	CLAE 3	CLAE 4	-	-	-	-
LD	CLAE 1	CLAE 1	CLAE 4	CLAE 5	CLAE 1	CLAE 1	-
LE	-	CLAE 3	-	-	-	CLAE 3	-
LF	-	CLAE 3	CLAE 4	CLAE 5	-	CLAE 3	-
LG	-	-	CLAE 4	-	-	CLAE 3	-
LH	-	-	-	-	-	CLAE 3	-
OI	CLAE 2	CCD 1	CLAE 4	CLAE 5	CLAE 3	CLAE 3	-

É importante considerar que variações em alguns parâmetros cromatográficos dos métodos por eluição isocrática são permitidas pelo capítulo geral <621> *Chromatography* da USP-NF. Alterações nas dimensões da coluna são permitidas, mas somente na medida em que a razão entre o comprimento da coluna e o tamanho da partícula (L/dp) e o número de pratos teóricos (N) resultem dentro de uma faixa entre -25% e +50% dos valores obtidos considerando-se os parâmetros do método original. Alterações mais significativas nas dimensões da coluna podem requerer ajustes no volume de injeção e na vazão, a fim de manter a eficiência da coluna em até 80% do valor original.

A tabela 4 mostra as semelhanças e a tabela 5 mostras as diferenças entre os métodos por CLAE citados na tabela 2. Os parâmetros cromatográficos para os dois métodos por CCD estão resumidos na tabela 6.

Tabela 4. Parâmetros cromatográficos em comum para os métodos CLAE 1 a 8. ^a O método CLAE 3 na monografia Ondansetrona Solução Injetável na USP-NF requer coluna de dimensões 20 cm x 4,6 mm. ^b O método CLAE 6 requer vazão de 1 mL/min.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Grupos nitrila quimicamente ligados a partículas de sílica porosa de 1,5 a 10 µm de diâmetro (coluna ciano, designação USP L10)
Dimensões	25 cm x 4.6 mm ^a
Vazão (mL/min)	1,5 ^b
Solvente orgânico da fase móvel	Acetonitrila
Compatibilidade com EM	Incompatível
Tipo de eluição	Isocrática
pH da fase móvel aquosa	5,4

Tabela 5. Diferenças entre os parâmetros cromatográficos para os métodos CLAE 1 a 8. ^a O método CLAE 1 para determinação da Impureza D em cloridrato de ondansetrona utiliza temperatura ambiente. ^b O método CLAE 3 para a determinação de impurezas na solução injetável utiliza 20 µL.

Parâmetro	Valor / descrição	Métodos associados
Temperatura da coluna	30°C Temperatura ambiente	CLAE 1 e 2 ^a Demais métodos
Deteção	UV em 328 nm UV em 216 nm	CLAE 1 Demais métodos
Volume de injeção	10 µL 20 µL 80 µL	CLAE 2, 3, 4 e 7 ^b CLAE 1, 5 e 8 CLAE 6
Fase móvel - Solução aquosa	KH ₂ PO ₄ 0,02 M com pH a 5,4 KH ₂ PO ₄ 0,043 M com pH a 5,4 NaH ₂ PO ₄ 0,02 M com pH a 5,4	CLAE 1, 2, 4, 5, 6 e 7 CLAE 6 CLAE 3 e 8
Proporção entre fase móvel aquosa e solvente orgânico	85:15 80:20 52:48 50:50	CLAE 6 CLAE 1, 4, 5 e 8 CLAE 2 CLAE 3 e 7
Par crítico	Ondansetrona e Impureza A Ondansetrona e Impureza D Impureza D e Impureza C	CLAE 2, 3, 4 e 7 CLAE 5 CLAE 1 e 8
Resolução mínima	1,5 2,0 2,5	CLAE 1, 2, 3, 5 e 7 CLAE 4 CLAE 8

Tabela 6. Diferenças entre os parâmetros cromatográficos para os métodos CCD 1 e 2. ^a A análise da solução injetável pela BP requer aplicação de 100 µL de amostra.

Parâmetro	Método cromatográfico	
	CCD1	CCD2
Diluyente	Metanol	Amônia, etanol e metanol (0.5:100:100 v/v/v).
Placa	Sílica gel 0,25mm	Sílica gel F ₂₅₄
Fase móvel	Clorofórmio, acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (90:50:40:1)	Diclorometano, acetato de etila, metanol e solução de amônia concentrada (90:50:40:2)
Deteccão	UV a 254nm	UV a 254nm
Aplicação	20 µL	20 a 100 µL ^a
Concentração da amostra	12,5 mg/mL	12,5 mg/mL
Pares críticos	IA e IB IB e Ondansetrona	IA e IB IB e Ondansetrona
Critérios de aceitação	< 0.4% de IA e IB < 0.2% outras impurezas	< 0.4% de IB

A concentração de ondansetrona descrita para determinação de teor pelos vários métodos varia de 0,04 mg/mL (para a análise da suspensão oral pela USP-NF) até 0,50 mg/mL (para a análise do cloridrato de ondansetrona di-hidratado pela Ph. Eur.). Para a determinação de impurezas e compostos de degradação, a concentração das amostras vai de 0,09 (para a solução oral pela IP) a 0,8 mg/mL (para a solução oral pela USP-NF).

Considerando o apelo das aplicações e as características dos métodos descritos nas monografias pertinentes, é possível afirmar que os métodos CLAE 3, CLAE 4 e CLAE 8 são os mais completos, pois são aplicados tanto para a determinação do teor de ondansetrona quanto para a determinação de impurezas e compostos de degradação em diferentes monografias, abrangendo o maior número de impurezas conhecidas. Os métodos CLAE 3 e CLAE 4 fazem parte do conjunto de monografias publicadas na USP-NF, enquanto o método CLAE 8 é o método utilizado nas monografias da Ph. Eur. e da BP.

Na monografia *Ondansetron Hydrochloride Dihydrate* da Ph. Eur. é mencionado na descrição do teste de impurezas que as impurezas E e F podem coeluir, e as impurezas A e G

podem coeluir ou estar invertidas na ordem de eluição, mostrando que existem oportunidades de melhoria para a identificação inequívoca e quantificação adequada do conteúdo destas impurezas nas amostras pertinentes. A figura 2 mostra o cromatograma de referência disponível para a monografia para *Ondansetron Hydrochloride Dihydrate* da Ph. Eur.

Figura 2. Cromatograma de referência para o teste de impurezas da monografia *Ondansetron Hydrochloride Dihydrate* da EP. Fonte: European Pharmacopoeia.

O método CLAE 3 é proposto para a determinação de seis impurezas nas monografias para o cloridrato de ondansetrona, a solução injetável e a solução oral da USP-NF. O cromatograma da solução de adequabilidade do sistema (figura 3) mostra que a resolução do par crítico atende o requerimento mínimo, mas pode ser melhorado. Além disto, a determinação do conteúdo da Impureza D exige a execução de um método adicional (CLAE 1). Isto mostra que os métodos compendiais para determinação do teor, impurezas e produtos de degradação em ondansetrona e seus medicamentos podem ser aprimorados.

Figura 3. Cromatograma para a solução de adequabilidade do sistema na execução do método CLAE 3. Fonte: estudo colaborativo do Laboratório de Padrões de Referência da USP-Brasil.

1.3.2 Métodos disponíveis na literatura

Uma recente revisão (BOSCH et al., 2017) listou diversos métodos analíticos utilizados para a determinação de compostos antagonistas dos receptores 5-HT₃ (entre eles a ondansetrona) em produtos farmacêuticos e amostras biológicas, mostrando que poucos métodos para a determinação destes compostos foram publicados e são baseados principalmente na técnica de CLAE. Foram listados poucos métodos para determinação de ondansetrona em medicamentos por espectrofotometria UV, mas diversos métodos por CLAE com aplicações em estudos de biodisponibilidade, determinação do teor e pureza para o controle de qualidade e estudos de dissolução. Entre eles, somente três trabalhos foram direcionados para determinação da ondansetrona e de suas impurezas compendiais. Em dois destes trabalhos (ZIZKOVSKY; KUCERA; KLIMES, 2007) foram utilizadas colunas cromatográficas baseadas em partículas de óxido de sílica, óxido de zircônio e óxido de titânio para a separação da ondansetrona e cinco de suas impurezas compendiais, obtendo

dois métodos interessantes. O primeiro utilizou fase estacionária baseada em partículas de óxido de zircônio revestidas com polibutadieno (Zr-PBD), fase móvel composta por acetonitrila e fosfato de amônio a 25 mM/L com pH 7,0 (18:82), temperatura da coluna em 50°C, vazão a 2,7 mL/min e detecção por UV a 216 nm. O curto tempo de corrida de 7,5 minutos e a resolução acima de 2,0 entre todos os compostos e seus respectivos picos adjacentes foi interessante, porém a precisão para cinco dos seis compostos apresentou desvio padrão relativo acima de 2,0% (figura 4). O segundo método utilizou coluna com fase estacionária baseada em partículas de óxido de titânio revestidas com polietileno (TiO₂-PE), fase móvel composta por acetonitrila e fosfato de amônio a 25 mM/L com pH 6,0 (18:82), temperatura da coluna em 50°C, vazão da fase móvel a 1,5 mL/min e detecção por UV a 216 nm, com tempo de corrida de 9,5 minutos. O desvio padrão relativo para todos os compostos ficou abaixo de 1,5%.

Figura 4. Cromatograma da solução de ondansetrona e impurezas C, D, E, F e G resultante da execução do método composto pela coluna Zr-PBD, fosfato de amônio 25 mM, pH 7,0 e acetonitrila (82:18) como fase móvel, vazão de 2,7 mL/min e temperatura da coluna a 50°C (ZIZKOVSKY; KUCERA; KLIMES, 2007).

Estes trabalhos evidenciaram características importantes dos compostos envolvidos para obtenção de um método de separação eficiente por cromatografia em fase reversa. A diferença entre os fatores de retenção das impurezas E e F em relação aos demais compostos é o principal desafio deste conjunto de compostos, trazendo dificuldades relacionadas à seletividade, longa retenção de alguns compostos em função da pouca retenção das impurezas E e F, picos assimétricos para os compostos mais retidos e longo tempo de corrida. Em geral, o uso do metanol como solvente orgânico promoveu retenção acentuada dos compostos e alargamento dos picos por sua menor força de eluição, enquanto a acetonitrila contribuiu para eluição mais rápida, mas também para o aumento da seletividade dos métodos. As variações de pH e da concentração do sistema tampão não apresentaram efeito significativo na retenção dos compostos quando da utilização das tradicionais colunas sílica ciano e C₁₈. Já nas colunas Zr-PBD e TiO₂-PE, que podem operar em mecanismos de fase reversa e também de troca iônica, o comportamento de base de Lewis dos compostos na faixa de pH da fase aquosa entre 4,5 e 5,0 contribuiu para sua maior retenção. A retenção das impurezas C e D não é afetada pelas variações destes parâmetros, pela ausência do grupo imidazol e seu caráter neutro.

Apesar de colunas com partículas baseadas em óxido de zircônio e óxido de titânio teoricamente oferecerem maior versatilidade quanto às faixas de operação de pH (de 1 a 14) e temperatura (até 200°C), os métodos que apresentaram seletividade adequada e com menor tempo de corrida utilizaram faixas de pH (6,0 a 7,0) e temperatura da coluna (50°C), valores compatíveis com as colunas tradicionais baseadas em partículas de óxido de sílica. O uso de eluição por gradiente não foi explorado, e as impurezas A, B e H não foram incluídas nestes trabalhos.

VARVARA e sua equipe (2008) desenvolveram um método para separação da ondansetrona e duas impurezas compendiais (A e C), composto pela coluna *porous graphitic*

carbon (PGC), com temperatura da coluna a 50°C, fase móvel com solução de ácido trifluoroacético a 0,1% (p/v) em acetonitrila e água (90:10), vazão de 1,5 mL/min e detecção por UV em 216 nm. Um aspecto interessante deste método é o modo de operação da coluna por adsorção e interações induzidas por carga de compostos polares com a superfície polarizada do grafite, que contribuiu para a separação destes três compostos. Em outro trabalho (VARVARA et al., 2009) desenvolveram um método utilizando a coluna *YMCbasic*[®] para a separação da ondansetrona e das impurezas A, C e D. Esta coluna contém grupos silanóis neutros para minimizar a interação com compostos ionizados e também cadeia de oito carbonos e outros grupos alquila menores monomericamente ligados ao suporte, conferindo uma seletividade complementar às tradicionais colunas C₈ e C₁₈. Mesmo com o pH da fase móvel aquosa em 3,0 (em que a ondansetrona e a impureza A apresentam-se protonadas), os resultados para a simetria dos picos e resolução entre os compostos foram satisfatórios. O método consistiu de fase móvel composta por fosfato de sódio monobásico a 10 mM (com pH ajustado a 3,0 com ácido fosfórico) e metanol (60:40), detecção por UV a 308 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL, coluna com dimensões de 25 cm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm e tempo de corrida de 30 minutos (figura 5).

Um estudo sobre a estabilidade da ondansetrona sob condições de estresse (SOURI et al., 2014) utilizou um método por CLAE composto pela coluna *Waters Nova-Pak*[®] C₁₈ com dimensões de 15 cm x 3,9 mm, tamanho de partícula de 4 µm, fase móvel composta por fosfato de sódio monobásico a 20 mM com pH 5,0 e acetonitrila (65:35), vazão de 1 mL/min, detecção por UV a 284 nm e volume de injeção 20 µL. A análise das amostras mostrou queda de cerca de 16% de seu teor sob condições de hidrólise ácida e básica após 30 minutos a 80°C (com um pico adicional no início do cromatograma) e queda de 51% no teor após exposição em solução com peróxido de hidrogênio a 10% por 30 min a 80°C (com dois picos adicionais eluindo antes do pico principal).

Figura 5. Cromatograma da solução de ondansetrona e impurezas A, C e D resultante da execução do método composto pela coluna *YMChasic*[®], fosfato de sódio monobásico a 10 mM pH 3,0 e metanol (60:40), detecção por UV a 308 nm, vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL (VARVARA et al., 2009).

As soluções expostas à luz UV e aquecimento apresentaram quedas de 30% e 12% no teor de ondansetrona respectivamente, mas nenhum pico adicional foi detectado. A identidade dos compostos de degradação detectados não foi investigada, e a possibilidade de outros compostos de degradação estarem coeluído com o pico principal não foi investigada, apesar da intensa degradação observada.

Outros métodos por CLAE foram utilizados para monitoramento da estabilidade da ondansetrona em produtos farmacêuticos e em soluções mantidas em equipamentos médicos, como em solução de dextrose a 5% e cloreto de sódio injetáveis em seringas de polipropileno (CASTO, 1994; BURM, 1997) e em associação com outros IFA (STEWART et al., 1998; BOUGOUIN et al., 2001; WANG et al., 2016; FANG et al., 2016), incluindo a exposição das amostras a condições de estresse por temperatura, hidrólise ácida e alcalina. Em alguns trabalhos verificou-se queda no teor (CASTO, 1994; BURM, 1996; STEWART et al., 1998; FANG et al., 2016), porém a identidade ou concentração de possíveis compostos de degradação formados não foram determinadas.

Diversos métodos utilizando CLAE e detecção por espectrometria de massas (EM) também foram desenvolvidos, essencialmente para determinação da ondansetrona em amostras de soro humano, ratos e coelhos para realização de estudos não clínicos e clínicos. Apesar da separação cromatográfica não ser o foco destes métodos pela própria característica da técnica, seus parâmetros trazem informações importantes para direcionar o desenvolvimento e aprimoramento dos parâmetros do espectrômetro de massas para utilizá-lo como detector auxiliar para evidenciar a identidade de impurezas, compostos de degradação e outros compostos presentes nas amostras estudadas neste projeto. A tabela 7 lista os parâmetros principais de alguns destes métodos. De forma geral, estes trabalhos mostram que a ondansetrona é analisada por cromatografia líquida de fase reversa, com fases móveis compostas por acetato de amônio ou formato de amônio em concentrações entre 0,25 e 20 mM e pH abaixo de 5, em acetonitrila ou metanol, utilizando ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo. Os limites de detecção e quantificação estiveram na escala de partes por bilhão (ppb), como é típico da técnica. Estas configurações alinham-se com aquelas dos métodos publicados para a separação da ondansetrona e suas principais impurezas compendiais.

Outros métodos para determinação da ondansetrona e suas impurezas compendiais foram desenvolvidos por outras técnicas. ARAMA e sua equipe (2011) investigou a possibilidade do uso de eletroforese capilar de zona (CZE) para obter a separação entre a ondansetrona e as impurezas A, C e D. As condições para a determinação da ondansetrona e da impureza A foram obtidas, mas o caráter neutro das impurezas C e D fez com que sua mobilidade resultasse somente do próprio fluxo eletrosmótico e coeluiram no eletroferograma. Algumas aplicações de cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) para determinação de ondansetrona em diferentes amostras foram publicadas (ALTRIA; MCLEAN, 1998; BOURDON et al., 2013), porém não direcionadas à determinação das

impurezas compendiais. Alguns métodos por cromatografia de alta eficiência em camada delgada (HPTLC) para a determinação do teor de ondansetrona na matéria-prima e em comprimidos (MUJATABA et al., 2011) e em associação com outros ingredientes ativos (PURANIK et al, 2008) também foram publicados, porém sem menção à determinação de qualquer potencial impureza.

Tabela 7. Parâmetros utilizados nos diferentes métodos por CLAE-EM para determinação de ondansetrona em diferentes amostras. SIM = *single ion monitoring*.

Referência	Coluna cromatográfica	Fase móvel	Fonte de ionização / modo	Transição (m/z)	Faixa de quantificação (ppb)
XU; BARLETT; STEWART, 2000	Alltech Silica	Acetato de amônio 20 mM pH 4,7 e acetonitrila (85:15)	ESI / Positivo	294→170	1 - 500
ABDEL-HAMID; SHARMA, 2004	XTerra C ₁₈	Ácido fórmico 0,1% em água e metanol (70:30)	ESI / Positivo	294→169	8 - 80
DOTSIKAS et al., 2006	YMC-Pack Ciano	Acetato de amônio 20 mM e metanol (20:80)	ESI / Positivo	294,3→169,9	0,25 - 40
LIU et al., 2008	Ultron ES-OVM Ovomucoid	Acetato de amônio 5mM, metanol, e ácido acético (80:20:0,02)	ESI / Positivo	294→170	0,10 - 40
KOUFOPANTELIS et al., 2009	Agilent Zorbax XDB C ₈	Ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila (75:25)	ESI / Positivo	294 (SIM)	10 - 5000
ALVAREZ et al., 2011	Thermohypersil Highpurity C ₁₈	Formato de amônio 2 mM pH 3,8 e acetonitrila (60:40)	ESI / Positivo	294,0→212,0 294,0→170,1	0,50 - 500
MOREIRA et al., 2010	Agilent Zorbax Eclipse C ₁₈	Formato de amônio 0,25 mM em acetonitrila e água (1:1)	ESI / Positivo	294,2→170,0	0,2 - 60
MUSSHOFF et al., 2010	Chiralcel OD-R	Formato de amônio 5 mM a pH 3,5 e acetonitrila (eluição gradiente)	APCI / Positivo	293,8→170,0	2,5 - 250
PANG et al., 2012	Agilent SB-C ₁₈	Ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila	ESI / Positivo	294,0→169,7	5 - 1000
NINAMA et al., 2013	Gemini NX C ₁₈	Formato de amônio 2 mM pH 3,0 e acetonitrila (30:70)	ESI / Positivo	294,3→170,0	1,0 - 100,0

1.4 Desenvolvimento de um novo método indicativo de estabilidade

Atualmente, a determinação do perfil de impurezas e compostos de degradação da ondansetrona e de medicamentos contendo este ativo pelas respectivas monografias farmacopéicas é realizado através de diversos métodos analíticos por CLAE e CCD, resultando em um conjunto laborioso. Os métodos disponíveis na literatura não se apresentam como melhor alternativa para a determinação das impurezas orgânicas compendiais, da identidade e do conteúdo dos potenciais compostos de degradação resultantes dos processos de hidrólise ácida, hidrólise alcalina, exposição à luz ultravioleta e ao aquecimento, mas mostram o potencial dos diferentes mecanismos de interação entre os compostos deste conjunto e as diversas fases estacionárias disponíveis no mercado que podem ser estudados para obter um novo método de separação por cromatografia líquida de fase reversa, assim como evidenciam a possibilidade do uso de EM para fornecer dados sobre a identidade de compostos desconhecidos. Os laboratórios da USP possuem a estrutura necessária para explorar o conjunto de compostos relacionados à ondansetrona e desenvolver um método alternativo de características modernas para a separação de todos estes compostos, que contribua para um cenário mais favorável para a rotina dos laboratórios analíticos na execução do controle de qualidade das matérias-primas e dos produtos contendo ondansetrona.

A cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) é uma ferramenta valiosa para diversas aplicações na análise química, desde o desenvolvimento de novas drogas até o controle de qualidade na indústria. O número de publicações científicas utilizando esta técnica cromatográfica tem aumentado a cada ano, devido às vantagens relacionadas à rapidez de análise, o poder de resolução entre compostos de misturas complexas e sua compatibilidade com os detectores mais utilizados na análise farmacêutica, como ultravioleta-arranjo de diodos (UV-DAD), evaporativo de espalhamento de luz (ELS), índice

de refração (RI), fluorescência (F) e EM, entre outros (CHESNUT, SALISBURY, 2007; FEKETE et al., 2014). Em paralelo, o desenvolvimento de colunas cromatográficas com partículas menores que 2 μm , dimensões reduzidas e diferentes fases ligadas proporcionou uma ampla variedade de mecanismos de interação e opções de seletividades para obter a melhor separação para cada mistura (MALDANER, JARDIM, 2009; OJHA et al., 2013), e o desenvolvimento de novas fases estacionárias que suportem altas temperaturas (maiores que 60°C) e faixas mais amplas de pH (1 a 14) tendem a trazer ainda mais alternativas e possibilidades (FEKETE et al., 2014). Por outro lado, o desafio para o desenvolvimento analítico tornou-se maior, demandando melhor planejamento e um número maior de experimentos necessários para obter as configurações apropriadas para a separação desejada, e cada vez mais coloca em xeque a padronização da nomenclatura compendial das fases estacionárias e a possibilidade do intercâmbio de colunas de diferentes fabricantes para aplicação em um método analítico validado sem prejuízo aos seus requerimentos.

O detector UV-DAD mostra-se como primeira opção para a detecção dos compostos por estes apresentarem grupos cromóforos, e a espectrometria de massas como detector ortogonal. A espectrometria de massas com ESI acoplada à cromatografia líquida de ultraeficiência é uma ferramenta muito versátil e estabelecida (FENN et al., 1990), utilizada na análise farmacêutica para identificação e quantificação de inúmeros compostos orgânicos, sendo útil na identificação das impurezas e dos compostos de degradação desconhecidos. Os espectrômetros de massas de alta resolução como o quadrupolo-tempo-de-voo (QTOF) são equipados com mecanismo de calibração de massa constante, e condições cromatográficas adequadas podem fornecer a razão massa/carga e razões de distribuição isotópica dos compostos analisados com exatidão suficiente para a proposição de fórmulas moleculares com baixo erro. Os experimentos de fragmentação, por sua vez, são úteis na determinação elucidatória de estrutura molecular (HOLCAPEK; JIRASKO; LISA, 2012; FOTI et al., 2013).

A forma mais eficiente para explorar as alternativas de colunas cromatográficas e composição de fases móveis, analisar seus efeitos e interações na separação dos compostos e aprimorar os parâmetros do método analítico com estas características instrumentais é utilizar a abordagem por *Analytical Quality by Design* ou Qualidade Analítica por Planejamento (*aQbD*). A instrumentação disponível nos laboratórios da USP permitiu que esta abordagem fosse adotada para o desenvolvimento deste novo método analítico.

1.4.1 *Analytical Quality by Design* (aQbD)

A prática clássica para o desenvolvimento dos métodos de separação na análise farmacêutica baseia-se no estabelecimento de um método inicial construído a partir da característica e da composição da amostra estudada, buscando o aprimoramento do método através da alteração de um parâmetro por vez (SNYDER, KIRKLAND, GLAJCH, 1997). Este processo é também reflexo da limitação da instrumentação disponível, como bombas binárias com dois canais para fases móveis e compartimentos para duas colunas cromatográficas, restringindo configurações múltiplas paralelas de métodos e permitindo somente mudanças nos parâmetros mais fáceis, como a proporção das fases móveis, a vazão e a temperatura da coluna. Em geral, este processo requer um grande número de experimentos para estimar os efeitos e as interações entre os parâmetros do método (ROZET et al., 2013), sendo necessário muito tempo para avaliar o efeito de mudanças em parâmetros mais importantes como os solventes orgânicos, o pH e composição das fases móveis aquosas e as fases estacionárias.

O conceito de *aQbD* para a análise farmacêutica foi criado através de um interesse comum entre a indústria e as agências regulatórias, por ambos entenderem que os conceitos de *Quality by Design* (ou Qualidade por Planejamento) apresentados nos guias Q8, Q9 e Q10 do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) para o desenvolvimento farmacêutico também poderiam ser aplicados

ao desenvolvimento analítico, visando construir a qualidade do método analítico ao que se propõe desde sua concepção (ROZET et al., 2013). Esta prática resulta em métodos analíticos mais robustos, concebidos com mais rapidez, permitindo a adoção da melhoria contínua no ambiente analítico e a harmonização dos conceitos regulatórios (SCHWEITZER et al., 2010). É uma abordagem moderna que vem sendo adotada por muitas empresas (ARGENTINE et al., 2017) e que pode ser aplicada neste estudo. O objetivo principal é definir a região operacional planejada do método (MODR), composta pelas faixas de valores para seus parâmetros que assegurem a confiabilidade dos seus resultados (ROZET et al., 2013). Os valores de operação de cada parâmetro do método analítico final devem estar dentro destas faixas, e mudanças deliberadas ou não nestes valores dentro destes limites não afetam a qualidade dos seus resultados.

A primeira etapa deste processo é a definição do *Analytical Target Profile* ou perfil analítico desejado (ATP), que além das premissas de desempenho relacionadas à especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, linearidade e robustez, contém a descrição do propósito do método analítico, dos parâmetros críticos do processo (CPP) e dos atributos críticos da qualidade (CQA), que são os critérios de aceitação que o método deverá cumprir (ROZET et al., 2013). Em nosso caso, a simetria dos picos, a resolução entre eles, a pureza de pico e os fatores de retenção são alguns exemplos de CQA. A técnica de separação e a tecnologia a ser utilizada no desenvolvimento do método analítico devem ser descritas da forma mais completa possível, pois compõem a base para a identificação dos CPP, que por sua vez balizam os CQA.

A análise de risco é a segunda etapa, onde se aplicam diversas ferramentas para identificar os aspectos críticos que compõem o universo a ser estudado e o método a ser desenvolvido, desde a preparação da amostra até a análise dos dados. Entre estas ferramentas estão o diagrama de Ishikawa, a metodologia 5W2H, a análise de fluxograma, entre outras.

A terceira etapa é constituída pela ordenação dos fatores de risco e a priorização e avaliação experimental dos fatores controláveis do método, que em geral fazem parte do conjunto de CPP. O planejamento experimental (DOE) fornece o conjunto de experimentos que irão mostrar os efeitos de cada um dos fatores que compõem o método analítico, os efeitos de interação entre eles e o quanto as mudanças em suas proporções e valores podem influenciar no cumprimento dos CQA. Diversos tipos de planejamento podem ser utilizados para explorar os efeitos dos parâmetros principais e delimitar faixas mais estreitas dos CPP, como os planejamentos fatoriais parciais de dois níveis e Plackett-Burman, quanto para conhecer seus efeitos principais e as interações entre eles e aprimorar os parâmetros e avaliar a robustez do método, como os planejamentos fatoriais completos, composto central, Box-Behnken e Doehlert com avaliação da superfície de resposta (ORLANDINI; PINZAUTI; FURLANETTO, 2012). O principal objetivo destes planejamentos é desenvolver um modelo matemático que correlacione da forma mais exata e precisa possível os efeitos e interações das variáveis envolvidas e os resultados observados. Isto é demonstrado estatisticamente, e assim é possível definir o MODR e as faixas (ou valores pontuais) para os parâmetros do método analítico final que o farão cumprir seu propósito.

As etapas de validação do método (exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade, robustez e verificação do sistema) são realizadas para evidenciar a qualidade construída no método (VOGT; KORD, 2010). Para um método com valores pontuais para seus parâmetros, o MODR constitui a evidência de sua robustez. A partir daí é preciso estabelecer a estratégia para seu controle e melhoria contínua, avaliando as mudanças que ocorrem nos elementos que compõem o espaço de conhecimento deste método - como os instrumentos utilizados, a composição dos produtos que são analisados por este método, os fatores ambientais que influenciam nas premissas de desempenho do método, entre outros - e os impactos causados por estas mudanças. A

definição do programa de adequabilidade do sistema (sequência de corridas realizada antes de qualquer análise) e um programa de controle de mudanças abrangente e dinâmico contribuem para a manutenção de um método analítico eficiente ao seu propósito.

2 Objetivo

Desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade seguindo os requerimentos dos guias e legislações relevantes para a avaliação do teor, impurezas e compostos de degradação em princípios ativos farmacêuticos e medicamentos para o composto ondansetrona.

2.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um procedimento de referência para detecção e determinação do limite de impurezas e compostos de degradação relevantes para diferentes fontes do composto ondansetrona e de produtos acabados contendo este IFA;
- Embasar o julgamento da relevância das impurezas e compostos de degradação detectados;
- Comparar os métodos analíticos existentes em monografia e o novo procedimento de referência em relação à eficiência, economia de recursos e diminuição do impacto ao meio ambiente.

3 Materiais

3.1 Compostos envolvidos

Os compostos envolvidos no desenvolvimento deste método foram a ondansetrona (na forma de base e de cloridrato di-hidratado), sete impurezas (A, B, C, D, E, F e G) mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph. Eur., os compostos de degradação gerados pela exposição da ondansetrona às condições de estresse e os excipientes que compõem a fórmula dos produtos acabados envolvidos neste estudo. Não foi possível adquirir a impureza H.

3.2 Matérias-primas e produtos acabados

Neste estudo foram utilizadas amostras da matéria-prima cloridrato de ondansetrona di-hidratado, e os medicamentos nas formas de comprimidos, solução injetável e comprimidos de desintegração oral dos fabricantes mencionados na tabela 8.

Tabela 8. Amostras de matéria-prima e produtos acabados adquiridos para o desenvolvimento do método analítico.

Amostra	Fabricante	Lote	Data de validade
Cloridrato de ondansetrona di-hidratado	Pranami Drugs	OND07	Nov/2015
Comprimidos de Cloridrato de ondansetrona (8 mg de base por comprimido)	GlaxoSmithKline	2H003V	Fev/2016
	Cristália	13053707	Mai/2016
Comprimidos de desintegração oral de Cloridrato de ondansetrona (8 mg de base por comprimido)	Biolab	3010224	Jan/2015
Solução injetável de Cloridrato de ondansetrona (2 mg de base/mL)	Nova Farma	1050227	Fev/2015
	Cristália	12107569	Out/2015

3.3 Padrões de referência

As impurezas A, B, C, D, E, F e G estavam disponíveis como padrões de referência e foram adquiridos da USP e *European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care* (EDQM). A impureza H não estava disponível.

Tabela 9. Padrões de referência adquiridos para o desenvolvimento do método analítico.

Padrão de referência	Número de item	Frasco	Lote
USP Ondansetron RS	1478571	300 mg	F0E281
USP Ondansetron Resolution Mixture RS (cloridrato de ondansetrona di-hidratado, impureza A e impureza B)	1478630	50 mg	G0K261
USP Ondansetron Related Compound A RS	1478593	50 mg	H0L452
USP Ondansetron Related Compound C RS	1478618	30 mg	H0K321
USP Ondansetron Related Compound D RS	1478629	30 mg	H0I048
EDQM Ondansetron Hydrochloride Dihydrate CRS	Y0000218	200 mg	4.0 ID 00Q2Q6
EDQM Ondansetron for TLC System Suitability CRS (impurezas A e B)	Y0000196	30 mg	1.2 ID 004FO7
EDQM Ondansetron for LC System Suitability CRS (impurezas C e D)	Y0000197	10 mg	1.3 ID 001WE2
EDQM Ondansetron Impurity A CRS	Y0001345	10 mg	1.0 ID 001FZ2
EDQM Ondansetron Impurity D CRS	Y0000195	10 mg	2.1 ID 004OH9
EDQM Ondansetron Impurity E CRS	Y0001326	10 mg	1.0 ID 007YN4
EDQM Ondansetron Impurity F CRS	Y0001320	10 mg	1.0 ID 007R01
EDQM Ondansetron Impurity G CRS	Y0001346	10 mg)	1.0 ID 008DI1

3.4 Reagentes

Os reagentes que foram utilizados para a composição das fases móveis, dos diluentes e meios para degradação por estresse estão listados na tabela 10. Os solventes orgânicos foram de grau HPLC e todos os reagentes utilizados nas fases móveis são de grau LC-MS. Os

reagentes hidróxido de sódio, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio utilizados nos meios para degradação por estresse foram de grau PA (ACS).

Tabela 10. Solventes e reagentes utilizados no estudo.

Reagente	Marca	Lote	Validade
Acetonitrila	Fluka	SZBC190AV	28/Jun/2014
Metanol	Fluka	SZBC3415V	26/Nov/2014
Acetato de amônio	Fluka	BCBK4766V	02/Jan/2016
Ácido acético	Fluka	BCBH5216V	01/Feb/2015
Ácido fórmico	Fluka	BCBK2498V	01/Mai/2015
Hidróxido de amônio	Fluka	BCBK4853V	03/Jan/2016
Formato de amônio	Fluka	BCBF9317V	23/Mai/2015
Ácido heptafluorobutírico	Fluka	BCBH2192V	21/Dez/2014
Ácido pentafluoropropiônico	Fluka	SHBD1054V	28/Abr/2018
Hidróxido de tetrabutilamônio	Fluka	BCBG3219V	15/Jan/2015
Hidróxido de sódio	Sigma-Aldrich	MKBW4526V	Ago/2017
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich	SHBG8211V	30/Mar/2018
Peróxido de hidrogênio	Merck	K46809910	30/Jun/2020

3.5 Colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas (tabela 11) foram selecionadas com auxílio da ferramenta *Selectivity Chart* (WATERS, 2012), que ilustra em um gráfico as características de hidrofobicidade e seletividade de diversas colunas disponíveis no mercado pelos valores de $\ln k$ para o acenafteno (eixo x) e de $\ln \alpha$ para o par amitriptilina/acenafteno (eixo y) para cada coluna, respectivamente. Todas as colunas são baseadas em suporte de sílica.

Tabela 11. Especificações das colunas cromatográficas utilizadas no estudo.

Marca, modelo e dimensões	Descrição da estrutura da fase estacionária	Apelo de seletividade	Faixas de operação		
			Pressão máxima (psi)	pH	T (°C)
<i>Waters Acquity HSS T3</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	C ₁₈ trifuncional com partículas encapadas (USP L1). Porosidade: 100Å. Área de superfície: 230m ² /g. Densidade do ligante: 1,6 µmoles/m ² .	Compostos polares	15.000	2 a 8	20 a 70
<i>Waters Acquity BEH Shield RP18</i> 100 x 2,1mm, 1,7 µm	C ₁₈ (USP L1), com grupo carbamato na fase ligante. Porosidade: 130Å. Área de superfície: 185m ² /g. Carga de carbono: 17%. Densidade do ligante: 3,2 µmoles/m ² .	Compostos fenólicos	18.000	2 a 11	20 a 90
<i>Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	Di-isopropil fenilsilano (USP L11). Porosidade: 80Å. Área de superfície: 180m ² /g. Carga de carbono: 5,5%	Compostos aromáticos	17.000	1 a 8	20 a 80
<i>Agilent Zorbax RRHD SB-CN</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	Di-isopropil cianopropilsilano (USP L10). Porosidade: 80Å. Área de superfície: 180m ² /g. Carga de carbono: 4%	Interação dipolo, retenção moderada	17.000	1 a 8	20 a 80
<i>Agilent Zorbax RRHD Bonus RP</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	Di-isopropil-C ₁₄ ligado a um grupo amida (USP L60). Porosidade: 80Å. Área de superfície: 180m ² /g. Carga de carbono: 9,5%	Compostos básicos	17.000	2 a 9	20 a 60
<i>Agilent Zorbax Eclipse Plus C8</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	Dimetil-n-octilsilano (USP L7). Dimensões: 100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm. Porosidade: 95Å. Área de superfície: 160m ² /g. Carga de carbono: 7%	Pequenas moléculas, ampla aplicação	20.000	2 a 9	20 a 60
<i>Agilent Zorbax Eclipse Plus C18</i> 100 x 2,1mm, 1,8 µm	Dimetil-n-octadecilsilano (USP L1). Dimensões: 100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm. Porosidade: 95Å. Área de superfície: 160m ² /g. Carga de carbono: 9%	Pequenas moléculas, ampla aplicação	20.000	2 a 9	20 a 60
<i>Waters Acquity BEH Amide</i> 100 x 2,1mm, 1,7 µm	Grupo amida (USP L60). Porosidade: 130Å. Área de superfície: 185m ² /g. Carga de carbono: 12%	Compostos polares	18.000	2 a 11	20 a 90

3.6 Equipamentos

Os instrumentos principais utilizados neste estudo foram o cromatógrafo líquido de ultraeficiência e o espectrômetro de massa de alta resolução. Suas especificações e configurações estão descritas nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Especificações e configurações do cromatógrafo líquido de ultraeficiência.

Marca	Waters Corporation
Modelo	Acquity UPLC H-Class
Gerenciador de solventes	Bomba quaternária com sete canais independentes
Pressão máxima	15.000 psi
Compartimento de colunas	4 colunas, compartimentos independentes com controle de temperatura individual
Faixa de temperatura dos fornos	20° a 90°C
Detector	PDA UPLC Acquity de 190 nm a 500 nm, até 2,0 AU
Software de operação	Empower 2

Figura 6. CLUE Waters Acquity H-Class.

Tabela 13. Especificações e configurações do espectrômetro de massas de alta resolução.

Marca	Agilent
Modelo	6530 Accurate-Mass QTOF LC/MS
Fonte de ionização	ESI Jet Stream
Taxa de aquisição	40 espectros por segundo
Faixa de m/z	Até 20.000
Cromatógrafo líquido	Agilent 1290 Infinity II UHPLC
Gerenciador de solventes	Bomba quaternária com quatro canais independentes

Figura 7. Agilent 1290 Infinity II UHPLC acoplado ao 6530 Accurate-Mass QTOF LC/MS.

Foram utilizados outros equipamentos para pesagem das amostras, purificação de água, solubilização das amostras, exposição das amostras à luz ultravioleta, à luz visível, ao calor e para medição de pH (tabela 14). Todos os equipamentos estavam calibrados no momento do uso, de acordo com os procedimentos internos, de boas práticas de laboratório e da ISO 17025.

Tabela 14. Outros equipamentos utilizados no estudo.

Equipamento	Marca / modelo	Identificação interna
Banho de ultrassom	Visomes	ULBT-0002
Estufa de secagem	Visomes	OVEN-0001
Câmara de fotoestabilidade	Mecalor / EC	CHMB-0001
Sistema de purificação de água	Millipore / Milli-Q	MIQW-0004
Microbalança	Mettler Toledo / MX5	BALA-0004
Balança analítica	Mettler Toledo / XS205 Dual Range	BALA-0001
Balança de precisão	Mettler Toledo / PB3002-L	BALA-0006
Medidor de pH	Mettler Toledo / S220	PHMT-0001

4 Métodos

O fluxograma para o desenvolvimento do método analítico está ilustrado na figura 8. As etapas em azul foram aquelas relacionadas aos conceitos de aQbD, enquanto que as etapas em preto foram aquelas relacionadas à execução em bancada. O processo decisório (em vermelho) relaciona-se ao cumprimento dos atributos críticos da qualidade. A ordem estabelecida para as etapas foi resultado da adaptação dos conceitos de aQbD (importantes para o planejamento dos objetivos, da estrutura do método analítico e os critérios de aceitação), o delineamento experimental (para explorar os efeitos dos fatores principais do método em primeiro lugar, resultando em economia de tempo e recursos) e o desenvolvimento analítico tradicional (pela observação dos cromatogramas resultantes, uso da EM para monitoramento dos compostos relevantes dos estudos de estresse e validação do método) para a aplicação coerente de cada um destes processos.

Figura 8. Fluxograma utilizado para o desenvolvimento do método analítico neste estudo.

4.1 O perfil desejado para o método analítico

O perfil desejado para o método analítico desenvolvido foi composto por três características principais: o cumprimento de requerimentos de desempenho, o uso de tecnologias modernas e a economia de tempo e recursos para o usuário do método final.

Desta forma, o planejamento do processo de desenvolvimento analítico foi feito de forma a obter um método de separação com as seguintes características:

- Capacidade de separação entre os picos relativos à ondansetrona, suas impurezas compendiais, produtos de degradação resultantes da exposição da ondansetrona às condições de estresse e excipientes que compõem a fórmula dos produtos acabados envolvidos neste estudo;
- Cumprimento de todos os requerimentos de desempenho relacionados a especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e robustez descritos pela legislação vigente e pelos compêndios farmacopéicos USP-NF e Ph. Eur.;
- Adoção de tecnologia moderna, através do uso da CLUE com detecção por UV-DAD e espectrometria de massas de alta resolução com ESI e quadrupolo tempo de voo (QTOF), trazendo flexibilidade para identificação de compostos não conhecidos a aplicações futuras do método para outros produtos acabados;
- Economia de tempo e recursos na rotina de controle de qualidade dos laboratórios analíticos em comparação aos métodos compendiais da USP-NF e Ph. Eur.

4.2 Características dos compostos conhecidos

As informações relativas à ondansetrona e suas impurezas compendiais para o balizamento das condições iniciais para o desenvolvimento do método cromatográfico e os valores de massa molecular média e monoisotópica que nortearam os parâmetros para identificação e monitoramento dos compostos por EM estão descritas a seguir (figuras 9 a 17).

Figura 9. Informações e características do composto ondansetrona: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	99614-02-5
Nome químico	1,2,3,9-Tetrahydro-9-methyl-3-[(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)methyl]-4H-carbazol-4-one
Fórmula molecular	$C_{18}H_{19}N_3O$
Massa molecular média	293,3630 u
Massa molecular monoisotópica	293,1528 u
Composição elementar	C=73,70%, H=6,53%, N=14,32%, O=5,45%
pK_a	7,34

Figura 10. Informações e características do composto Impureza A: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	119812-29-2
Nome químico	4H-Carbazol-4-one, 3-[(dimethylamino)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-9-methyl-
Fórmula molecular	$C_{16}H_{20}N_2O$
Massa molecular média	256,3490 u
Massa molecular monoisotópica	256,1576 u
Composição elementar	C=74,97%, H=7,86%, N=10,93%, O=6,24%
pK_a	8,51

Figura 11. Informações e características do composto Impureza B: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	1076198-52-1
Nome químico	(3R,3'R)-6,6'-Methylenebis{9-methyl-3-[(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-one}
Fórmula molecular	C ₃₇ H ₃₈ N ₆ O ₂
Massa molecular média	598,7510 u
Massa molecular monoisotópica	598,3056 u
Composição elementar	C=74,22%, H=6,40%, N=14,04%, O=5,34%
pK_a	7,65

Figura 12. Informações e características do composto Impureza C. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	27387-31-1
Nome químico	4H-Carbazol-4-one, 1,2,3,9-tetrahydro-9-methyl-
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₃ NO
Massa molecular média	199,2530 u
Massa molecular monoisotópica	199,0997 u
Composição elementar	C=78,36%, H=6,58%, N=7,03%, O=8,03%
pK_a	O composto não possui átomos ionizáveis.

Figura 13. Informações e características do composto Impureza D. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	99614-64-9
Nome químico	9-methyl-3-methylidene-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-4-one
Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₃ NO
Massa molecular média	211,264 u
Massa molecular monoisotópica	211,0997 u
Composição elementar	C=79,59%, H=6,2%, N=6,63%, O=7,57%
pK_a	O composto não possui átomos ionizáveis.

Figura 14. Informações e características do composto Impureza E: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	288-32-4
Nome químico	1H-imidazole
Fórmula molecular	C ₃ H ₄ N ₂
Massa molecular média	68,079 u
Massa molecular monoisotópica	68,0374 u
Composição elementar	C=52,93%, H=5,92%, N=41,15%
pK _a	6,97 e 13,40

Figura 15. Informações e características do composto Impureza F: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	693-98-1
Nome químico	2-methyl-1H-imidazole
Fórmula molecular	C ₄ H ₆ N ₂
Massa molecular média	82,106 u
Massa molecular monoisotópica	82,0531 u
Composição elementar	C=58,51%, H=7,37%, N=34,12%
pK_a	7,52 e 13,92

Figura 16. Informações e características do composto Impureza G: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Puchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	99614-03-6
Nome químico	(3R)-3-(1H-Imidazol-1-ylmethyl)-9-methyl-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-one
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O
Massa molecular média	279,3430 u
Massa molecular monoisotópica	279,1372 u
Composição elementar	C=73,10, H=6,13N=15,04, O=5,73
pK_a	6,78

Figura 17. Informações e características do composto Impureza H: distribuição das espécies ionizadas em função do pH, estruturas moleculares de cada espécie e a curva de log D em função do pH. Fonte: American Chemical Society, Pubchem e ChemAxon Ltd (2017).

Número CAS	99614-14-9
Nome químico	(3R)-3-[(2-Methyl-1H-imidazol-1-yl)methyl]-1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-one
Fórmula molecular	$C_{17}H_{17}N_3O$
Massa molecular média	279,3430 u
Massa molecular monoisotópica	279,1372 u
Composição elementar	C=73,10, H=6,13N=15,04, O=5,73
pK_a	7,34 e 12,94

Foi possível concluir que somente as impurezas C e D possuem caráter neutro, enquanto que todos os demais compostos têm prevalência na forma protonada em pH menores que 5 e na forma neutra em pH acima de 9. Considerando os limites de pH para operação indicados pelos fabricantes das colunas disponíveis para a execução deste estudo, a faixa de pH para operação é restrita entre 2 e 8 para as fases móveis aquosas. Uma vez que a prevalência de uma espécie de cada composto é importante para garantir a consistência da interação entre os compostos e as fases estacionárias, evitar problemas com simetria dos picos e perda de resolução frente a pequenas variações de pH (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), foi definida a faixa de pH entre 2 e 6 para as fases móveis aquosas utilizadas no estudo. Porém, nesta faixa de pH todos os compostos envolvidos são mais hidrofílicos, o que pode diminuir a interação com algumas das fases estacionárias (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Os valores de log D (tabela 15) mostram que este aspecto foi mais crítico para as impurezas A, E e F.

Tabela 15. Valores de log D e espécie predominante para os compostos conhecidos nos pH 5,0 e 9,0. Fonte: ChemAxon Ltd (2017).

Composto	pH 5,0		pH 9,0	
	log D	Espécie	log D	Espécie
Ondansetrona	1,30	$[M + H]^+$	2,34	Neutro
Impureza A	-0,87	$[M + H]^+$	2,22	$[M + H]^+$ (25%)
Impureza B	2,71	$[M + 2H]^{2+}$	4,80	Neutro
Impureza C	2,37	Neutro	2,37	Neutro
Impureza D	2,82	Neutro	2,82	Neutro
Impureza E	-0,72	$[M + H]^+$	-0,15	Neutro
Impureza F	-1,08	$[M + H]^+$	-0,04	Neutro
Impureza G	1,66	$[M + H]^+$	2,22	Neutro
Impureza H	1,07	$[M + H]^+$	2,12	Neutro

Por outro lado, o uso desta faixa de pH auxiliou a promoção de respostas adequadas por EM, já que os compostos encontravam-se protonados no processo de separação cromatográfica. Esta condição também auxiliou a detecção de possíveis compostos de degradação e impurezas que possuíam grupos funcionais semelhantes aos dos compostos de origem, facilitando seu monitoramento e proposição de sua fórmula molecular.

4.3 Delineamento experimental

As informações e propriedades dos compostos conhecidos nortearam a definição do espaço inicial de planejamento, envolvendo a exploração dos efeitos e interações entre os parâmetros que mais afetam a separação cromatográfica: as fases estacionárias, o tipo de solvente orgânico, suas proporções inicial e final, o pH das fases móveis aquosas e a inclinação do gradiente linear através da determinação do tempo de sua duração. Os experimentos exploratórios tiveram três objetivos: identificar as variáveis com maior efeito, avaliar quais as melhores combinações de parâmetros para alcançar o propósito do método e determinar qual a faixa de operação das variáveis envolvidas que cumprem os requerimentos estabelecidos, que foram o número de picos obtidos e a resolução entre eles.

O conjunto de instrumentos e o programa disponível nos laboratórios da USP permitiu explorar estes parâmetros de forma conjunta, através de múltiplos experimentos compostos por combinações de colunas, composição e proporções das fases móveis. Estas combinações foram feitas utilizando o software *Fusion AE*[®] (S-Matrix), e as combinações escolhidas para compor as corridas cromatográficas foram selecionadas através do planejamento por modelo robusto. Este modelo baseia-se em algoritmos que resultam em uma lista de combinações dos fatores envolvidos no experimento e então seleciona um número mínimo de combinações a serem executadas, para fornecer informações a respeito do efeito de cada parâmetro e das interações entre os parâmetros e seus efeitos nos requerimentos estabelecidos (S-MATRIX, 2010). Este modelo é adequado para avaliar efeitos complexos envolvendo variáveis

categóricas (como colunas cromatográficas) com mais de dois níveis, misturas de componentes (como as proporções dinâmicas em gradiente de solventes orgânicos e tampões aquosos) e quando existe a possibilidade de efeitos complexos, não lineares entre as variáveis (S-MATRIX, 2010). As variáveis e suas descrições estão na tabela 16.

Tabela 16. Variáveis envolvidas nos experimentos exploratórios e suas descrições.

Variável	Tipo	Descrição
Coluna cromatográfica	Categórica	Oito colunas, divididas em dois grupos de quatro colunas
Solvente orgânico	Categórica	Acetonitrila e metanol
pH da fase móvel (solução aquosa)	Discreta	Ácido fórmico 0,1% pH 2,7 Formato de amônio 10mM pH 4,0 com ácido fórmico Acetato de amônio 10mM pH 6,0 com ácido acético
Tempo de gradiente	Contínua	Mínimo: 6 minutos Máximo: 12 minutos

4.3.1 Colunas cromatográficas

Todas as colunas cromatográficas selecionadas para os experimentos exploratórios estavam de acordo com as características da técnica, da instrumentação, das fases móveis e dos compostos envolvidos: projetadas para operação em CLUE, em meios com pH entre 2 e 8 e com tratamento da fase estacionária (encapamentos duplos ou triplos) para reduzir a interação de compostos básicos e ionizados com os grupos sinalóis do suporte de sílica. As oito colunas selecionadas foram divididas em dois grupos de quatro colunas, sendo o primeiro grupo composto por quatro colunas de seletividades e mecanismos de retenção mais distintos entre si e o segundo grupo por quatro colunas com características mais hidrofóbicas e mecanismos de interação alternativos (L60) às fases estacionárias mais utilizadas na literatura (L1 e L7) para a separação dos compostos envolvidos neste estudo (tabela 17).

Tabela 17. Grupos de colunas cromatográficas e designação USP selecionadas para compor os experimentos exploratórios.

Grupo 1	Grupo 2
Agilent Zorbax RRHD SB-CN (L10)	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8 (L7)
Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl (L11)	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (L1)
Waters Acquity HSS T3 (L1)	Waters Acquity BEH Amide (L60)
Waters Acquity BEH Shield RP18 (L1)	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP (L60)

A fase estacionária da coluna ciano (L10), composta por grupos nitrila ligados ao suporte de sílica, é utilizada em todos os métodos compendiais relacionados à ondansetrona, e por isso será uma das quatro colunas que irão compor o primeiro conjunto exploratório. A coluna *Agilent Zorbax RRHD SB-CN* possui grupos di-isopropil cianopropilsilano ligados ao suporte de sílica ultrapura. Os grupos di-isopropila protegem estericamente o suporte de sílica para reduzir a adsorção de compostos básicos, conferindo estabilidade da fase estacionária mesmo em aplicações com pH ácidos ou presença de pareadores iônicos. O pH ideal de operação desta coluna é em torno de 3 (AGILENT, 2017). A fase estacionária da coluna *Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl* é composta por grupos di-isopropil fenilsilano, o que confere uma proteção estérica dos grupos silanóis livres e diminui a adsorção de compostos básicos. Tem apelo de estabilidade em baixos pH e uso de pareadores iônicos (AGILENT, 2017). A fase estacionária da coluna *Waters Acquity HSS T3* possui grupos ligantes C₁₈ com densidade intermediária (1,6 $\mu\text{moles/m}^2$) e processo de encapsamento que permite maior estabilidade da fase estacionária em baixos pH, com apelo de promover maior retenção dos compostos polares com picos sem cauda, e a coluna *Waters Acquity BEH Shield RP18* possui um grupo carbamato na fase ligante, o que fornece uma seletividade alternativa à fase tradicional C₁₈, especialmente para compostos fenólicos (WATERS, 2017).

As fases estacionárias das colunas *Agilent Zorbax Eclipse Plus C8* e *C18* são

compostas por monocamadas de dimetil-n-octilsilano e dimetil-n-octadecilsilano respectivamente, ligadas a um suporte de sílica ultrapura (tipo B) e partículas duplamente encapadas. São indicadas para a separação de todos os tipos de compostos (ácidos, neutros e básicos), com a vantagem de evitar picos assimétricos para compostos básicos. A coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP* é composta por grupos di-isopropil- C_{14} ligados ao suporte de sílica ultrapura (tipo B) através de um grupo amida, que ajuda a proteger estericamente e reduzir a interação de compostos básicos e muito polares com os grupos silanóis. Apresenta característica mais polar que as fases C_8 , C_{18} e fenila, sendo uma alternativa interessante para a separação por cromatografia de fase reversa de compostos básicos e altamente ionizáveis em faixas de pH baixos. A fase estacionária é ainda triplamente encapada para conferir ampla desativação de sua superfície e simetria apropriada aos picos (AGILENT, 2017). A coluna *Waters Acquity BEH Amide* tem grupo amida triplamente ligado ao suporte da fase estacionária e tem como apelo a separação de compostos bastante polares, como carboidratos, açúcares e outros com os mais diferentes grupos funcionais e pK_a (WATERS, 2017).

As colunas com grupos polares embutidos na fase estacionária são de especial interesse para a separação de compostos básicos pela sua compatibilidade com fases móveis com altas quantidades de fases móveis aquosas, reduzindo as interações com grupos silanóis livres e seletividades alternativas (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Compostos básicos tendem a interagir com os grupos silanóis livres da fase estacionária por ligações de hidrogênio, e as fases estacionárias duplamente encapsuladas (tratadas com trimetilsilano e outros processos tratados com sigilo pelas empresas) reduzem este tipo de interação por diminuir o número de grupos silanóis livres.

4.3.2 Fases móveis

Com relação às fases móveis, os solventes acetonitrila e metanol foram escolhidos por comporem a maioria dos métodos compendiais e os métodos disponíveis na literatura, além

de serem tradicionalmente a primeira escolha para o desenvolvimento de métodos por cromatografia de fase reversa. As soluções tampão foram escolhidas em função de sua volatilidade, faixa de tamponamento e comprimento de onda de corte (UV *cutoff*) abaixo de 210 nm, apropriadas para o uso em espectrometria de massas e baixa interferência na detecção dos compostos de interesse por UV.

4.3.3 Parâmetros fixos

Os valores para os demais parâmetros cromatográficos foram mantidos constantes (tabela 18). A vazão da fase móvel foi fixada em 0,4 mL/min, valor médio para uso em CLUE e espectrometria de massas. A temperatura das colunas foi fixada em 35°C, cumprindo o mínimo de 5°C acima da temperatura ambiente para funcionamento adequado do forno e também para permitir futuros ajustes. O volume de injeção de 1,0 µL foi utilizado em função do volume e capacidade do injetor (0,1 a 10 µL), das dimensões das colunas envolvidas e a projeção de um fator de retenção intermediário (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). A proporção de 5% de solvente orgânico para o início do gradiente foi definido pela recomendação dos fabricantes das colunas cromatográficas para um desempenho e durabilidade ideal das colunas, enquanto que a proporção final de 95% teve como objetivo a eluição de qualquer composto mais hidrofóbico que por ventura ficasse retido em algumas das fases estacionárias. Para assegurar que a execução deste gradiente fosse viável com ambos os solventes orgânicos e com as demais condições do método, garantindo a sequência de experimentos planejada, foram realizados experimentos para verificar a pressão resultante no início e no fim do gradiente. Estas corridas também serviram para explorar o espectro UV de cada um dos compostos através da injeção de soluções de cada um dos compostos na concentração de 0,1 mg/mL em acetonitrila e água purificada (1:1), e assim determinar o comprimento de onda utilizado para monitoramento dos compostos nas corridas exploratórias.

Tabela 18. Parâmetros cromatográficos mantidos constantes nos experimentos exploratórios.

Parâmetro	Valor
Vazão da fase móvel	0,4 mL/min
Temperatura da coluna	35°C
Comprimento de onda	Monitoramento em canal fixo a 220 nm, com registro do espectro por DAD de 190 a 400 nm
Volume de injeção	1,0 µL
Proporção de solvente orgânico	Inicial: 5,0% Final: 95%
Tempo de equilíbrio inicial	4 minutos
Tempo de equilíbrio final	4 minutos

4.3.4 Solução amostra

A amostra utilizada para os experimentos exploratórios foi preparada utilizando-se os padrões de referência *USP Ondansetron Resolution Mixture RS* (que contém uma mistura composta por 99,2% de cloridrato de ondansetrona di-hidratado, 0,4% de impureza A e 0,4% de impureza B), *USP Ondansetron Related Compound A*, *USP Ondansetron Related Compound C*, *USP Ondansetron Related Compound D*, *EDQM Ondansetron Impurity E CRS*, *EDQM Ondansetron Impurity F CRS* e *EDQM Ondansetron Impurity G CRS*. Foram preparadas soluções estoque de cada um destes padrões de referência utilizando acetonitrila e água purificada (1:1) como diluente, e diluídas em uma solução amostra com concentrações finais de ondansetrona a 1 mg/mL, impurezas A, C, D, E, F e G a 0,05 mg/mL e impureza B a 0,004 mg/mL.

4.3.5 Corridas resultantes do planejamento experimental

O uso do modelo robusto para o planejamento experimental exploratório envolvendo

as variáveis descritas resultou em 90 experimentos, sendo 68 experimentos com diferentes combinações de parâmetros, repetição dos 16 pontos centrais e de 6 pontos não centrais (tabelas 19 e 20). Cada injeção foi realizada em duplicata, resultando em 90 injeções no sistema cromatográfico para cada um dos grupos de colunas. Os pontos pertinentes a cada um dos experimentos e os pontos selecionados para repetição estão representados na figura 18.

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados quanto ao número de picos detectados e número de picos com resolução acima de 2,0. Foi realizada a análise estatística do modelo de regressão, dos erros experimentais e dos resíduos obtidos para evidenciar a adequabilidade do modelo de predição dos efeitos de cada variável e das combinações mais adequadas para compor o método analítico. Os efeitos de cada variável e suas interações foram interpretados utilizando os gráficos de superfície de resposta.

Tabela 19. Parâmetros para cada corrida no primeiro conjunto de experimentos exploratórios. (*n) = experimento de repetição ao experimento n. (P) = experimento do ponto central.

Corrida	Solvente orgânico	Solução aquosa	Tempo de gradiente (min)	Coluna cromatográfica
1	Acetonitrila	pH 2,7	7,5	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
2	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Waters Acquity HSS T3
3	Acetonitrila	pH 2,7	6,0	Waters Acquity HSS T3
4	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
5	Acetonitrila	pH 2,7	6,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
6 (*2)	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Waters Acquity HSS T3
7 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
8 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
9 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity HSS T3
10	Acetonitrila	pH 4,0	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
11	Acetonitrila	pH 4,0	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
12 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity HSS T3
13 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
14 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
15 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
16 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
17	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
18	Acetonitrila	pH 6,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
19	Acetonitrila	pH 6,0	7,5	Waters Acquity HSS T3
20	Acetonitrila	pH 6,0	10,5	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
21	Acetonitrila	pH 6,0	12,0	Waters Acquity HSS T3
22	Acetonitrila	pH 6,0	12,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
23	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
24 (*17)	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
25	Metanol	pH 2,7	12,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
26	Metanol	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
27	Metanol	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
28	Metanol	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
29	Metanol	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
30 (*28)	Metanol	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
31	Metanol	pH 2,7	6,0	Waters Acquity HSS T3
32 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
33 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
34 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
35 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
36 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN
37 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity HSS T3
38 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity HSS T3
39 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
40	Metanol	pH 6,0	6,0	Waters Acquity HSS T3
41	Metanol	pH 6,0	12,0	Waters Acquity BEH Shield RP18
42	Metanol	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
43	Metanol	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax RRHD SB-Phenyl
44	Metanol	pH 6,0	7,5	Waters Acquity BEH Shield RP18
45	Metanol	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax RRHD SB-CN

Tabela 20. Parâmetros para cada corrida no segundo conjunto de experimentos exploratórios. (*n) = experimentos de repetição ao experimento n. (P) = experimento do ponto central.

Corrida	Solvente orgânico	Solução aquosa	Tempo de gradiente (min)	Coluna cromatográfica
1	Acetonitrila	pH 2,7	7,5	Waters Acquity BEH Amide
2	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
3	Acetonitrila	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
4	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
5	Acetonitrila	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
6 (*2)	Acetonitrila	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
7 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
8 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Amide
9 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
10	Acetonitrila	pH 4,0	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
11	Acetonitrila	pH 4,0	6,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
12 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
13 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
14 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
15 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Amide
16 (P)	Acetonitrila	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
17	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Waters Acquity BEH Amide
18	Acetonitrila	pH 6,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
19	Acetonitrila	pH 6,0	7,5	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
20	Acetonitrila	pH 6,0	10,5	Waters Acquity BEH Amide
21	Acetonitrila	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
22	Acetonitrila	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
23	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
24 (*17)	Acetonitrila	pH 6,0	6,0	Waters Acquity BEH Amide
25	Metanol	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
26	Metanol	pH 2,7	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
27	Metanol	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
28	Metanol	pH 2,7	12,0	Waters Acquity BEH Amide
29	Metanol	pH 2,7	6,0	Waters Acquity BEH Amide
30 (*28)	Metanol	pH 2,7	12,0	Waters Acquity BEH Amide
31	Metanol	pH 2,7	6,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
32 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
33 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
34 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
35 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Amide
36 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Waters Acquity BEH Amide
37 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
38 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
39 (P)	Metanol	pH 4,0	9,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
40	Metanol	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax RRHD Bonus RP
41	Metanol	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
42	Metanol	pH 6,0	12,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
43	Metanol	pH 6,0	6,0	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18
44	Metanol	pH 6,0	7,5	Agilent Zorbax Eclipse Plus C8
45	Metanol	pH 6,0	12,0	Waters Acquity BEH Amide

Figura 18. Experimentos selecionados (pontos negros) e seus pontos de repetição (pontos dourados) representados separadamente por coluna cromatográfica.

4.3.6 Uso de pareadores iônicos

Em geral, a concentração do tampão utilizado tem pouco efeito nos fatores de retenção de compostos básicos que se encontram ionizados nos métodos de separação envolvendo fase móvel com baixo pH e o uso de colunas modernas com suportes de sílica ultrapura do tipo B e grupos alquilsilano ligados. Porém, o uso de compostos orgânicos mais hidrofóbicos como o ácido trifluoro acético (TFA) e o ácido heptafluorobutírico (HFBA) para compor a solução tampão pode contribuir com o aumento da seletividade do método por sua ação de pareamento iônico (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). A cromatografia de pareamento iônico atualmente pode ser uma alternativa eficiente para explorar a seletividade de um grupo com muitos compostos ionizados. A presença de dois compostos neutros no grupo de compostos deste estudo torna esta alternativa ainda mais interessante.

Para isso, foi utilizada a melhor combinação de coluna cromatográfica e solvente orgânico obtida pelos experimentos exploratórios, substituindo a solução aquosa da fase móvel por soluções de ácido pentafluoropropiônico 5mM/L e ácido heptafluorobutírico 5mM/L, ajustados ao pH que resultou mais adequado nos experimentos exploratórios.

4.4 Estudos de estresse

De acordo com os trabalhos mencionados na literatura (CASTO, 1994; BURM, 1997; STEWART et al., 1998; BOUGOUIN et al., 2001; WANG et al., 2016; FANG et al., 2016), a exposição da ondansetrona a condições de estresse por hidrólise ácida, hidrólise básica, exposição ao estresse oxidativo, luz ultravioleta e aquecimento resulta em decaimento do teor e gera compostos de degradação. Porém, os trabalhos publicados não exploraram a identidade dos compostos gerados.

O objetivo da exposição da ondansetrona às condições de estresse neste estudo foi obter de 20 a 30% de degradação, simulando alterações do princípio ativo e a geração de

compostos de degradação primária que ocorreriam em condições muito mais agressivas que a realidade do ambiente de produção farmacêutica, mas que pudessem desafiar o método analítico proposto e evidenciar sua eficiência de separação. Condições de estresse mais extremas não foram utilizadas por não serem coerentes com a realidade, e a geração de compostos de degradação secundários resultariam em dificuldades desnecessárias no desenvolvimento da separação cromatográfica (ALSANTE et al., 2007; SNODIN; MCCROSSEN, 2012). As degradações geradas pela exposição das formas farmacêuticas não foi realizada, pelo potencial de envolver reações complexas entre os componentes da formulação e o princípio ativo em um meio estressante, o que seria um escopo de estudo de pré-formulação envolvendo informações não disponíveis relacionadas à composição da fórmula de cada produto e especificações de cada componente utilizado. Desta forma, os produtos acabados foram somente analisados em sua condição íntegra como disponível comercialmente.

As condições de estresse utilizadas estão descritas na tabela 21. Para as condições de hidrólise ácida, hidrólise básica, estresse oxidativo, luz ultravioleta, luz visível e banho ultrassônico, foram utilizadas soluções de 1 mg/mL de ondansetrona em acetonitrila e água purificada (1:1). Após o prazo estabelecido, as soluções utilizadas para as hidrólises ácida e básica foram neutralizadas com hidróxido de sódio e ácido clorídrico respectivamente. Todas as soluções foram então injetadas no sistema cromatográfico utilizando-se a melhor combinação obtida para o método analítico. A forma sólida da ondansetrona foi exposta à luz ultravioleta e luz visível utilizando-se placa de Petri e uma fina camada de ondansetrona para assegurar máxima exposição do material em câmara de fotoestabilidade. Esta mesma preparação foi utilizada para a exposição ao aquecimento em estufa a 105°C.

Tabela 21. Agentes de estresse e condições de exposição da ondansetrona.

Agente de estresse	Tempo de exposição	Temperatura
Peróxido de hidrogênio 10% (v/v)	20 horas	50°C
Ácido clorídrico 5 N	48 horas	50°C
Hidróxido de sódio 1 N	48 horas	50°C
Luz ultravioleta (sobre solução)	200W.h/m ²	25°C
Luz ultravioleta (sobre sólido)	200W.h/m ²	25°C
Luz visível (sobre solução)	1,2 milhões de lux hora	25°C
Luz visível (sobre sólido)	1,2 milhões de lux hora	25°C
Aquecimento	48 horas	105°C
Banho ultrassônico (solução)	1 hora	25°C

4.5 Método por espectrometria de massas

Os parâmetros do método por EM foram avaliados e aprimorados para que o instrumento fosse capaz de identificar a presença dos compostos conhecidos nas amostras envolvidas no estudo, principalmente em baixas concentrações - uma vantagem e diferencial da técnica em relação ao detector por ultravioleta. Esta avaliação foi realizada de forma a identificar a espécie formada por cada um dos compostos envolvidos e obter a resposta mais intensa do íon molecular e a manutenção da sua integridade, evitando sua fragmentação e a formação de adutos. Este trabalho foi realizado em duas etapas. Primeiramente, em paralelo à etapa de determinação do comprimento de onda utilizado para monitoramento dos compostos nas corridas exploratórias, através de uma infusão constante de soluções de 0,1 mg/mL de cada um dos compostos no sistema e do ajuste manual dos parâmetros do espectrômetro de massas a partir de um valor recomendado pelo fabricante. Posteriormente foi avaliada a resposta para cada composto aplicando-se a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, para confirmar a adequabilidade dos parâmetros definidos. Como descrito

anteriormente, as características dos compostos e o espaço de planejamento do método encaixam-se nos requisitos de operação em modo positivo. Foi utilizado o modo de calibração constante, em que uma solução do composto hexakis (1H,1H,3H-perfluoropropoxy) phosphazene (CAS 58943-98-9) com m/z de referência 922.009798 é continuamente aplicada na câmara de nebulização. A faixa de aquisição foi fixada em 50 a 1000 m/z , para cobrir a faixa de m/z esperada para os compostos conhecidos e monitorar compostos de degradação com massas moleculares mais baixas e também possíveis dímeros ou trímeros formados. A voltagem do *Octopole RF Peak* foi fixada em 750 V por ser um parâmetro que o fabricante recomenda que não deve ser alterado. Os parâmetros para o método e suas respectivas faixas estudadas estão listados na tabela 22.

Tabela 22. Parâmetros do espectrômetro de massas e suas faixas avaliadas.

Parâmetro	Faixa
Instrumento e fonte de ionização	Agilent LC-MS QTOF 6530, fonte AJS ESI
Faixa de aquisição (m/z)	50 a 1000
Taxa de aquisição (espectro/s)	3,00
Temperatura do gás ($^{\circ}\text{C}$)	200 - 300
Vazão do gás (L/min)	7 - 12
Pressão do nebulizador (psig)	25 – 40
Temperatura do gás de bainha ($^{\circ}\text{C}$)	225 - 350
Vazão do gás de bainha (L/min)	10 - 12
Voltagem do capilar (V)	3000 - 4000
Voltagem do bico (V)	0 - 2000
Voltagem do fragmentor (V)	90 – 170
Skimmer (V)	40 – 70
Octopole RF Peak (V)	750
Polaridade (modo)	Positivo

4.6 Validação do método proposto

O método analítico foi validado seguindo os requerimentos estabelecidos pelo capítulo geral <1225> *Validation of compendial procedures* da USP-NF (tabela 23) para os métodos da Categoria I (teste quantitativo para determinação do principal ingrediente ativo) e da Categoria II – Ensaio Limite (impurezas ou produtos de degradação) e do guia Q2(R1) do ICH. Todos os equipamentos utilizados estavam qualificados e a manutenção realizada de acordo com os procedimentos internos da United States Pharmacopeia Brasil Ltda e foram utilizados os padrões de referência mencionados (tabela 9) para a execução das etapas de validação analítica.

Tabela 23. Etapas da validação analítica para cada aplicação do método desenvolvido, de acordo com o capítulo geral <1225> *Validation of compendial procedures*.

Etapas da validação	Teor de ondansetrona	Limite de impurezas
Exatidão	Sim	Não
Precisão	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim
Limite de detecção	Não	Sim
Limite de quantificação	Não	Não
Linearidade	Sim	Não
Faixa	Sim	Não
Robustez	Sim	Sim

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao seu valor verdadeiro e foi calculada como porcentagem do composto recuperada através de seis determinações para cada uma das cinco concentrações envolvidas na etapa de linearidade. A exatidão para os produtos acabados foi realizada através da contaminação das amostras com uma solução

do padrão de referência.

A precisão é o grau de concordância entre resultados individuais obtidos a partir de uma amostra homogênea, e envolveu três aspectos: a repetibilidade, que é a concordância entre os resultados obtidos pelo mesmo analista utilizando a mesma instrumentação dentro de um espaço curto de tempo; a precisão intermediária, que é a concordância entre resultados intralaboratoriais obtidos em diferentes dias, com analistas diferentes, utilizando equipamentos diferentes; e a reprodutibilidade, que é a concordância entre resultados obtidos em laboratórios diferentes. A precisão foi avaliada para a ondansetrona na concentração de 0,2 mg/mL, correspondente ao ponto central da faixa utilizada para avaliação da linearidade, e o desvio padrão e o desvio padrão relativo para seis determinações foram calculados.

A especificidade é definida como a capacidade do método em determinar o conteúdo dos compostos de interesse na amostra mesmo com a presença de outros compostos que possam estar presentes, como impurezas, produtos de degradação ou componentes do placebo. Foi demonstrada através de cromatogramas representativos e o cálculo da resolução entre os compostos pertinentes.

O limite de detecção é a menor quantidade de substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Sua estimativa foi realizada através da injeção de amostras contendo todos os compostos conhecidos nas concentrações de 0,05% e 0,1%.

A linearidade é a capacidade do método em gerar respostas que são diretamente proporcionais à concentração da substância em análise na amostra, sendo a faixa de linearidade é definida pelo intervalo entre os limites de quantificação superior e inferior em que foi demonstrada a exatidão, precisão e linearidade apropriadas. Foram realizadas seis injeções para cada uma das cinco concentrações (80%, 90%, 100%, 110% e 120%) e foram calculados o desvio padrão, o desvio padrão relativo e a probabilidade.

A robustez é a capacidade do método analítico em não ser afetado mediante variações pequenas em seus parâmetros e fornecer resultados iguais para as amostras analisadas nestas situações, indicando confiabilidade de seu desempenho. Foram realizadas mudanças na vazão, temperatura da coluna e no pH da fase móvel. Por ser um método com eluição por gradiente, a variação nas proporções dos componentes da fase móvel não foi realizada.

A verificação do sistema é uma etapa que deve ser estabelecida para assegurar que tanto a metodologia quanto o equipamento estão funcionando dentro do esperado, antes que as análises das amostras sejam efetuadas. Para o método desenvolvido foi adotado o desvio padrão relativo entre cinco injeções da solução padrão de ondansetrona e a resolução entre a ondansetrona e pico adjacente cuja resolução fosse mais crítica.

Os critérios de aceitação para cada etapa da validação analítica estão listados na tabela 24.

Tabela 24. Preparações envolvidas e os critérios de aceitação para cada etapa da validação analítica.

Etapas	Preparações	Crítérios de aceitação
Especificidade	Solução de ondansetrona a 1 mg/mL e impurezas a 50 µg/mL	Resolução $\geq 1,5$
Precisão I (repetibilidade)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 7 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98 - 102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$
Linearidade	Níveis: 80, 90, 100, 110 e 120% 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98 - 102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$
Exatidão	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98 - 102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$
Precisão II (intermediária)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 7 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98 - 102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$
Precisão III (reprodutibilidade)	Solução amostra 7 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98 - 102% DPR $\leq 1,00\%$ Probabilidade $\geq 0,95$
Estabilidade da solução	Determinação do teor nos pontos 0, 18, 24, 42 e 48 h contra solução recém-preparada	Teor: 99 - 101% O teor não pode variar mais que 1% do teor determinado para a solução recém-preparada.
Robustez	A. Variação da vazão ($\pm 20\%$) B. Temperatura da coluna ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) C. Variação do pH ($\pm 0,1$ unidades) Solução de adequabilidade do sistema e solução amostra.	Todos os critérios de adequabilidade do sistema devem ser atendidos. Teor para 2 injeções: 98-102% DPR para 5 injeções $\leq 1,0\%$ Resolução $\geq 1,5$
Limite de detecção	Solução de ondansetrona a 0,5 mg/mL e impurezas a 0,5 µg/mL	Relação sinal/ruído ≥ 2

5 Resultados e discussão

5.1 Configuração do sistema cromatográfico

Como etapa preliminar à realização dos experimentos cromatográficos exploratórios, foram verificados a pressão resultante no sistema cromatográfico e o tempo de retenção dos compostos conhecidos, utilizando algumas combinações de colunas em um método geral (tabela 25) e injeções de soluções independentes de cada um destes compostos na concentração de 0,05 mg/mL em acetonitrila e água purificada (1:1). Estes testes foram conduzidos com apenas quatro colunas cromatográficas, por possuírem valores complementares de seletividade e hidrofobicidade. Esta etapa foi fundamental para garantir que cada uma das corridas sequenciais nos experimentos exploratórios iniciasse com a coluna cromatográfica em equilíbrio com a combinação programada de fases móveis e que nenhum dos compostos ficasse retido em qualquer uma das colunas em qualquer corrida, interferindo no experimento subsequente. Os resultados estão resumidos na tabela 26.

Tabela 25. Parâmetros do método geral para verificação da pressão resultante no sistema cromatográfico e da eluição dos compostos conhecidos.

Parâmetro	Descrição		
Vazão (mL/min)	0,4		
Temperatura da coluna	30°C		
Deteção	UV, 200 a 700 nm		
Solução aquosa (A)	Ácido fórmico a 0.1% (v/v) pH 2,7		
Solventes orgânicos (B)	Acetonitrila Metanol		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	95	5
	1	95	5
	16	5	95
	21	5	95
	21,01	95	5
	21,1	95	5

Tabela 26. Resultados para a pressão resultante no sistema cromatográfico e tempo de retenção dos compostos menos e mais retidos por coluna cromatográfica e tipo de solvente orgânico utilizado. TR = tempo de retenção.

Coluna cromatográfica	Solvente orgânico	Pressão (psi)		Composto menos retido (TR, min)	Composto mais retido (TR, min)
		Inicial	Final		
Zorbax SB CN	Acetonitrila	7000	3500	Impureza E (0,572)	Impureza D (7,147)
	Metanol	6800	6700	Impureza E (0,576)	Impureza D (9,051)
Zorbax SB Phenyl	Acetonitrila	3000	6500	Impureza E (0,602)	Impureza D (8,276)
	Metanol	5400	6500	Impureza E (0,622)	Impureza D (11,106)
Zorbax RRHD Bonus RP	Acetonitrila	6490	3334	Impureza E (0,448)	Impureza C (7,612)
	Metanol	6511	5740	Impureza E (0,454)	Impureza D (10,496)
Zorbax Eclipse Plus C18	Acetonitrila	6076	3080	Impureza E (0,542)	Impureza D (8,566)
	Metanol	6595	5460	Impureza E (0,551)	Impureza D (10,720)

Sendo a pressão limite de uso de determinada pela coluna *Waters Acquity HSS T3* (máximo de 15.000 psi), os resultados mostraram que os extremos das combinações de fases móveis podem ser utilizados sem comprometer o sistema cromatográfico. Para o equilíbrio de coluna após a passagem de novas combinações de fase móvel, foi estabelecido o tempo de 4 minutos, uma vez que o tempo de equilíbrio recomendado para uma nova condição cromatográfica é de no mínimo 10 vezes o volume da coluna cromatográfica (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). Este tempo foi calculado da seguinte forma:

$$T_{eq}(min) = \frac{r^2 \times \pi \times h \times 0,4 \times 10}{0,4} = 3,5 \text{ min}$$

Sendo:

r = raio da coluna, em cm

h = comprimento da coluna, em cm

0,4 = fração do volume livre da coluna

10 = multiplicador mínimo recomendado para obter o equilíbrio na nova condição

0,4 = vazão da fase móvel, em mL/min

Todos os compostos eluíram durante a rampa de gradiente, sendo o maior tempo de retenção registrado para a impureza D na coluna *Zorbax SB Phenyl* (11,1 minutos). A inclinação do gradiente foi estudada de forma a alcançar a proporção final do gradiente entre 6 e 12 minutos.

5.2 Comprimentos de onda para o monitoramento dos compostos conhecidos

Foi possível obter os espectros UV dos compostos conhecidos através das corridas exploratórias preliminares (figuras 19 a 26). Os espectros foram extraídos das corridas executadas com a combinação da coluna *Zorbax Eclipse Plus C18* e acetonitrila. Os comprimentos de onda de maior intensidade de absorção para as impurezas resultaram entre 205 e 215 nm, mas em função do uso do metanol como solvente orgânico nos experimentos exploratórios (cujo *cutoff* é 205 nm), foi definido 220 nm para detecção das impurezas conhecidas. Este comprimento de onda foi a única opção para as impurezas E e F, e para as demais impurezas, mesmo não sendo o de maior absorção, apresentou maior absorção que as demais regiões do espectro. Para a ondansetrona, o comprimento de onda adequado para seu monitoramento e quantificação foi 305 nm.

Figura 19. Espectro UV-visível para a ondansetrona.

Figura 20. Espectro UV-visível para a impureza A.

Figura 21. Espectro UV-visível para a impureza B.

Figura 22. Espectro UV-visível para a impureza C.

Figura 23. Espectro UV-visível para a impureza D.

Figura 24. Espectro UV-visível para a impureza E. **Figura 25.** Espectro UV-visível para a impureza F. **Figura 26.** Espectro UV-visível para a impureza G.

5.3 Análise estatística do modelo de predição adotado

As corridas cromatográficas em replicata programadas pelo sistema, que incluem as combinações de ponto central e outras combinações aleatoriamente escolhidas (tabelas 19 e 20), apresentaram resultados consistentes para o número total de picos e número de picos com resolução maior que 2,0, mostrando que o sistema estava adequadamente equilibrado antes de cada corrida e os resultados para as demais corridas contribuíram para a significância

estatística e para a interpretação dos resultados. Os dados mostraram que os termos do modelo adotado eram independentes e por isso estava adequado para a predição das respostas. A análise estatística da regressão para o total de picos obtidos e para o número de picos com resolução acima de 2,0 na avaliação do primeiro grupo de colunas cromatográficas está apresentada na tabela 27.

Tabela 27. Análise estatística do modelo adotado para a predição dos efeitos das variáveis para o primeiro grupo de colunas cromatográficas. R1 = requerimento 1: número total de picos detectados. R2 = requerimento 2: número de picos com resolução acima de 2,0.

Parâmetro	Resultado		Conclusão
	R1	R2	
% erro	0,00	<0,01	As variáveis experimentais foram as principais responsáveis pelas variações observadas nas respostas
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9294	0,9586	O modelo adotado pode explicar mais de 90% da variabilidade das respostas
R^2 ajustado	0,8833	0,9406	Coefficiente de correlação ajustado para o número de respostas ($n = 44$) para confirmar sua robustez em relação ao número de termos do modelo adotado
F-ratio para a regressão	20,1388	53,3671	A magnitude da diferença entre as variâncias da regressão e dos resíduos mostra que o modelo adotado tem bom poder de predição dos efeitos
p-valor para F-ratio	<0,0001	<0,0001	Conclui-se que F-ratio para a regressão é estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança
F-ratio para falta de ajuste	Nulo	Nulo	A magnitude da diferença entre as variâncias para falta de ajuste e para o erro puro mostra que o modelo adotado é adequado para a predição dos efeitos
Ponto com força injustificada	1 em 44	4 em 44	Somente 5 corridas apresentaram resultados não uniformes à superfície de resposta prevista pelo modelo adotado

As análises dos resíduos também mostraram que o modelo adotado para a predição do número de picos detectados (requerimento R1) para o primeiro grupo de colunas foi adequado. Não foram observados perfis de distribuição dos resíduos que sugerissem a inadequabilidade do modelo adotado para predição dos efeitos das variáveis experimentais (figuras 27 a 30), tendências relacionadas às corridas cromatográficas (figura 31) ou necessidade de transformação do modelo adotado (figura 32).

Figura 27. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R1), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 28. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R1), por cada coluna cromatográfica.

Figura 29. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R1), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 30. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R1), para cada coluna cromatográfica.

Figura 31. Gráfico dos resíduos por cada corrida cromatográfica (requerimento R1).

Figura 32. Gráfico dos resíduos versus a resposta predita pelo modelo adotado (requerimento R1).

As análises dos resíduos também mostram que o modelo adotado para a predição do número de picos com resolução acima de 2,0 (requerimento R2) para o primeiro grupo de colunas foi adequado. Não foram observados perfis de distribuição dos resíduos que sugerissem a inadequabilidade do modelo adotado para predição dos efeitos das variáveis experimentais (figuras 33 a 36), tendências relacionadas às corridas cromatográficas (figura 37) ou necessidade de transformação do modelo adotado (figura 38).

Figura 33. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R2), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 34. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R2), por cada coluna cromatográfica.

Figura 35. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R2), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 36. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R2), para cada coluna cromatográfica.

Figura 37. Gráfico dos resíduos por cada corrida cromatográfica (requerimento R2).

Figura 38. Gráfico dos resíduos versus a resposta predita pelo modelo adotado (requerimento R2).

A análise estatística da regressão para o total de picos obtidos (requerimento R1) e para o número de picos com resolução acima de 2,0 (requerimento R2) na avaliação do segundo de colunas cromatográficas está apresentada na tabela 28.

Tabela 28. Análise estatística do modelo adotado para a predição dos efeitos das variáveis para o segundo grupo de colunas cromatográficas. R1 = requerimento 1: número total de picos detectados. R2 = requerimento 2: número de picos com resolução acima de 2,0.

Parâmetro	Resultado		Conclusão
	R1	R2	
% erro	<0,01	<0,01	As variáveis experimentais foram as principais responsáveis pelas variações observadas nas respostas
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9489	0,9571	O modelo adotado pode explicar mais de 90% da variabilidade das respostas
R^2 ajustado	0,9251	0,9445	Coeficiente de correlação ajustado para o número de respostas ($n = 44$) para confirmar sua robustez em relação ao número de termos do modelo adotado
F-ratio para a regressão	39,8034	75,8346	A magnitude da diferença entre as variâncias da regressão e dos resíduos mostra que o modelo adotado tem bom poder de predição dos efeitos
p-valor	<0,0001	<0,0001	Conclui-se que F-ratio para a regressão é estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança
F-ratio para falta de ajuste	Nulo	Nulo	A magnitude da diferença entre as variâncias para falta de ajuste e para o erro puro mostra que o modelo adotado é adequado para a predição dos efeitos
Ponto com força injustificada	2 em 44	3 em 44	Somente 5 corridas apresentaram resultados não uniformes à superfície de resposta prevista pelo modelo adotado

As análises dos resíduos mostram que o modelo adotado para a predição do número de picos (requerimento R1) para o segundo grupo de colunas também foi adequado. Não foram observados perfis de distribuição dos resíduos que sugerissem a inadequabilidade do modelo adotado para predição dos efeitos das variáveis experimentais (figuras 39 a 42), tendências relacionadas às corridas cromatográficas (figura 43) ou necessidade de transformação do modelo adotado (figura 44).

Figura 39. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R1), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 40. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R1), por coluna cromatográfica.

Figura 41. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R1), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 42. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R1), por coluna cromatográfica.

Figura 43. Gráfico dos resíduos por cada corrida cromatográfica (requerimento R1).

Figura 44. Gráfico dos resíduos versus a resposta predita pelo modelo adotado (requerimento R1).

As análises dos resíduos mostram que o modelo adotado para a predição do número de picos com resolução acima de 2,0 (requerimento R2) para o segundo grupo de colunas também foi adequado. Não foram observados perfis de distribuição dos resíduos que sugerissem a inadequabilidade do modelo adotado para predição dos efeitos das variáveis experimentais (figuras 45 a 48), tendências relacionadas às corridas cromatográficas (figura 49) ou necessidade de transformação do modelo adotado (figura 50).

Figura 45. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R2), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 46. Gráfico dos resíduos para o efeito do tempo de gradiente (requerimento R2), por coluna cromatográfica.

Figura 47. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R2), pelo uso de acetonitrila ou metanol.

Figura 48. Gráfico dos resíduos para o efeito do pH (requerimento R2), por coluna cromatográfica.

Figura 49. Gráfico dos resíduos por cada corrida cromatográfica (requerimento R2).

Figura 50. Gráfico dos resíduos versus a resposta predita pelo modelo adotado (requerimento R2).

5.4 Resultados dos experimentos exploratórios

Foi selecionada uma combinação de parâmetros de cada grupo de colunas que apresentou os melhores resultados relativos ao número de picos detectados e picos com resolução acima de 2,0 (tabela 29). Estas combinações são predições do programa *Fusion AE* para a obtenção dos melhores resultados para estes dois requerimentos em função do modelo adotado, partindo de uma condição experimental executada.

Tabela 29. Parâmetros para as combinações mais eficientes por grupo de colunas cromatográficas.

Parâmetro	Grupo 1	Grupo 2
Coluna cromatográfica	<i>Waters Acquity HSS T3</i>	<i>Agilent Zorbax RRHD Bonus RP</i>
Solvente orgânico	Acetonitrila	Acetonitrila
Tempo de gradiente	12 minutos	12 minutos
pH da solução aquosa	5,6	2,7
Nº de picos (predição)	9,0	9,0
Nº de picos com resolução maior que 2,0 (predição)	5,7	6,2

Os cromatogramas obtidos nos experimentos exploratórios que mais se aproximam daqueles que seriam obtidos com as combinações selecionadas estão representados nas figuras 51 e 52.

Figura 51. Cromatograma representativo da combinação de parâmetros mais eficiente do grupo 1 (tabela 19, corrida 21).

Figura 52. Cromatograma representativo da combinação de parâmetros mais eficiente do grupo 2 (tabela 20, corrida 2).

Os gráficos de superfície de resposta foram importantes para ilustrar o efeito da variação de cada um dos parâmetros nos requerimentos de número de picos e de número de picos com resolução acima de 2,0. Para a coluna *Waters Acquity HSS T3* (figuras 53 a 56), a diminuição do pH promoveria uma diminuição no número de picos detectados e também afetaria aqueles com resolução acima de 2,0. Para a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP* (figuras 57 a 60), o aumento do pH promoveria uma diminuição no número de picos detectados, porém não afetaria aqueles com resolução acima de 2,0. Entretanto, em função das características dos compostos conhecidos, o valor de pH 5,0 seria o limite superior para manter os compostos na mesma forma iônica, obter simetria de pico e potencial de maior resolução entre os compostos.

Figura 53. Gráfico de superfície de resposta em duas dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos para a coluna *Waters Acquity HSS T3*.

Figura 54. Gráfico de superfície de resposta em três dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos para a coluna *Waters Acquity HSS T3*.

Figura 55. Gráfico de superfície de resposta em duas dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos com resolução acima de 2,0 para a coluna *Waters Acquity HSS T3*.

Figura 56. Gráfico de superfície de resposta em três dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos com resolução acima de 2,0 para a coluna *Waters Acquity HSS T3*.

Figura 57. Gráfico de superfície de resposta em duas dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos para a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*.

Figura 58. Gráfico de superfície de resposta em três dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos para a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*.

Figura 59. Gráfico de superfície de resposta em duas dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos com resolução acima de 2,0 para a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*.

Figura 60. Gráfico de superfície de resposta em três dimensões para os efeitos do tempo de gradiente e pH da solução aquosa (fase móvel) no requerimento de número de picos com resolução acima de 2,0 para a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*.

Os cromatogramas resultantes da combinação *Waters Acquity HSS T3*, acetonitrila e solução aquosa com pH 4,0 e *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*, acetonitrila e solução aquosa com pH 4,0 mostraram perfis similares (figura 61), com a segunda coluna mostrando uma melhor seletividade, ainda que sutil, entre as impurezas E e F. Neste caso, a coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP* apresentou maior potencial para prosseguir com o desenvolvimento do método.

Figura 61. Cromatogramas resultantes das combinações da coluna *Waters Acquity HSS T3*, acetonitrila e pH 4,0 (cromatograma A) e coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP*, acetonitrila e pH 4,0 (cromatograma B).

5.5 Cromatografia por pareamento iônico

Um aspecto importante resultante dos experimentos exploratórios foi a eluição das impurezas E e F próximo ao volume morto em todas as combinações de colunas e fases móveis exploradas. Para promover a retenção destes compostos e aumentar a seletividade do método composto pela combinação da coluna *Agilent Zorbax RRHD Bonus RP* e fase móvel composta por acetonitrila e solução tampão com pH 4,0 foram testados os pareadores iônicos ácido pentafluoropropiônico 5mM/L e ácido heptafluorobutírico 5mM/L ajustados a pH 4,0 com solução de hidróxido de amônio. Este valor de pH foi escolhido em função do pK_a de ambos os compostos, em que se encontram totalmente na forma ionizada (figuras 62 e 63) e também para prolongar a vida útil da coluna cromatográfica, sendo um pH dentro da faixa de operação ideal recomendada pelo fabricante. Para explorar a máxima capacidade das combinações para promover a retenção das impurezas E e F foi utilizado início do gradiente com 100% de solução aquosa. Como verificado nos experimentos exploratórios, o máximo de 80% de acetonitrila foi o suficiente para garantir a eluição de todos os compostos, e este foi a proporção final do gradiente. Esta etapa também incluiu experimentos com faixas de valores para a vazão e temperatura da coluna (tabela 30).

Figura 62. Predominância da espécie do ácido pentafluoropropiônico versus pH.

Figura 63. Predominância da espécie do ácido heptafluorobutírico em versus pH. **Tabela 30.** Parâmetros cromatográficos utilizados para os testes de desenvolvimento do método.

Parâmetro	Valor
Vazão da fase móvel	0,3 – 0,5 mL/min
Temperatura da coluna	30 - 40°C
Coluna cromatográfica	<i>Agilent Zorbax RRHD Bonus RP</i>
Solvente orgânico	Acetonitrila
Comprimento de onda	Monitoramento em canal fixo a 220 nm, com registro do espectro de 190 a 400 nm
Volume de injeção	1,0 µL
Solução tampão	Ácido pentafluoropropiônico 5mM/L pH 4,0 com NH ₄ OH Ácido heptafluorobutírico 5mM/L pH 4,0 com NH ₄ OH
Eluição gradiente: proporção de solvente orgânico e rampas	Inicial: 0% Final: 80% Inclusão de rampas intermediárias e ajustes de acordo com a necessidade das amostras do estudo de estresse e produtos acabados

O método foi sendo aprimorado em paralelo às análises das amostras dos estudos de estresse, dos produtos acabados e da matéria-prima, para acomodar todos os compostos detectados e garantir a resolução entre eles. Este foi um processo dinâmico, em que um novo planejamento experimental nos moldes daquele realizado para a definição da melhor

combinação de coluna cromatográfica, solvente orgânico e pH da solução aquosa para a fase móvel não foi possível ser executado, devido a três aspectos principais: a impossibilidade prática de obter uma única amostra contendo todos os compostos detectados em todas as amostras envolvidas no estudo (amostras com a ondansetrona e as impurezas conhecidas, com os compostos gerados pelos estudos de estresse e compostos desconhecidos nas amostras de matéria-prima e dos produtos acabados) e da execução em paralelo da detecção por espectrometria de massas em um sistema independente, para que a identidade dos compostos detectados e a correlação de sua presença em múltiplas amostras fossem estabelecidas.

Pelo fato do ácido heptafluorobutírico ter características mais hidrofóbicas, a solução tampão com este composto na concentração de 5mM/L em pH 4,0 com NH_4OH apresentou resultados melhores para a retenção das impurezas E e F, assim como uma retenção maior para os demais compostos ionizados. Também foi adicionado ácido heptafluorobutírico na concentração de 1 mM/L na acetonitrila para amenizar o impacto na transição do gradiente e também para que a concentração do pareador iônico fosse diminuindo gradativamente durante a corrida, para promover maior retenção no seu início em função da necessidade de retenção das impurezas E e F, e menor para os demais compostos. Após ajustes na temperatura da coluna e inclusão de rampas intermediárias no gradiente das fases móveis, a resolução entre todos os compostos detectados em todas as amostras envolvidas no estudo foi obtida em um único método analítico.

5.6 Parâmetros relacionados à espectrometria de massas

Em paralelo aos testes com a solução tampão contendo pareador iônico e os ajustes nos demais parâmetros indicados, foram realizados os experimentos para o aprimoramento da detecção por espectrometria de massas para os compostos conhecidos, e uma configuração capaz de detectar todos os compostos foi estabelecida (tabela 31). Este mesmo método foi

utilizado para a determinação dos valores de m/z e propostas de fórmula molecular dos compostos desconhecidos detectados nas amostras de ondansetrona submetidas às condições de estresse nos estudos de degradação forçada.

Tabela 31. Parâmetros estabelecidos para o espectrômetro de massas.

Parâmetro	Faixa
Instrumento e fonte de ionização	Agilent LC-MS QTOF 6530, fonte AJS ESI
Faixa de aquisição (m/z)	50 a 1000
Taxa de aquisição (espectro/s)	3,00
Temperatura do gás ($^{\circ}\text{C}$)	300
Vazão do gás (L/min)	7
Pressão do nebulizador (psig)	40
Temperatura do gás de bainha ($^{\circ}\text{C}$)	325
Vazão do gás de bainha (L/min)	10
Voltagem do capilar (V)	3500
Voltagem do bico (V)	500
Voltagem do fragmentor (V)	90
Skimmer (V)	66
Octopole RF Peak (V)	750
Polaridade (modo)	Positivo

Os valores de m/z obtidos para todos os compostos foram compatíveis com o valor teórico para a identificação dos compostos conhecidos (tabela 32, figuras 64 a 71). Com relação à impureza B, também foi observada a espécie $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$ com valor de $m/z = 300,1632$. Não foram observados adutos de qualquer espécie para os compostos.

Tabela 32. Parâmetros estabelecidos para o espectrômetro de massas. ^a A espécie $[M+2H]^{+2}$ com valor de $m/z = 300,1632$ foi observada.

Composto	Formula molecular	Massa molecular monoisotópica	Espécie e seus valores de m/z	
			$[M+H]^+$ (teórico)	$[M+H]^+$ (observado)
Ondansetrona	$C_{18}H_{19}N_3O$	293,1528	294,1601	294,1617
Impureza A	$C_{16}H_{20}N_2O$	256,1576	257,1649	257,1670
Impureza B	$C_{37}H_{38}N_6O_2$	598,3056	599,3129	599,3162 ^a
Impureza C	$C_{13}H_{13}NO$	199,0997	200,1070	200,1081
Impureza D	$C_{14}H_{13}NO$	211,0997	212,1070	212,1085
Impureza E	$C_3H_4N_2$	68,0374	69,0447	69,0451
Impureza F	$C_4H_6N_2$	82,0531	83,0604	83,0608
Impureza G	$C_{17}H_{17}N_3O$	279,1372	280,1445	280,1473

Figura 64. Espectro de massas para a ondansetrona.

Figura 65. Espectro de massas para a impureza A. **Figura 66.** Espectro de massas para a impureza B.

Figura 67. Espectro de massas para a impureza C. **Figura 68.** Espectro de massas para a impureza D.

Figura 69. Espectro de massas para a impureza E. **Figura 70.** Espectro de massas para a impureza F.

Figura 71. Espectro de massas para a impureza G.

5.7 Estudos de estresse

As condições de degradação que promoveram decaimento na área total do pico principal relativo à ondansetrona e resultaram em compostos adicionais detectados pelo método analítico foram a exposição ao peróxido de hidrogênio, hidrólise ácida, hidrólise básica e a exposição da solução de ondansetrona sob as luzes ultravioleta e visível (tabela 33). Os espectros no ultravioleta e de massas dos compostos detectados nestas amostras foram obtidos para todos os compostos detectados (figuras 72 a 92) e propostas de fórmula molecular foram feitas a partir dos cálculos da projeção da massa exata e da distribuição isotópica.

Tabela 33. Resultados para o estudo de estresse para o princípio ativo ondansetrona.

Agente de estresse	Tempo de exposição	Temperatura	Decaimento do ativo (% área)
Peróxido de hidrogênio 10% (v/v)	20 horas	50°C	15%
Ácido clorídrico 5 N	48 horas	50°C	0,5%
Hidróxido de sódio 1 N	48 horas	50°C	0,5%
Luz ultravioleta (sobre solução)	200W.h/m ²	25°C	10%
Luz ultravioleta (sobre sólido)	200W.h/m ²	25°C	0%
Luz visível (sobre solução)	1,2 milhões de lux hora	25°C	1%
Luz visível (sobre sólido)	1,2 milhões de lux hora	25°C	0%
Aquecimento	48 horas	105°C	0%
Banho ultrassônico (solução)	1 hora	25°C	0%

Figura 72. Cromatograma para a amostra submetida ao estresse oxidativo.

Figura 73. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,362 minutos na amostra submetida ao estresse oxidativo.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅	359.1516	360,1554	-9.64	73,76

Figura 74. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,680 minutos na amostra submetida ao estresse oxidativo.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅	359.1514	360.1554	-9.13	76.09

Figura 75. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,744 minutos na amostra submetida ao estresse oxidativo.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅	359.1514	360.1554	-9.11	76.22

Figura 76. Cromatograma para a amostra submetida à hidrólise ácida.

Figura 77. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 8,122 minutos na amostra submetida à hidrólise ácida.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{32}H_{32}N_4O_2$	504,2551	505,2598	-5,19	86,76

Figura 78. Cromatograma para a amostra submetida à hidrólise alcalina.

Figura 79. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 4,189 minutos na amostra submetida à hidrólise alcalina.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{14}H_{16}N_2O$	228,1282	229,1335	-8,69	84,63

Figura 80. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto com tempo de retenção de 7,992 minutos na amostra submetida à hidrólise alcalina.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{14}H_{13}NO$	211,1002	212,1070	-2,36	97,64

Figura 81. Cromatograma para a solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Figura 82. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,361 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₂₁ N ₃ O ₅	359,1498	360,1554	-4,74	91,73

Figura 83. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 4,334 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂	309,1496	310,1550	-5,98	88,87

Figura 84. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 4,423 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{18}H_{19}N_3O_2$	309,1496	310,1550	-6,54	87,24

Figura 85. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 4,969 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₂	307,1341	308,1394	-6,51	87,15

Figura 86. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 5,151 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂	309,1497	310,1550	-6,33	88,49

Figura 87. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 5,583 minutos na solução amostra submetida à luz ultravioleta.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{18}H_{15}N_3O_2$	305,1186	306,1237	-7,16	85,72

Figura 88. Cromatograma para a solução amostra submetida à luz visível.

Figura 89. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,320 minutos na solução amostra submetida à luz visível.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₁₈ H ₂₃ N ₃ O ₇	393,1558	394,1609	-5,71	87,26

Figura 90. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 3,375 minutos na solução amostra submetida à luz visível.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{18}H_{21}N_3O_5$	359,1500	360,1554	-5,17	88,89

Figura 91. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto com tempo de retenção de 4,580 minutos na solução amostra submetida à luz visível.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{17}H_{17}N_3O$	279,1391	280,1444	-6,81	87,8

Figura 92. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido com tempo de retenção de 8,121 minutos na solução amostra submetida à luz visível.

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₃₂ H ₃₂ N ₄ O ₂	504,2542	505,2598	-3,41	93,79

5.8 Análise da matéria-prima

As amostras para a análise das impurezas e compostos de degradação da ondansetrona na forma de matéria-prima foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em diluente composto por acetonitrila e água purificada (1:1). O cromatograma para a solução da matéria-prima adquirida (figura 93) apresentou um pico adicional relativo a um composto desconhecido (figura 94), que foi adequadamente resolvido dos demais compostos de interesse.

Figura 93. Cromatograma para a solução amostra de ondansetrona (matéria-prima) a 1 mg/mL em diluente.

Figura 94. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto desconhecido (tempo de retenção de 8,126) na amostra de matéria-prima.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{32}H_{32}N_4O_2$	504,2565	505,2598	-7,88	76,12

5.9 Análise dos produtos acabados

Para a preparação das amostras para os produtos acabados na forma de comprimidos e comprimidos de desintegração oral foi necessário adaptar a preparação das amostras, adicionando uma etapa inicial de quebra da matriz utilizando um pequeno volume de água purificada, e posteriormente a solubilização com o diluente composto por acetonitrila e água purificada (1:1). Já o produto ondansetrona injetável, por estar em solução, não apresentou dificuldades para a preparação da solução amostra, utilizando apenas o diluente. A preparação da solução amostra para todos os produtos incluiu a etapa de filtração por membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,2 µm de porosidade em unidade descartável de 13 mm, adequadas para filtração de pequenos volumes. As concentrações finais de ondansetrona foram de 0,2 mg/mL nas soluções amostras para determinação do teor de ondansetrona e de 1 mg/mL nas soluções amostras para determinação do limite das impurezas e compostos de degradação.

Os cromatogramas das amostras de ondansetrona injetável (fabricantes 1 e 2) a 1 mg/mL não apresentaram picos adicionais além do pico principal relativo à ondansetrona. Já o cromatograma da amostra do comprimido de desintegração oral a 1 mg/mL apresentou um pico relativo a um excipiente (figura 95) que foi identificado como o aspartame (figura 96). Este composto foi adequadamente resolvido dos demais compostos de interesse.

Figura 95. Cromatograma da solução amostra de comprimidos de desintegração oral a 1mg/mL.

Figura 96. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o aspartame (tempo de retenção de 3,521) na amostra de comprimidos de desintegração oral.

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{14}H_{18}N_2O_5$	294,1234	295,1288	-6,16	88,92

A amostra de comprimido de ondansetrona (fabricante 1) apresentou dois picos adicionais (figura 97), relativos à impureza B (figura 98) e um composto desconhecido (figura 99). Estes compostos foram adequadamente resolvidos dos demais compostos de interesse. A amostra de comprimido de ondansetrona do fabricante 2 não apresentou picos adicionais.

Figura 97. Cromatograma da solução de comprimidos de ondansetrona (fabricante 1).

Figura 98. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto com tempo de retenção de 6,351 na amostra de comprimidos de ondansetrona (fabricante 1).

Formula proposta	Massa exata	$[M+H]^+$ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
$C_{37}H_{38}N_6O_2$	598,3081	599,3129	-4,18	89,83

Figura 99. Espectro do ultravioleta, espectro de massas e distribuição isotópica para o composto com tempo de retenção de 8,262 na amostra de comprimidos de ondansetrona (fabricante 1).

Formula proposta	Massa exata	[M+H] ⁺ teórico	Erro em relação ao valor teórico (ppm)	Placar geral (%)
C ₃₃ H ₃₂ N ₄ O ₂	516,2558	517,2598	-6,39	81,63

5.10 Solução de impurezas

Os cromatogramas das soluções contendo as impurezas A, B, C, D, E, F e G estão representados na figura 100 e 101.

Figura 100. Cromatograma da solução contendo ondansetrona a 1 mg/mL e as impurezas A, C, D, E, F e G a 1 µg/mL.

Figura 101. Cromatograma da solução contendo ondansetrona a 0,25 mg/mL e as impurezas A e B a 0,3 µg/mL.

5.11 Método final e compostos detectados no estudo

O método final foi definido com os parâmetros indicados na tabela 34, e a preparação das soluções envolvidas estão descritas nas tabelas 35, 36 e 37.

Tabela 34. Método analítico final.

Parâmetro	Descrição																								
Coluna cromatográfica	Agilent Zorbax RRHD Bonus-RP, 10 cm x 2,1 mm																								
Tamanho de partícula	1,8 µm																								
Temperatura da coluna	40°C																								
Detecção	Teor de ondansetrona: UV a 305 nm Limite de impurezas: UV a 220 nm Espectrometria de massas no modo positivo																								
Volume de injeção	1,0 µL																								
Tempo de corrida	14 minutos																								
Vazão da fase móvel	0,4 mL/min																								
Diluyente	Acetonitrila e água purificada (1:1)																								
Solução aquosa da fase móvel (A)	Ácido heptafluorobutírico 5 mM/L pH 4,0 com NH4OH																								
Solvente orgânico (B)	Ácido heptafluorobutírico 1 mM/L em acetonitrila																								
Gradiente	<table><tr><th>Tempo (min)</th><th>% A</th><th>% B</th></tr><tr><td>0,00</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>0,50</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>1,50</td><td>80</td><td>20</td></tr><tr><td>8,00</td><td>60</td><td>40</td></tr><tr><td>9,00</td><td>20</td><td>80</td></tr><tr><td>9,01</td><td>100</td><td>0</td></tr><tr><td>14,00</td><td>100</td><td>0</td></tr></table>	Tempo (min)	% A	% B	0,00	100	0	0,50	100	0	1,50	80	20	8,00	60	40	9,00	20	80	9,01	100	0	14,00	100	0
Tempo (min)	% A	% B																							
0,00	100	0																							
0,50	100	0																							
1,50	80	20																							
8,00	60	40																							
9,00	20	80																							
9,01	100	0																							
14,00	100	0																							

Tabela 35. Descrição dos critérios de verificação do sistema e cálculos.

Parâmetro	Descrição
Verificação do sistema	<p>O desvio padrão entre as áreas de cinco injeções da solução padrão de ondansetrona deve ser menor ou igual a 1,0%</p> <p>A resolução entre a ondansetrona e a impureza G na injeção da solução de verificação do sistema deve ser maior ou igual a 2,0.</p>
Cálculos	<p>Teor de ondansetrona: relação concentração/resposta corrigida adequadamente para o padrão e para a amostra.</p> <p>Limite de impurezas: a área de cada impureza detectada não é maior que a área correspondente ao pico da ondansetrona na solução de sensibilidade.</p>

Tabela 36. Descrição das preparações da solução de verificação do sistema, solução padrão de impurezas e solução de limite de impurezas.

Amostra	Aplicação	Preparação
Solução de verificação do sistema	Todas as aplicações	<p>Solução estoque da impureza G: pesar 5,0 mg da impureza G para um balão volumétrico âmbar de 10mL. Dissolver e completar ao volume com diluente.</p> <p>Solução estoque de ondansetrona: pesar o equivalente a 5,0 mg de ondansetrona em um balão volumétrico de 10 mL. Dissolver e completar ao volume com diluente.</p> <p>Solução final: transferir 0,5 mL de cada solução estoque para um balão volumétrico de 10 mL. Completar ao volume com diluente. Concentração final: 0.025 mg/mL.</p>
Solução padrão de ondansetrona	Teor de ondansetrona	Pesar o equivalente a 25 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 100 mL, dissolver e completar ao volume com o diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
Solução de limite de impurezas	Limite de impurezas	Pesar o equivalente a cerca de 10 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 100 mL, dissolver e completar ao volume com o diluente. Transferir volumetricamente 1 mL desta solução para um balão volumétrico âmbar de 100 mL e completar ao volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.

Tabela 37. Descrição das preparações das soluções para determinação do teor de ondansetrona e limite de impurezas para a matéria-prima e os produtos acabados.

Amostra	Aplicação	Preparação
Matéria-prima	Teor de ondansetrona	Pesar o equivalente a 25 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 100 mL, dissolver e completar ao volume com o diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
	Limite de impurezas	Pesar o equivalente a 25 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 25 mL, dissolver e completar ao volume com o diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
Comprimidos ou comprimidos de desintegração oral	Teor de ondansetrona	Pesar uma quantidade de comprimidos finamente triturados e homogeneizados equivalente a 10 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 50 mL. Adicionar 10 mL de água purificada, submeter a ultrassom por 5 minutos e completar ao volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
	Limite de impurezas	Pesar uma quantidade de comprimidos finamente triturados e homogeneizados equivalente a 10 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 10 mL. Adicionar 5 mL de água purificada, submeter a ultrassom por 5 minutos e completar ao volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
Solução injetável	Teor de ondansetrona	Transferir volumetricamente uma quantidade de solução injetável correspondente a 2 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 10 mL e completar ao volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.
	Limite de impurezas	Transferir volumetricamente uma quantidade de solução injetável correspondente a 5 mg de ondansetrona para um balão volumétrico âmbar de 5 mL e completar ao volume com diluente. Homogeneizar e filtrar em membrana filtrante de PTFE de 0,2 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro.

A tabela 38 lista os compostos detectados em todas as amostras envolvidas neste estudo, seus respectivos tempos de retenção nos cromatogramas e a proposta de fórmula molecular realizada pela análise dos valores de m/z e da distribuição isotópica.

Tabela 38. Compostos detectados nas amostras envolvidas neste estudo.

Composto	Tempo de retenção (min)	Soluções em que foi detectado	Proposta de fórmula molecular
Ondansetrona Impureza E	1,230	Solução de impurezas	$C_3H_4N_2$
Ondansetrona Impureza F	1,745	Solução de impurezas	$C_4H_6N_2$
Desconhecido D1	3,320	Fotólise por luz Vis	$C_{18}H_{23}N_3O_7$
Desconhecido D2	3,362	Oxidação, fotólise UV, fotólise Vis	$C_{18}H_{21}N_3O_5$
Aspartame	3,521	Comprimidos de desintegração oral	$C_{14}H_{18}N_2O_5$
Desconhecido D3	3,680	Oxidação	$C_{18}H_{21}N_3O_5$
Desconhecido D4	3,744	Oxidação	$C_{18}H_{21}N_3O_5$
Desconhecido D5	4,189	Hidrólise alcalina	$C_{14}H_{16}N_2O$
Ondansetrona Impureza A	4,280	Solução de impurezas	$C_{16}H_{20}N_2O$
Desconhecido D6	4,334	Fotólise por luz UV	$C_{18}H_{19}N_3O_2$
Desconhecido D7	4,423	Fotólise por luz UV	$C_{18}H_{19}N_3O_2$
Ondansetrona Impureza G	4,591	Solução de impurezas, fotólise Vis	$C_{17}H_{17}N_3O$
Ondansetrona	4,809	Todas as soluções	$C_{18}H_{19}N_3O$
Desconhecido D8	4,969	Fotólise por luz UV	$C_{18}H_{17}N_3O_2$
Desconhecido D9	5,151	Fotólise por luz UV	$C_{18}H_{19}N_3O_2$
Desconhecido D10	5,583	Fotólise por luz UV	$C_{18}H_{15}N_3O_2$
Ondansetrona Impureza B	6,277	Solução de impurezas, comprimidos	$C_{37}H_{38}N_6O_2$
Ondansetrona Impureza C	6,544	Solução de impurezas	$C_{13}H_{13}NO$
Ondansetrona Impureza D	7,921	Solução de impurezas, hidrólise alcalina	$C_{14}H_{13}NO$
Desconhecido D11	8,122	Hidrólise ácida, termólise, fotólise Vis	$C_{32}H_{32}N_4O_2$
Desconhecido D12	8,262	Comprimidos	$C_{33}H_{32}N_4O_2$

Os cromatogramas representativos do diluente, da solução de verificação do sistema, solução padrão de ondansetrona, solução amostra de ondansetrona (matéria-prima) e solução amostra das formas farmacêuticas para a determinação do teor de ondansetrona estão ilustrados nas figuras 102 a 105.

Figura 102. Cromatograma representativo do diluente.

Figura 103. Cromatograma representativo da solução de adequabilidade do sistema.

Figura 104. Cromatograma representativo da solução padrão de ondansetrona.

Figura 105. Cromatograma representativo da solução amostra de ondansetrona (matéria-prima), comprimidos, comprimidos de desintegração oral e solução injetável.

5.12 Resultados para a validação do método analítico

O método cumpriu todos os requerimentos estabelecidos para todas as aplicações. Os resultados para cada etapa da validação estão apresentados nas tabelas 39 a 42.

Tabela 39. Resultados para a validação do método analítico para a matéria-prima.

Etapas	Preparações	CrITÉRIOS de aceitação	Resultados
Especificidade	Solução de ondansetrona a 1 mg/mL e impurezas a 50 µg/mL	Resolução $\geq 1,5$ entre as impurezas	A menor resolução foi entre os picos da ondansetrona e impureza G: 5,2
Precisão I (repetibilidade)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,81% 0,19% 1,00
Linearidade	Níveis: 80, 90, 100, 110 e 120% 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	$99,90\% \leq R \leq 100,17\%$ $0,21\% \leq DPR \leq 0,52\%$ $0,98 \leq P \leq 1,00\%$
Exatidão	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,38% 0,30% 1,00
Precisão II (intermediária)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,37% 0,33% 1,00
Precisão III (reprodutibilidade)	Solução amostra 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,00\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,94% 0,15% 1,00
Estabilidade da Solução	Determinação do teor nos pontos 0, 18, 24, 42 e 48 h contra solução recém-preparada	Teor: 99 - 101% O teor não pode variar mais que 1% do teor determinado para a solução recém-preparada.	$99,80\% \leq T \leq 100,08\%$ $-0,06\% \leq T_R \leq 0,22\%$
Robustez	Variação da vazão ($\pm 20\%$), temperatura da coluna ($\pm 5^\circ\text{C}$), pH ($\pm 0,1$ unidades)	Teor para 2 injeções: 98-102% DPR para 5 injeções $\leq 1,0\%$ Resolução $\geq 1,5$	$99,31\% \leq T \leq 100,16\%$ $0,04\% \leq DPR \leq 0,17\%$ $4,8 \leq \text{Res} \leq 5,0$
Limite de detecção	Solução de ondansetrona a 0,5 mg/mL e impurezas a 0,5 µg/mL	Relação sinal/ruído ≥ 2	$4,21 \leq S/N \leq 27,51$

Tabela 40. Resultados para a validação do método analítico para os comprimidos de ondansetrona.

Etapas	Preparações	Crítérios de aceitação	Resultados
Precisão I (repetibilidade)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,13% 0,50% 0,99
Exatidão	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,81% 0,35% 0,99
Precisão II (intermediária)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,10% 0,36% 1,00
Precisão III (reprodutibilidade)	Solução amostra 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,00\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,42% 0,52% 0,98
Estabilidade da Solução	Determinação do teor nos pontos 0, 18, 24, 42 e 48 h contra solução recém-preparada	Teor: 99 - 101% O teor não pode variar mais que 1% do teor determinado para a solução recém-preparada.	$99,80\% \leq T \leq 100,61\%$ $-0,19\% \leq T_R \leq 0,62\%$

Tabela 41. Resultados para a validação do método analítico para os comprimidos de desintegração oral de ondansetrona.

Etapas	Preparações	Crítérios de aceitação	Resultados
Precisão I (repetibilidade)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,01% 0,47% 0,99
Exatidão	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,59% 0,36% 0,99
Precisão II (intermediária)	Onsansetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,21% 0,53% 0,98
Precisão III (reprodutibilidade)	Solução amostra 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,00\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,79% 0,43% 0,99
Estabilidade da Solução	Determinação do teor nos pontos 0, 18, 24, 42 e 48 h contra solução recém-preparada	Teor: 99 - 101% O teor não pode variar mais que 1% do teor determinado para a solução recém-preparada.	$99,99\% \leq T \leq 100,71\%$ $-0,34\% \leq T_R \leq 0,38\%$

Tabela 42. Resultados para a validação do método analítico para a solução injetável de ondansetrona.

Etapas	Preparações	Crítérios de aceitação	Resultados
Precisão I (repetibilidade)	Onsasetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	100,25% 0,49% 0,99
Exatidão	Onsasetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações para cada nível, 2 injeções de cada preparação	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,36% 0,45% 0,98
Precisão II (intermediária)	Onsasetrona a 0,2 mg/mL 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,0\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,96% 0,43% 0,99
Precisão III (reprodutibilidade)	Solução amostra 6 preparações, 2 injeções de cada	Recuperação média: 98-102% DPR $\leq 1,00\%$ Probabilidade $\geq 0,95$	99,93% 0,19% 1,00
Estabilidade da Solução	Determinação do teor nos pontos 0, 18, 24, 42 e 48 h contra solução recém-preparada	Teor: 99 - 101% O teor não pode variar mais que 1% do teor determinado para a solução recém-preparada.	$98,68\% \leq T \leq 99,56\%$ $0,21 \leq T_R \leq 0,89\%$

6 Conclusão

Um método analítico para determinação do teor de ondansetrona e limite de suas impurezas compendiais foi desenvolvido, com capacidade de separação também entre os principais compostos de degradação gerados pela exposição do IFA às condições de estresse recomendadas pelos guias globais. A aplicação dos conceitos de aQbD no processo de desenvolvimento do método permitiu fundamentar a seleção da combinação mais eficiente dos parâmetros que mais afetam a separação cromatográfica, que são a fase estacionária, o solvente orgânico e a faixa de pH da solução aquosa da fase móvel, conferindo à fase de aprimoramento do método a flexibilidade necessária para acomodar a detecção de impurezas e compostos de degradação originados das diversas amostras de matéria-prima, das formas farmacêuticas e das amostras submetidas às condições de estresse. Outras estratégias de planejamento experimental poderiam ser utilizadas para fundamentar a etapa de aprimoramento do método, na escolha do tipo de pareador iônico, da sua concentração nas fases móveis e na identificação dos efeitos dos demais parâmetros cromatográficos, como a vazão da fase móvel e da temperatura da coluna. Nesta etapa, o planejamento experimental também pode fornecer dados sobre a robustez do método analítico, de forma elegante e fundamentada cientificamente, direcionando seu aprimoramento e ajudando a prever seus pontos críticos no uso em rotina. Mesmo o uso da abordagem tradicional de tentativas lógicas ter funcionado a contento resultando em um método analítico adequado, recomenda-se o uso pleno dos conceitos de aQbD em trabalhos futuros para obter o máximo de solidez e eficiência no processo de desenvolvimento analítico, demonstrando a robustez dos novos métodos através do MODR e aprimorando-os esteticamente.

Em comparação com os métodos compendiais, o método desenvolvido tem potencial de economia relevante de tempo e recursos na rotina laboratorial. Uma estimativa do tempo despendido e volume de solventes gastos em um hipotético cenário de uma indústria

farmacêutica que analise a matéria-prima ondansetrona e apenas uma das três formas farmacêuticas em que o método pode ser aplicado mostrou que uma considerável economia pode ser gerada em médio prazo (tabela 43). A disponibilidade de uma metodologia única para a análise do teor e impurezas de múltiplas formas da matéria-prima e dos produtos contendo este IFA pode impactar positivamente na economia de outros recursos importantes, como a diminuição do custo homem-hora na configuração de múltiplos métodos e da administração de consumíveis como diferentes colunas e placas de cromatografia em camada delgada.

Tabela 43. Estimativa de recursos gastos para a análise de um lote de matéria-prima ondansetrona e de um lote do produto acabado comprimidos de ondansetrona.

Item	Recursos por método adotado		
	USP-NF	Ph. Eur.	Estudo
HPLC para análise da matéria-prima	2	Único	Único
HPLC para análise dos comprimidos	1	Único	Único
Outro método cromatográfico necessário	Sim, CCD	Sim, CCD	Não
Número de injeções para a adequabilidade de cada sistema	7	2	7
Número de corridas típico por material	10		
Tempo de corrida	20 min	30 min	14 min
Vazão da fase móvel	1,5 mL/min	1,5 mL/min	0,4 mL/min
Volume de fase móvel gasto por corrida	30 mL	45 mL	5,6 mL
Tempo por sistema	6 h	6 h	4 h
Volume de fase móvel por sistema	510 mL	540 mL	95 mL
Tempo acumulado nos sistemas	17 h	6 h	4 h
Volume de fase móvel consumido	1.530 mL	540 mL	95 mL

Um impacto importante é a diminuição do consumo da fase móvel. A adoção de um método como o desenvolvido neste estudo consome cerca de 5 a 15 vezes menos solventes e reagentes para a execução de um ciclo de análise e aprovação de apenas um lote da matéria-prima ondansetrona e um lote do medicamento comprimidos de ondansetrona. Em longo prazo, isto resultaria em uma considerável economia de tempo de manejo dos resíduos de análise, menor gasto com a compra de solventes e reagentes e na diminuição do impacto ao meio ambiente. Desta forma, a modernização dos métodos cromatográficos representa uma vantagem em diversos aspectos.

Outro aspecto interessante é a estereoquímica da ondansetrona. As monografias da USP-NF e Ph. Eur. relacionadas à ondansetrona e os medicamentos que a contém não possuem métodos que diferenciem os enantiômeros puros de sua mistura racêmica. Porém, pesquisas sugeriram que o uso do enantiômero *R* puro pode ser utilizado com segurança como antiemético com somente metade da dose da mistura racêmica (SHINDE et al., 2005; GARUD et al., 2006) e também auxiliar no tratamento de diversos outros quadros clínicos sem seus efeitos colaterais, como dores de cabeça e constipação, entre outros (YOUNG, 1995). Alguns métodos utilizando CLAE quiral (KELLY; HE; STEWART, 1993; LIU; STEWART, 1997; KANNAPPAN; KANTHIAH, 1997), CLAE quiral acoplada a espectrometria de massas (LIU et al., 2008) e eletroforese capilar modificada com ciclodextrina (SILUVERU; STEWART, 1996) foram publicados para a separação dos enantiômeros da ondansetrona. A necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para determinação da forma enantiomérica da ondansetrona pode ser uma oportunidade para uma discussão posterior.

7 Referências bibliográficas

Aapro MS, Schmoll HJ, Jahn F, Carides AD, Webb RT. Review of the efficacy of aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in a range of tumor types. *Cancer Treatment Reviews*. 2013;39(1):113–7.

Abdel-Hamid ME, Sharma D. Simultaneous Quantification of Doxorubicin, Lorazepam, Metoclopramide, Ondansetron, and Ranitidine in Mixtures by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2004;27(4):641–60.

Abood RMA, Talegaonkar S, Tariq M, Ahmad FJ. Microemulsion as a tool for the transdermal delivery of ondansetron for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;101:143–51.

Agilent | Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics [Internet]. Agilent | Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics. [cited 2017Jul18]. Available from: <http://www.agilent.com/home>

Alsante K, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik T, Kong W, et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(1):29–37.

Altria K, Mclean R. Development and optimisation of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998;18(4-5):807–13.

Alvarez J-C, Charbit B, Grassin-Delyle S, Demolis J-L, Funck-Brentano C, Abe E. Human plasma quantification of droperidol and ondansetron used in preventing postoperative nausea and vomiting with a LC/ESI/MS/MS method. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(2):186–90.

Aramă, C.; Varvara, A.; Monciu, C-M., Development and validation of a new capillary zone electrophoresis method for the assay of ondansetron. *Farmacia*, 2011;Vol. 59, No. 1, 34-43.

Argentine M, Barnett K, Chatfield M, Hewitt E, Jackson P, Karmarkar S, Marolewsky A, Pless A, Rignall A, Semin D, Trone M, Wang Q, Williams Z, Zhao Y. Evaluating progress in analytical quality by design. *Pharmaceutical Technology*, 41(4), 2017.

Azimaraghi O, Aghajani Y, Molaghadimi M, Khosravi M, Eslami K, Ghadimi F, et al. Ondansetron reducing pain on injection of etomidate: a controlled randomized study. *Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)*. 2014;64(3):169–72.

Baertschi S, Alsante K. Stress Testing. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences Pharmaceutical Stress Testing*. 2005:51–140.

Barnes J, Costall B, Coughlan J, Domeney A, Gerrard P, Kelly M, et al. The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1990;35(4):955–62.

Beg S, Jena SS, Patra CN, Rizwan M, Swain S, Sruti J, et al. Development of solid self-nanoemulsifying granules (SSNEGs) of ondansetron hydrochloride with enhanced bioavailability potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;101:414–23.

Blackwell C, Harding S. The clinical pharmacology of ondansetron. *Eur J Cancer Clin Oncol* [Internet]. 1989 [cited 2013 Dec 5];25(Suppl 1:S21-4; discussion S25-7.). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2533895>

Bosch ME, Sánchez AR, Rojas FS, Ojeda CB. Review of analytical methodologies for the determination of 5-HT₃ receptor antagonists. *Microchemical Journal*. 2017;132:341–50.

Bougouin C, Thelcide C, Crespín-Maillard F, Maillard C, Kinowski JM, Favier M. Compatibility of ondansetron hydrochloride and methylprednisolone sodium succinate in multilayer polyolefin containers. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2005;62(19):2001–5.

Bourdon F, Lecoœur M, Duhaut M, Odou P, Vaccher C, Foulon C. A validated micellar electrokinetic chromatography method for the quantitation of dexamethasone, ondansetron and aprepitant, antiemetic drugs, in organogel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;86:40–8.

Burm JP. Stability of ondansetron and fluconazole in 5% dextrose injection and normal saline during Y-site administration. *Archives of Pharmacal Research*. 1997;20(2):171–5.

Casto DT. Stability of Ondansetron Stored in Polypropylene Syringes. *Annals of Pharmacotherapy*. 1994;28(6):712–4.

Chesnut SM, Salisbury JJ. The role of UHPLC in pharmaceutical development. *Journal of Separation Science*. 2007;30(8):1183–90.

Coates IH, Bell JA, Humber DC, Ewan GB. 1,2,3,9-tetrahydro-3-imidazol-1-ylmethyl-4H-carbazol-4-ones, composition containing them, and method of using them to treat neuronal 5HT function disturbances. United States patent US 4695578 A. 1987 Sep 22.

- Dotsikas Y, Kousoulos C, Tsatsou G, Loukas YL. Development and validation of a rapid 96-well format based liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis method for ondansetron in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2006;836(1-2):79–82.
- EP. Ondansetron hydrochloride dihydrate. *European Pharmacopoeia*. 07/2011:20 ed. 2013. p. 4348–50.
- Fang B-X, Li P, Shi X-Y, Chen F-C, Wang L-H. Incompatibilities of lornoxicam with 4 antiemetic medications in polyolefin bags during simulated intravenous administration. *Medicine*. 2016;95(25).
- Farhat K, Ismail M, Ali S, Pasha AK. Resistance to ondansetron: Role of pharmacogenetics in post-operative nausea and vomiting. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013;14(4):331–6.
- Fekete S, Schappler J, Veuthey J-L, Guillarme D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014;63:2–13.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*. 1990;9(1):37–70.
- Filho JCAMCCAA, Baltieri DA. A pilot study of full-dose ondansetron to treat heavy-drinking men withdrawing from alcohol in Brazil. *Addictive Behaviors*. 2013;38(4):2044–51.
- Foti C, Alsante K, Cheng G, Zelesky T, Zell M. Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;49:89–99.
- Freedman SB, Uleryk E, Rumantir M, Finkelstein Y. Ondansetron and the Risk of Cardiac Arrhythmias: A Systematic Review and Postmarketing Analysis. *Annals of Emergency Medicine*. 2014;64(1).
- Fusion AE Automated Experimentation Software – Overview and Introduction. S-Matrix Corporation. 2010.
- Garud KL, Godbole S, Mankar S, Pathak S. Efficacy and safety of R(+) Ondansetron solution in the treatment of nausea and vomiting in children: Results of an open-label, non-comparative, prospective clinical study. *Indian Med Gazette*. 2006;140:112–4.
- Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(25):3929–37.

Habib AS, Gan TJ. Evidence-based management of postoperative nausea and vomiting: a review. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*. 2004;51(4):326–41.

Haidong Wang. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Disponível em: <http://thelancet.com/gbd/2015>.

Holčapek M, Jirásko R, Líba M. Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A*. 2012;1259:3–15.

Hu L, Damaj BB, Martin R, Michniak-Kohn BB. Enhanced in vitro transbuccal drug delivery of ondansetron HCl. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;404(1-2):66–74.

Ibrahim M, Eldesuky HI, Ibrahim TH. Oral olanzapine versus oral ondansetron for prevention of post-operative nausea and vomiting. A randomized, controlled study. *Egyptian Journal of Anaesthesia*. 2013;29(2):89–95.

ICH Expert Working Group. Stability Testing of New Drug Substances and products – Q1A(R2). 2003 Feb 6. Disponível em:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf

ICH Expert Working Group. Impurities in New Drug Substances Q3A(R2). 2006. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf

ICH Expert Working Group. Impurities in New Drug Products Q3B(R2). 2006. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf

ICH Expert Working Group. Pharmaceutical Development Q8(R2). ICH Harmon Tripart Guidel. 2009;8(August):1–28. Disponível em:
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf

Johnson BA, Roache JD, Javors MA, Diclemente CC, Cloninger CR, Prihoda TJ, et al. Ondansetron for Reduction of Drinking Among Biologically Predisposed Alcoholic Patients. *Jama*. 2000;284(8):963.

Kannappan V, Kanthiah S. Enantiopurity Assessment of Chiral Switch of Ondansetron by Direct Chiral HPLC. *Chromatographia*. 2017Apr;80(2):229–36.

Kelly JW, He L, Stewart JT. High-performance liquid chromatographic separation of ondansetron enantiomers in serum using a cellulose-derivatized stationary phase and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1993;622(2):291–5.

Koufopantelis P, Georgakakou S, Kazanis M, Giaginis C, Margeli A, Papargiri S, et al. Direct injection liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometric quantification of methotrexate, folinic acid, folic acid and ondansetron in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(30):3850–6.

Liang S, Bian X, Ma J, Arogunjo M, Deorukhkar AA, Krishnan S, et al. Development and validation of a sensitive LC/MS/MS method for the determination of γ -tocotrienol in rat plasma: application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. 2012;27(1):58–66.

Liu J, Stewart JT. High-performance liquid chromatographic analysis of ondansetron enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;694(1):179–84.

Liu K, Dai X, Zhong D, Chen X. Quantitative determination of ondansetron in human plasma by enantioselective liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2008;864(1-2):129–36.

Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*. 2009;32(1):214–22.

Moreira RF, Salvadori MC, Azevedo CP, Oliveira-Silva D, Borges DC, Moreno RA, et al. Development and validation of a rapid and sensitive LC-ESI-MS/MS method for ondansetron quantification in human plasma and its application in comparative bioavailability study. *Biomedical Chromatography*. 2010;24(11):1220–7.

Morrow GR, Hickok JT, Rosenthal SN. Progress in reducing nausea and emesis. Comparisons of ondansetron (zofran), granisetron (kytril), and tropisetron (navoban). *Cancer*. 1995;76(3):343–57.

Mujtaba A, Kohli K, Ali J, Baboota S. Development of HPTLC method for the estimation of ondansetron hydrochloride in bulk drug and sublingual tablets. *Drug Testing and Analysis*. 2011;5(2):122–5.

Musshoff F, Madea B, Stuber F, Stamer UM. Enantioselective Determination of Ondansetron and 8-Hydroxyondansetron in Human Plasma from Recovered Surgery Patients by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2010;34(9):581–6.

Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Hoboken: Wiley; 2016.

Naghavi, M. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;385(9963):117–71.

Ngampramuan S, Baumert M, Czipelova B, Nalivaiko E. Ondansetron prevents changes in respiratory pattern provoked by LiCl: A new approach for studying pro-emetic states in rodents? *Neuroscience*. 2013;246:342–50.

Ninama G, Patel R, Patel M, Shah G. Solid phase extraction liquid chromatography mass spectrometry method with electrospray ionization for the determination of Ondansetron in human plasma: Development and validation consideration. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10.

Obata Y, Ashitaka Y, Kikuchi S, Isowa K, Takayama K. A statistical approach to the development of a transdermal delivery system for ondansetron. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;399(1-2):87–93.

Orlandini S, Pinzauti S, Furlanetto S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012;405(2-3):443–50.

Pasternak BCB, Svanström H, Hviid A. Ondansetron in Pregnancy and Risk of Adverse Fetal Outcomes. *Survey of Anesthesiology*. 2013;57(5):231–2.

Pattnaik S, Swain K, Mallick S, Lin Z. Effect of casting solvent on crystallinity of ondansetron in transdermal films. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;406(1-2):106–10.

Puranik M, Wadher S, Yeole P, Raval P. A validated HPTLC method for determination of ondansetron in combination with omeprazole or rabeprazole in solid dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;70(3):386.

Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM, Hatajik TD, Motto MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharmaceutical Technology*. 2002;02:48–56.

Roila F, Tonato M, Cognetti F, Cortesi E, Favalli G, Marangolo M, et al. Prevention of cisplatin-induced emesis: a double-blind multicenter randomized crossover study comparing ondansetron and ondansetron plus dexamethasone. *J Clin Oncol* [Internet]. 1991 Apr;9(4):675–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1829757>

Rozet E, Lebrun P, Hubert P, Debrus B, Boulanger B. Design Spaces for analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;42:157–67.

Schweitzer M, Pohl M, Hanna-Brown M, Nethercote P, Borman P, Hansen G, et al. Implications and Opportunities of Applying QbD Principles to Analytical Measurements. *Pharmaceutical Technology* 2010. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/implications-and-opportunities-applying-qbd-principles-analytical-measurements-0>.

Shinde J, Mandora VP, Joshi PK, Erram SS. Efficacy and safety of R-Ondansetron 4 mg versus racemic Ondansetron 8 mg: Results of a randomized, double blind, multicentric clinical trial. *Indian Med Gazette*. 2005;139:444–7.

Siluveru M, Stewart JT. Enantioselective determination of S-(+)- and R-(–)-ondansetron in human serum using derivatized cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;691(1):217–22.

Siu SS, Yip S-K, Cheung CW, Lau TK. Treatment of intractable hyperemesis gravidarum by ondansetron. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2002;105(1):73–4.

Smith DB, Newlands ES, Rustin GJ, Begent RH, Howells N, McQuade B, et al. Comparison of ondansetron and ondansetron plus dexamethasone as antiemetic prophylaxis during cisplatin-containing chemotherapy. *Lancet* [Internet]. 1991 Aug 24;338(8765):487–90. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714532>

Sneader W. *Drug discovery: a history*. Chichester: John Wiley & Sons; 2006. Ed. 1. Pg 215–217

Snodin DJ, McCrossen SD. Guidelines and pharmacopoeial standards for pharmaceutical impurities: Overview and critical assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2012;63(2):298–312.

Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. Oxford: Wiley; 2010.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC Method Development. Wiley; 2012.

Souri E, Nourhashemi T, Lahiji F, Kaymanesh P. Validating a Stability Indicating HPLC Method for Kinetic Study of Ondansetron Degradation in Acidic, Basic and Oxidative Conditions. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 2014; 5:51-62.

Stewart, J. T., Warren, F. W., King, D. T., Venkateshwaran, T. G., & Fox, J. L. Stability of ondansetron hydrochloride and 12 medications in plastic syringes. American journal of health-system pharmacy. 1998;55(24):2630-2634.

Sullivan C, Johnson C, Roach H, Martin RW, Stewart DK, Morrison JC. A pilot study of intravenous ondansetron for hyperemesis gravidarum. Am J Obstet Gynecol [Internet]. 1996 May;174(5):1565–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065130>

Tramèr MR, Phillips C, Reynolds DJM, Mcquay HJ, Moore RA. Cost-effectiveness of ondansetron for postoperative nausea and vomiting. Anaesthesia. 1999;54(3):226–34.

Tramèr MR. A rational approach to the control of postoperative nausea and vomiting: evidence from systematic reviews. Part I. Efficacy and harm of antiemetic interventions, and methodological issues. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 2001;45(1):4–13.

Tramèr MR. A rational approach to the control of postoperative nausea and vomiting: evidence from systematic reviews. Part II. Recommendations for prevention and treatment, and research agenda. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 2001;45(1):14–9.

USP. Ondansetron Hydrochloride. United States Pharmacopeia-National Formulary. USP 36. 2013. p. 4583–4.

USP. Ondansetron Hydrochloride. United States Pharmacopeia-National Formulary. USP 39. 2017. Disponível online.

USP. Ondansetron Injectable. United States Pharmacopeia-National Formulary. USP 39. 2017. Disponível online.

USP. Ondansetron Orally Disintegrating Tablets. United States Pharmacopeia-National Formulary. USP 39. 2017. Disponível online.

USP. Ondansetron Tablets. United States Pharmacopeia / National Formulary. USP 39. 2017. Disponível online.

Varvara, A.; Monciu, C-M.; Aramă, C.; Popescu, C., The liquid chromatographic assay of ondansetron hydrochloride and its impurities using a new stationary phase. *Farmacia*, 2008, Vol. LVI, No. 2, 154-165.

Varvara, A.; Monciu, C-M.; Aramă, C.; Popescu, C., Application of a selective bonded phase in the liquid chromatographic assay of ondansetron hydrochloride and its impurities. *Farmacia*, 2009, Vol. 57, No. 5, 570-581.

Vogt FG, Kord AS. Development of Quality-By-Design Analytical Methods. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(3):797–812.

Vrabel M. Is Ondansetron More Effective Than Granisetron for Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting? A Review of Comparative Trials. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2007;11(6):809–13.

Wang H, Dwyer-Lindgren L, Lofgren KT, Rajaratnam JK, Marcus JR, Levin-Rector A, et al. Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2071–94.

Wang L-H, Chen F, Zhu J, Li B, Yuan F. Stability of tramadol with three 5-HT₃ receptor antagonists in polyolefin bags for patient-controlled delivery systems. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;1869.

W. Home : Waters [Internet]. Home : Waters. [cited 2017Jul18]. Available from: <http://waters.com/>

WHO [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; [cited 2017Jul18]. Available from: <http://www.who.int/en/>

WHO Model list of Essential Medicines, 19th edition, April 2015, amended November 2015. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

Xu X, Bartlett MG, Stewart JT. Determination of ondansetron and its hydroxy metabolites in human serum using solid-phase extraction and liquid chromatography/positive ion electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35(11):1329–34.

Young JW. Methods for treating emesis and nausea using optically pure R(+) ondansetron, 1995. Patente.

Žižkovský VCA, Kučera R, Klimeš J. Potential employment of non-silica-based stationary phases in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;44(5):1048–55

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Rafael Finocchiaro Maranhão

Local e data de nascimento: Rio de Janeiro, RJ, em 01 de Setembro de 1976

EDUCAÇÃO

Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado, Campinas, SP, de 1992 a 1995.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, de 1996 a 2000. Graduação em Farmácia-Bioquímica, modalidade Fármacos e Medicamentos.

OCUPAÇÃO

Cientista de Padrões de Referência na United States Pharmacopeial Convention, de 2008 até o presente momento.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS

Maranhão RF, Lourenço TC, Tavares MFM. Development and validation of a stability indicator method for Ondansetron and related pharmaceutical products. Presented at the 21st International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques; PP-A-53; 2014 Oct; Natal, RN, Brazil.

Palestrante no curso “Uso correto da USP-NF e seus padrões de referência”, ministrado no CRQ-SP em 2016.