

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Francielli Gelatti Bortoly Carvalho

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BROMOPRIDA
NA PRESENÇA DE PARABENOS POR CLAE-DAD E ESTUDO
DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE.**

Campo Grande
2022

Francielli Gelatti Bortoly Carvalho

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BROMOPRIDA
NA PRESENÇA DE PARABENOS POR CLAE-DAD E ESTUDO
DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito final para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nájla Mohamad Kassab

Coorientadora: Dr.^a Elaine de Oliveira Araújo

Campo Grande
2022

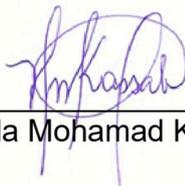
Francielli Gelatti Bortoly Carvalho

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BROMOPRIDA
NA PRESENÇA DE PARABENOS POR CLAE-DAD E ESTUDO
DE COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE.**

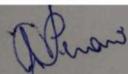
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Farmácia da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul como requisito
final para obtenção do título de Mestre.

CAMPO GRANDE - MS, 03 DE MARÇO DE 2022

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Nájla Mohamad Kassab – Orientador



Prof^a. Dr^a. Andréia Peraro do Nascimento



Prof. Dr. Teófilo Fernando Mazon Cardoso

"Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação."

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Finalizar o mestrado foi uma vitória para mim. Depois de alguns anos de formada voltar a assistir aulas, estudar e escrever esta dissertação me deixou muito realizada e prova que não existem obstáculos quando se tem perseverança, coragem e uma base familiar sólida.

Segue o meu reconhecimento a todos os que participaram desta jornada. Gostaria de agradecer:

Sempre a Deus, pelo dom precioso da vida, por ter permitido que eu passasse por este momento de conquistas e realizações, de desafios e superações, estando sempre ao meu lado me dando sabedoria e força para superar as dificuldades.

A minha família, meu grande amor, Marcus Vinícius, que me incentivou sempre de continuar a estudar e conquistar este título, que sempre esteve ali pronto para me ajudar psicologicamente, ajudar com os filhos e com a casa. Aos meus queridos e amados filhos, Caio e Cauê, que entenderam a minha ausência por esses dois anos, que adquiriram maturidade de ficarem sozinhos durante as tardes, que aprenderam a se virar com as tarefas, estudar para as provas sozinhos, às figuras editadas pelo Caio para colocar na dissertação e ao carinho do Cauê nas noites de insônia pela ansiedade.

Aos meus pais, Silvino e Diadema, por serem meu exemplo de luta e incansável busca por uma vida melhor, por me mostrarem o caminho a seguir e que devemos nos esforçar para conquistar os objetivos, pelo amor, carinho, dedicação, paciência, por estarem sempre ao meu lado e entenderem os motivos de minha ausência.

Ao meu sogro, Gilberto, e minha sogra, Sandra (*in memoriam*), como a Senhora nos faz falta, a saudade é imensa, o meu muito obrigada pelo apoio incansável, pela ajuda diária e por fazerem parte da minha caminhada.

A minha irmã, Thais, e meu irmão, Pablo, exemplos de pessoas, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a seguir em frente e que, mesmo longe, estão sempre perto.

Ao meu cunhado Marcel Augustus que mesmo do outro lado do Brasil, com toda sua sabedoria na área de computação conseguiu me ajudar a resolver o problema das vírgulas nos dados do programa Origin.

À Prof^a Dra Najla Mohamad Kassab, obrigada pela oportunidade oferecida, pela orientação, pela confiança, pela paciência, pelo exemplo de competência e dedicação à vida acadêmica.

À orientadora Dr.^a Elaine de Oliveira Araújo, grande amiga, que conheci no HUMAP, a responsável por eu ter começado o mestrado na área de controle de qualidade, pela disponibilidade em ajudar, respondendo sempre a todas as minhas dúvidas e contribuindo muito para a realização deste sonho.

Aos meus colegas de trabalho do laboratório, Nádia, Gustavo, Regiane, Tatiana, Rita, Letícia, Karine e minha chefia imediata, Carolina, Ana Cristina e

Wagner, pelo apoio, incentivo e ajuda nos momentos em que precisei, sendo por troca de plantões ou pelas escapadas para ligar o aparelho HPLC para colocar a coluna para lavar, pelas palavras de apoio, incentivo e força.

Ao prof. Teófilo F. M. Cardoso e às servidoras do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - LTF da UFMS, Layna e Michele, pela ajuda técnica e científica e disponibilização dos laboratórios para realização do trabalho na área de Cromatografia Líquida e Infravermelho.

Às colegas e alunas do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Larissa, Patrícia e Letícia, pela parceria e disponibilidade de me ajudar sempre que precisei.

À minha amiga farmacêutica Flávia Buainain Thomazi Franca, diretora da Attive Farma, que gentilmente doou o ingrediente farmacêutico ativo Bromoprida, que foi utilizado em todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do programa, pelos conhecimentos passados, pela paciência e dedicação.

Aos membros da banca pela disponibilidade, correções e críticas.

As minhas amigas Greyce, Gabrielly, Greiziele, Maína, Darla, do HUMAP, Nathália, Hellen, Josiane, Natália, Lorena, Leide, pela amizade, por participarem deste processo de amadurecimento, pelo apoio, convivência e momentos felizes, vocês sempre estarão no meu coração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para que este trabalho se concretizasse.

RESUMO

A bromoprida (BROP) é um medicamento que pertence à classe dos antieméticos e procinéticos, frequentemente utilizada no Brasil para tratar náuseas e vômitos, porém não disponível em vários países. Considerando os poucos estudos encontrados na literatura científica e a falta de métodos analíticos validados para a análise de bromoprida (BROP), o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para a determinação quantitativa de BROP na presença de excipientes MPB e PPB em formulações farmacêuticas e realizar o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. Os ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) foram identificadas e caracterizadas por observação das características organolépticas, faixa de fusão, cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectrofotometria na região do Ultravioleta (UV) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV). O método CLAE foi desenvolvido no cromatógrafo a líquido acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) usando um modo isocrático nas seguintes condições: coluna cromatográfica C18 (150 × 4,6 mm - 3 µm); fase móvel composta de acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; vazão 0,6 mL/min; volume de injeção de 20 µL; temperatura ambiente e comprimento de onda de 276 nm. O método foi validado conforme os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), de acordo com as diretrizes internacionais e nacionais. No estudo de degradação forçada a amostra foi estressada em meio ácido, básico, oxidativo, expostas à luz e calor. O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente foi realizado por espectroscopia de absorção na região IV, cada espectro foi registrado na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹ utilizando pastilhas de brometo de potássio. As técnicas empregadas para identificação e caracterização dos IFAs permitiram qualificá-los como substâncias químicas caracterizadas (SQC). A linearidade do método variou de 4-28 µg/mL para BROP com coeficiente de correlação linear (r) > 0,999, precisão intermediária com desvio padrão relativo (DPR) 0,48% e repetibilidade com DPR 0,47%. A exatidão teve recuperação média 99,60% ± 1,27% e boa seletividade. No teste de degradação forçada, a amostra padrão se manteve estável nas condições de estresse ácida, neutra, fotolítica sob luz branca fluorescente. Nas condições de degradação básica observou-se a degradação de 22,12%, na degradação oxidativa, 1,82% e na degradação fotolítica sob a luz solar, 7,92%. Os valores de limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) calculados foram 0,3 µg/mL e 0,09 µg/mL, respectivamente. O valor experimental para LQ foi 0,25 µg/mL, indicando boa sensibilidade do método. O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente mostrou poucas alterações nas bandas o que indica evidências de interações entre fármaco e excipientes nas associações 1:1 de BROP + MPB, 1:1 de BROP + PPB e 1:1:1 de BROP + MPB + PPB. As interações são atribuídas, principalmente, às ligações de hidrogênio e devem ser confirmadas por técnicas termoanalíticas. O método desenvolvido pode determinar o fármaco em soluções orais em um curto período de tempo e com baixo uso de solvente orgânico, e provavelmente pode ser empregado na rotina de análises quantitativas de controle de qualidade em indústrias farmacêuticas.

Palavras-chave: bromoprida, CLAE, validação, estabilidade, compatibilidade.

ABSTRACT

Bromopride (BROP) is a drug that belongs to the class of antiemetics and prokinetics, often used in Brazil to treat nausea and vomiting, but not available in several countries. Considering the few studies found in the scientific literature and the lack of validated analytical methods for the analysis of bromopride (BROP), the objective of this study was to develop and validate a stability-indicating method for the quantitative determination of BROP in the presence of MPB and PPB excipients in pharmaceutical formulations and to carry out a drug-excipient compatibility study. The active pharmaceutical ingredients (APIs) were identified and characterized by observation of organoleptic characteristics, melting range, thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultraviolet spectrophotometry (UV) and Infrared Spectroscopy (IR). The HPLC method was developed on a liquid chromatograph coupled to a diode array detector (DAD) using an isocratic mode under the following conditions: C18 chromatographic column (150 × 4.6 mm - 3 μm), mobile phase composed of acetonitrile: water (52:48, v/v), pH 3.5, flow rate of 0.6 mL/min, injection volume of 20 μL, room temperature and wavelength of 276 nm. The method was validated according to the following parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, robustness, and limits of detection (LD) and quantification (LQ), according to international and national guidelines. A forced degradation study was carried out and the samples were stressed in an acidic, basic, oxidative medium, exposed to light and heat. The study of drug-excipient compatibility was performed by Infrared Spectroscopy (IR), each spectrum was recorded in the range of 4000 to 400 cm⁻¹ using potassium bromide pellets. The techniques used to identify and characterize the APIs allowed them to be qualified as characterized chemical substances (CCS). The method linearity varied from 4-28 μg/mL for BROP with linear correlation coefficient (r) > 0.999, intermediate precision with relative standard deviation (RSD) 0.48% and repeatability with RSD 0.47%. The accuracy had mean recovery 99.60% ± 1.27% and good selectivity. In the forced degradation test, the standard sample remained stable under acidic stress conditions, neutral, photolytic under fluorescent white light, under basic degradation conditions there was a degradation of 22.12%, in oxidative degradation, 1.82% and in photolytic degradation under sunlight, 7.92%. The limit of quantification (LQ) and the limit of detection (LD) values calculated were 0.3 μL/mL and 0.09 μL/mL, respectively. The experimental value for LQ was 0.25 μL/mL, indicating good sensitivity of the method. The drug-excipient compatibility study showed few changes in the bands, which indicates evidence of interactions between drug and excipients in the combinations 1:1 of BROP + MPB, 1:1 of BROP + PPB and 1:1:1 of BROP + MPB + PPB. The interactions are mainly attributed to hydrogen bonds and must be confirmed by thermoanalytical techniques. The developed method can determine the drug in oral solutions in a short period of time and with low use of organic solvent, and it can probably be used in the routine of quantitative analysis of quality control in pharmaceutical industries.

Keywords: bromopride, HPLC, validation, stability, compatibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estímulos envolvidos no vômito – zona de disparo de quimiorreceptores (ZDQ) e centro emético.....24
- Figura 2** Estrutura química da bromoprida.....27
- Figura 3** Protocolo experimental utilizado para a realização do estudo de degradação forçada.....53
- Figura 4** Cristais de Bromoprida padrão em aumento de 10x (a) e 40x (b) e cristais de bromoprida recristalizado após diluição em ACN em aumento de 10x (c) e 40x (d), foto visualizada na lupa binocular Olympus.....58
- Figura 5.** Cromatoplaça dos compostos: metilparabeno (MPB), propilparabeno (PPB), Bromoprida (BROP), Digesan[®] (1), Bromoprida genérica marca Pratti-Donaduzi (2) e Digestina[®] (3), desenvolvida com o sistema eluente Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:10)60
- Figuras 6(a) e 6(b)** Espectro experimental de absorção na região do UV do IFA bromoprida na concentração de 16,0 µg/mL diluída em (a) fase móvel (acetonitrila: água ácida - 52:48 v/v, pH 3,5) e (b) acetonitrila.....61
- Figura 7(a), 7(b) e 7(c)** Espectros de absorção na região do UV dos IFAs BROP, MPB e PPB, obtidos através do DAD durante a análise pela CLAE, nas concentrações de 16 µg/ mL, 8 µg/ mL e 8 µg/ mL, respectivamente, utilizando como fase móvel acetonitrila: água ácida (52:48 v/v, pH 3,5 e vazão de 0,6 mL/min), coluna Inertsustain[®] C18.....62
- Figura 8** Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA bromoprida (BROP), em pastilhas de KBr.....64
- Figura 9** Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA Metilparabeno (MPB), em pastilhas de KBr.....66
- Figura 10** Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA Propilparabeno (PPB), em pastilhas de KBr.....68
- Figura 11** Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, MPB e BROP + MPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹71
- Figura 12(a) e 12(b)** Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, MPB e BROP + MPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-2000 cm⁻¹ e (b) número de onda 1800-400 cm⁻¹72
- Figura 13** Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, PPB e BROP + PPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹75

Figura 14(a) e 14(b) Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, PPB e BROP + PPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-1800 cm^{-1} e (b) número de onda 1800-400 cm^{-1}	76
Figura 15 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, MPB e PPB e BROP + MPB + PPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1}	79
Figura 16(a) e 16(b) Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, MPB e PPB e BROP + MPB + PPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-1800 cm^{-1} e (b) número de onda 1800-400 cm^{-1}	80
Figura 17 Ilustração dos possíveis sítios de interação molecular entre dos IFAs BROP e MPB (a) e BROP e PPB (b).....	83
Figura 18 Distribuição das microespécies da bromoprida (%) em função do pH.....	85
Figura 19 Cromatograma ilustrando os parâmetros cromatográficos tempo de retenção (t_R), assimetria (a_s), pratos (p), pureza do pico (pp) e resolução (R_s) da bromoprida (BROP), metilparabeno (MPB) e propilparabeno (PPB).....	86
Figura 20 Curva de calibração analítica da BROP desenvolvida em ACN:H ₂ O ácida (52:48, v/v); pH 3,5; fluxo de 0,6 mL/min e comprimento de onda de 276 nm.....	87
Figura 21 Análise dos resíduos obtidos a partir das curvas de regressão linear do BROP.....	88
Figura 22 Cromatograma da solução adjuvante sobrepostos ao cromatograma de amostra padrão de bromoprida (BROP), metilparabeno (MPB) e propilparabeno (PPB).....	89
Figura 23 Bromoprida e seus produtos de degradação BIB e BID obtido pela quebra da ligação carboxílica do grupo amida na degradação ácida realizada.....	90
Figura 24 Cromatograma da BROP após 4 horas de exposição a 60°C sob condições básicas.....	91
Figura 25 Cromatograma da BROP após 30 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio 0,03% a 60°C.....	92
Figura 26 Cromatograma da BROP após 60 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio 3% a 60°C.....	93
Figura 27 Bromoprida e seus produtos de degradação (BIC e BIE) obtidos pela perda da cadeia carbônica e pela hidroxilação da amina terciária no estudo de degradação oxidativa realizada.....	94

Figura 28 Cromatograma da BROP antes e após exposição à hidrólise neutra.....	95
Figura 29 Molécula de Bromoprida demonstrando os sítios reativos doadores de elétrons, provavelmente envolvidos nas reações de degradação.....	96
Figura 30 Cromatogramas comparativos de acordo com as alterações de composição da fase móvel (a), vazão da fase móvel (b), pH (c) e temperatura (d) no teste de robustez.	101
Figura 31 Cromatograma comparativo alterando marca da coluna cromatográfica no teste de robustez.....	101
Figura 32 Cromatograma comparativo de uma coluna nova e a coluna utilizada no desenvolvimento do método no teste de robustez.....	102
Figura 33 Cromatograma comparativo de duas colunas cromatográficas Inertsustain novas de lotes diferentes no teste de robustez.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos antieméticos por locais de ação e indicação de uso.....	25
Tabela 2 Métodos utilizados para determinação de bromoprida em formas farmacêuticas.....	33
Tabela 3 Métodos utilizados para determinação de bromoprida em matrizes biológicas.....	34
Tabela 4 Limites de aceitação, segundo guias regulatórios de validação, para alguns parâmetros cromatográficos.....	39
Tabela 5 Composição das fases móveis testadas na CCD para separação da BROP, MPB e PPB.....	46
Tabela 6 Condições cromatográficas para o ensaio de doseamento.....	51
Tabela 7 Condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada da BROP.....	54
Tabela 8 Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de BROP para avaliação da exatidão do método proposto, empregando amostra comercial.....	56
Tabela 9 Condição escolhida para realização da CCD da BROP, MPB e PPB com resultados de R _f (Fator de Retenção)	60
Tabela 10 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de BROP.....	65
Tabela 11 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de MPB.....	68
Tabela 12 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de PPB.....	69
Tabela 13 Bandas de absorção no espectro IV de BROP e MPB que apresentaram alterações após mistura física utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm ⁻¹	73
Tabela 14 Bandas de absorção no espectro IV de BROP e PPB que apresentaram alterações após mistura física utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm ⁻¹	77
Tabela 15 Bandas de absorção no espectro IV de BROP, MPB e PPB que apresentaram alterações após mistura sólida utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm ⁻¹	81

Tabela 16 Análise de variância (ANOVA) da regressão linear da BROP.....	87
Tabela 17 Porcentagem de degradação do IFA, sob as condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada da BROP.....	89
Tabela 18 Resultados obtidos na precisão intermediária e na repetibilidade.....	97
Tabela 19 Resultados do ensaio de exatidão de BROP através do método CLAE-DAD proposto.....	98
Tabela 20 Resultados do ensaio de robustez da BROP através do método CLAE-DAD proposto.....	99
Tabela 21 Análise do produto farmacêutico na forma de solução oral gotas através do método CLAE-DAD proposto.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ACS - “*American Chemical Society Specifications*” - Especificações de Reagentes segundo a Sociedade de Química Americana.

AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*

CLAE - Cromatografia Líquida de alto eficiência

CLUAE - Cromatografia Líquida de ultra alta eficiência

CQ - Controle de Qualidade

DAD – Detector de arranjo de diodos

DP - Desvio padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

D₂ - Receptores da dopamina-2

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – *Fourier transform infrared spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)

H₂O - Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

ICH – *International Conference on Harmonization*

IFA – Ingrediente farmacêutico ativo

IFAs – Ingredientes farmacêuticos ativos

IV – Infravermelho

KBr – Brometo de potássio

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

m/m – Massa/massa

MIE - Método de indicativo de estabilidade

MPB – Metilparabeno

P.A. – Para análise

PPB - Propilparabeno

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

PP – Pureza do pico cromatográfico

r – Coeficiente de correlação linear

RDC - Resolução da diretoria colegiada

RE - Resolução

Rf – *Retention factor* (Fator de retenção)

SNC - Sistema nervoso central

SQR - Substâncias Químicas de Referência

SQRC - Substância Química de Referência Caracterizada

TG – Termogravimetria

DTG – termogravimetria derivada

TGI - Trato gastrointestinal

t_R – Tempo de Retenção

UHPLC-UV - Ultra-high performance liquid chromatographic (Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção de UV)

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

v/v -Volume/volume

ZDQ - Zona de disparo de quimiorreceptores

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 ANTIEMÉTICOS.....	23
3.1.1 Bromoprida	25
3.1.1.1 <i>Propriedades Físico-químicas</i>	27
3.1.1.2 <i>Farmacocinética</i>	27
3.1.1.3 <i>Mecanismo de ação</i>	28
3.1.1.4 <i>Efeitos adversos</i>	29
3.1.1.5 <i>Métodos analíticos</i>	30
3.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS IFAS.....	35
3.2.1 Caracteres Organolépticos	35
3.2.2 Faixa de Fusão	35
3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
3.2.4 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV) ...	36
3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.2.6 Estudo de Degradação Forçada	38
3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO...	39
3.3.1 Linearidade	39
3.3.2 Seletividade	40
3.3.3 Precisão	41
3.3.4 Exatidão	41
3.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação	42
3.3.6 Robustez	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 INGREDIENTES FARMACÊUTICOS ATIVOS, AMOSTRAS COMERCIAIS E SOLVENTES.....	44
4.2 ANÁLISE QUALITATIVA.....	44

4.2.1 Substância Química de Referência Caracterizada (SQRC).....	44
4.2.1.1 <i>Características físicas e organolépticas.....</i>	45
4.2.1.2 <i>Faixa de Fusão.....</i>	45
4.2.1.3 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....</i>	46
4.2.1.4 <i>Espectroscopia de absorção na região de infravermelho.....</i>	47
4.2.1.5 <i>Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)....</i>	48
4.2.1.6 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</i>	48
4.2.2 Estudo de Compatibilidade Fármaco – Excipiente.....	49
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	49
4.3.1 Preparo das Soluções Padrões-estoques.....	49
4.3.1.1 <i>Solução Padrão A e B.....</i>	49
4.3.1.2 <i>Solução C.....</i>	50
4.3.2 Condições Cromatográficas.....	50
4.3.3 Desenvolvimento e otimização do método analítico por CLAE- DAD.....	51
4.3.4 Validação do Método.....	52
4.3.4.1 <i>Linearidade.....</i>	52
4.3.4.2 <i>Seletividade.....</i>	52
4.3.4.2.1 <i>Estudo de Degradação Forçada do IFA Isolado.....</i>	53
4.3.4.3 <i>Precisão.....</i>	55
4.3.4.4 <i>Exatidão.....</i>	55
4.3.4.5 <i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....</i>	56
4.3.4.6 <i>Robustez.....</i>	56
4.3.5 Aplicabilidade do Método.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA CARACTERIZADA (SQRC).....	58
5.1.1 Características físicas e organolépticas.....	58
5.1.2 Faixa de Fusão.....	59
5.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	59
5.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)	61
5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	62
5.1.6 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho.....	63

5.1.5.1 Bromoprida.....	63
5.1.5.2 Metilparabeno.....	66
5.1.5.3 Propilparabeno.....	68
5.2 COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DA MISTURA SÓLIDA DE BROP, MPB e PPB.....	71
5.2.1 Análise por IV da mistura binária sólida de BROP e MPB.....	71
5.2.2 Análise por IV da mistura binária sólida de BROP e PPB.....	75
5.2.3 Análise por IV da mistura ternária sólida de BROP, MPB e PPB	79
5.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO...	84
5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	86
5.4.1 Linearidade.....	86
5.4.2 Seletividade.....	88
5.4.2.1 Degradação ácida.....	90
5.4.2.2 Degradação alcalina.....	91
5.4.2.3 Degradação oxidativa.....	92
5.4.2.4 Degradação neutra.....	94
5.4.2.5 Degradação fotolítica.....	95
5.4.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	97
5.4.4 Precisão.....	97
5.4.5 Exatidão.....	98
5.4.5 Robustez.....	98
5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS.....	103
6 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

Os métodos analíticos desempenham fundamental importância na rotina de controle de qualidade (CQ), para que um método seja implementado na rotina, ele deve ser validado. O processo de validação é essencial para garantir resultados confiáveis, precisos e reproduzíveis. Na indústria farmacêutica, a política de validação é documentada e deve atender as necessidades dos regulamentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para produtos farmacêuticos e tem como objetivo oferecer produtos com características e qualidade necessárias de modo confiável e econômico (BARATA-SILVA, C. *et al.*, 2017; SENGUPTA *et al.*, 2018; SHARMA, S.; GOYAL, S.; CHAUHAN, K., 2018; DESHMUKH *et al.*, 2019; MARSON *et al.*, 2020).

O desenvolvimento e a validação de métodos analíticos são requisitos básicos na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos, na fabricação de produtos farmacêuticos e no controle de qualidade em qualquer laboratório analítico. Um bom desenvolvimento de método comprova a otimização dos recursos laboratoriais e a validação dos métodos atendem aos objetivos exigidos em cada estágio do seu desenvolvimento (BHAGAT; SAUDAGAR, 2019; DESHMUKH *et al.*, 2019).

Órgãos nacionais e internacionais têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes e guias a serem seguidos no processo de validação (RIBANI, M. *et al.*, 2004). Os parâmetros de validação preconizados para que os métodos analíticos apresentem resultados confiáveis e adequados à análise são: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez (AOAC, 2005; ICH, 2005; BRASIL, 2017; DESHMUKH *et al.*, 2019).

Para registro de novos produtos, renovação ou alteração do registro de produtos já existentes, os órgãos reguladores nacionais e internacionais exigem que seja apresentado o estudo de estabilidade que, conseqüentemente, requer uma metodologia analítica validada indicativa de estabilidade (BRASIL, 2019). Os estudos de estabilidade visam determinar a capacidade de uma formulação em manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (FACCI *et al.*, 2020; WHO, 2009). Para isso, o medicamento é exposto a várias condições ambientais com a finalidade de detectar impurezas,

determinar a potência, a segurança e a toxicidade (BHAGAT; SAUDAGAR, 2019; DESHMUKH *et al.*, 2019; BHASKAR *et al.*, 2020).

Mudanças na estabilidade do medicamento podem ameaçar a segurança do paciente pela formação de produtos de degradação tóxicos ou administração em doses menores do que a esperada (BHASKAR RAJVEER *et al.*, 2020). Além disso, a presença de resíduos farmacêuticos e produtos de degradação podem apresentar maior toxicidade para os ecossistemas aquático e terrestre, levando a sérios riscos para a segurança da fauna e flora mundial (PATEL *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2021; HONG *et al.*, 2021. DABIĆ *et al.*, 2021).

Dentro do estudo de estabilidade, o estudo da degradação forçada permite o conhecimento da estabilidade intrínseca da molécula e a geração de produtos de degradação, por meio da exposição do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) ou produto acabado a condições de estresse mais drásticas do que condições de estabilidade acelerada, como luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica, oxidação, entre outras (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2019; DESHMUKH *et al.*, 2019; BHASKAR RAJVEER *et al.*, 2020; AMBHORE *et al.*, 2021).

O estudo de degradação forçada deve promover degradação em extensão suficiente para avaliação da formação de produtos de degradação, e inferior àquela que levaria à degradação excessiva e completa do IFA, isto é, deve propiciar um decaimento de teor de princípio ativo na faixa de 10 a 30% (WHO, 2009; Informe Técnico nº1, 2008). Este estudo é essencial para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (MIE), que é um método analítico validado capaz de quantificar os analitos de interesse sem que haja interferência dos produtos de degradação, impurezas ou excipientes (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2019; DESHMUKH *et al.*, 2019; BHASKAR RAJVEER *et al.*, 2020; AMBHORE *et al.*, 2021).

Neste cenário, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais avançadas e utilizadas nos laboratórios de CQ de indústrias farmacêuticas para a análise qualitativa e quantitativa de medicamentos. Devido a sua grande versatilidade, à possibilidade de separar vários analitos e à elevada precisão, a CLAE pode ser aplicada para a determinação de teor de um princípio ativo, para a análise de composição e impurezas de um produto, para o estudo de estabilidade e para o estudo dos produtos de degradação de um composto

(REYNOLDS *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2012; BHARDWAJ; DWIVEDIA; AGARWALA, 2015; BHAGAT; SAUDAGAR, 2019; FACCI *et al.*, 2020).

Outra preocupação, em relação aos medicamentos, são as interações do fármaco com excipientes ou com outros ativos que podem levar a alterações nas propriedades químicas, físicas e terapêuticas da forma farmacêutica, essas alterações são denominadas incompatibilidades. As interações medicamentosas que ocorrem durante a formulação ou armazenamento podem ser categorizadas como interações físicas ou químicas (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A bromoprida (BROP) é um medicamento que pertence à classe dos antieméticos e procinéticos, é considerada um regulador fisiológico para o sistema digestivo (DOS SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013). É um fármaco muito utilizado no Brasil, comercializada na forma farmacêutica de comprimido, cápsula, injetável, solução oral gotas e xarope, mas pouco empregada em outros países do mundo e por esse motivo não há muitos estudos disponíveis na literatura científica.

Considerando a importância do uso de medicamentos seguros e eficazes e a escassez de metodologia analítica descrita para o medicamento bromoprida (BROP), resolveu-se desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para a determinação quantitativa de BROP na presença dos excipientes metilparabeno (MPB) e propilparabeno (PPB) em formulações farmacêuticas de uso oral, para isso, previamente foi realizada testes de identificação e caracterização da amostra para ser utilizada como substância química de referência caracterizada (SQRC). Além disso, objetivou-se realizar um estudo de compatibilidade fármaco-excipiente, uma vez que, até o momento, não foi encontrado informações a respeito em compêndios oficiais e nem tampouco na literatura científica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD para a determinação quantitativa de BROP na presença de excipientes MPB e PPB em formulações farmacêuticas e realizar o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises qualitativas dos ingredientes ...: BROP, MPB e PPB, a fim de caracterizar e comprovar suas identidades através das observações das características organolépticas, análise da faixa de fusão, espectrofotometria de absorção no UV, espectroscopia de absorção na região do IV e CLAE-DAD;
- Desenvolver e validar um método por CLAE- DAD em fase reversa para a determinação quantitativa de BROP na presença de excipientes MPB e PPB;
- Realizar estudo de degradação forçada para verificar se o método proposto (CLAE-DAD) é indicativo de estabilidade para a bromoprida;
- Avaliar a compatibilidade em estado sólido da BROP e dos conservantes através da mistura binária (1:1) e ternária (1:1:1) por FTIR;
- Aplicar o método desenvolvido e validado para Controle de Qualidade (CQ) de amostras comerciais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTIEMÉTICOS

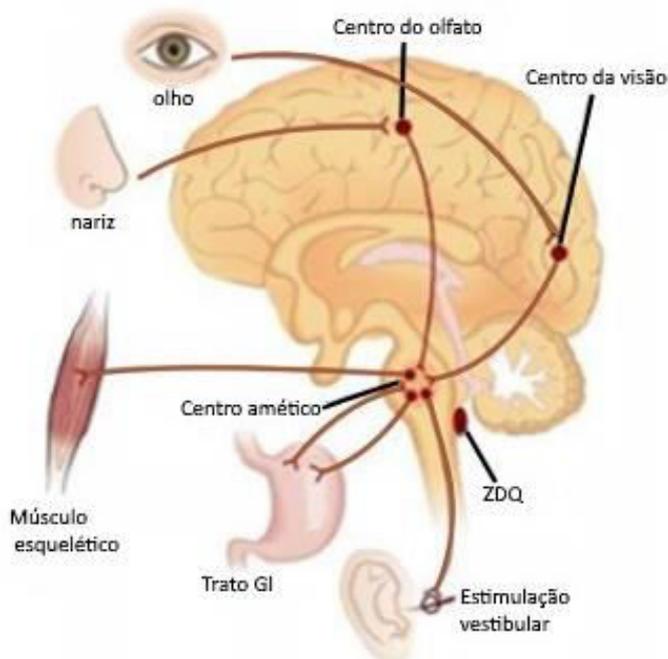
Os antieméticos são medicamentos utilizados tanto para profilaxia quanto para tratamento de náuseas e vômitos (ALEX *et al.*, 2017; MOGOLLÓN; DÍAZ, 2019). Seu uso é frequente em várias áreas da medicina, principalmente nas especialidades como anestesiologia e pediatria (HENDREN; APONTE-FELICIANO; KOVAC, 2015; MOGOLLÓN; DÍAZ, 2019).

Náuseas e vômitos podem ser manifestados em uma grande variedade de condições (CASTRO *et al.*, 2014; DULAY; DULAY, 2020; FLAKE; LINN; HORNECKER, 2015) cujos mecanismos estão associados à ativação de vários receptores localizados em diferentes partes do corpo (KUMAR; KUMAR, 2013).

Esses sintomas podem ocorrer na gastroenterite aguda em adultos e crianças (EPIFANIO, M. *et al.*, 2018; PORTELA *et al.*, 2014; FEDOROWICZ; JAGANNATH; CARTER, 2011; YILMAZ; YILDIZDAS; SERTDEMIR, 2010), no tratamento quimioterápico (ROILA *et al.*, 1985; TERRIN; MCWILLIAMS; MAURER, 1985; FRESCO; SUÁREZ, 2004; JORDAN; SIPPEL; SCHMOLL, 2007; DELUCIA, 2007; CASTILHOS; BORELLA, 2011; CASTRO *et al.*, 2014), nos estados emotivos, nervosismo, depressão, início de gravidez, cinetose, presença de tumores encefálicos e devido a efeitos adversos de muitos medicamentos (DULAY; DULAY, 2020).

Vômitos, por qualquer causa, ocorrem devido à estimulação dos dois centros localizados no cérebro (Figura 1), a zona de disparo de quimiorreceptores (ZDQ) da área postrema e o centro de vômito (FEDOROWICZ; JAGANNATH; CARTER, 2011; KUMAR; KUMAR, 2013). O vômito ainda pode ser provocado por mecanismos periféricos, como danos na mucosa e estimulação de receptores gastrintestinais (GI), mecanismos vestibulares, pela ativação do aparelho vestibular e alteração de paladar e olfato (KUMAR; KUMAR, 2013), que enviam estímulos à zona de disparo de quimiorreceptores e ao centro do vômito (RANG *et al.*, 2016).

Figura 1 Estímulos envolvidos no vômito – zona de disparo de quimiorreceptores (ZDQ) e centro emético.



Fonte: adaptado de LEWIS *et al.*, 2013.

Os antieméticos agem bloqueando receptores histamínicos H₁, dopamina D₂, receptor 5-HT₃, muscarínicos, canabinóides e neurocinina-1 (NK₁) tanto a nível central quanto a nível periférico e podem ser classificados de acordo com sua ação (Tabela 1) (KUMAR; KUMAR, 2013; ALEX *et al.*, 2017; TACK, 2008; MOGOLLÓN; DÍAZ, 2019; DULAY; DULAY, 2020).

Os benefícios dos agentes antieméticos variam de acordo com a etiologia dos sintomas, a resposta dos pacientes ao medicamento e a ocorrência de efeitos adversos (LIRA *et al.*, 2007; TONINI *et al.*, 2004), não existe, assim, um medicamento específico que bloqueie as náuseas e os vômitos completamente independentemente da causa, como um antiemético universal (SANGER; ANDREWS, 2018).

A intervenção farmacológica nos casos de vômitos, principalmente em crianças, pode evitar complicações graves como desidratação, desequilíbrio eletrolítico e internações prolongadas (GUARINO *et al.*, 2014; WATCHA; WHITE, 1992).

Tabela 1 Classificação dos antieméticos por locais de ação e indicação de uso.

Classes	Receptores	Uso	Exemplo
Anticolinérgicos	muscarínicos M3 e M5	prevenção ou tratamento da cinetose.	hioscina
Antihistamínico	histamínicos H1	prevenção ou tratamento da cinetose.	cinarizina, ciclizina e prometazina
Neurolépticos	dopaminérgico D ₂	manifestações mais intensas de náuseas e vômitos associados a câncer, radioterapia, citotóxicos, opióides, anestésicos e outros fármacos	clorpromazina, perfenazina, proclorperazina, trifluoperazina,
	muscarínicos		cinarizina, ciclizina, prometazina,
	histamínicos		haloperidol, levomepromazina
Procinéticos	dopaminérgico D ₂ (serotoninérgicos) receptores 5-HT ₃	vômitos causados por uremia, radiação, distúrbios gastrintestinais, citotóxicos, refluxo gastroesofágico e distúrbios hepáticos e biliares	metoclopramida, bromoprida , domperidona
Antagonistas dos receptores 5-HT ₃	(serotoninérgicos) receptores 5-HT ₃	citotóxicos ou radiação, vômitos pós-operatórios	ondansetrona
Canabinóides	receptores CB1	citotóxicos	nabilona
Antagonistas da neurocinina-1	receptores NK1	fase tardia da êmese causada por fármacos citotóxicos	aprepitanto, fosaprepitanto

Fonte: adaptado de RANG *et al.*, 2016 e DULAY; DULAY, 2020.

Medicamentos que promovem a motilidade gastrintestinal são usados com a finalidade antiemética por estimular, direta ou indiretamente, as contrações musculares lisas, acelerando o esvaziamento gástrico e o aumento do trânsito intestinal (KARAMANOLIS; TACK, 2006; TONINI, 1996).

3.1.1 Bromoprida

A bromoprida é um fármaco antagonista dopaminérgico com propriedades antieméticas e procinéticas, indicada para o alívio dos distúrbios da motilidade gastrintestinal, situações de refluxo gastroesofágico, anorexia, náuseas e

vômitos de origem central e periférica decorrentes de doenças infecciosas, efeitos adversos a medicamentos e, também, utilizada para facilitar procedimentos radiológicos do trato gastrointestinal (DOS SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013; DUNNE; BUSHEE; ARGIKAR, 2013; SANOFI, 2020).

Medicamentos contendo bromoprida estão disponíveis apenas em alguns países, como Taiwan, Itália, Espanha, Alemanha e Brasil, não sendo comercializado nos EUA e no Reino Unido (DUNNE; BUSHEE; ARGIKAR, 2013; KARAMANOLIS; TACK, 2006; TACK, 2008). No Brasil, há uma lista de medicamentos considerados essenciais no âmbito da saúde pública, a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), no entanto o fármaco bromoprida não faz parte desse rol, devido ao fato de se tratar de um bromo análogo da metoclopramida e algumas literaturas científicas não evidenciarem eficácia superior ao seu análogo, pelo fato do tratamento prolongado com bromoprida poder estar associado a parestesias faciais e a sintomas extrapiramidais e, ainda, por ser um fármaco que prolonga o intervalo QT, apesar de comprovadamente atuar como procinético (Nota Técnica N° 188/2012; DE VASCONCELLOS; DUARTE; MACHADO, 2014; GRALNEK *et al.*, 2015; BRASIL, 2019; BRASIL, 2022).

No Brasil, cerca de 34 formulações contendo bromoprida possuem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e se apresentam em várias formas farmacêuticas, como cápsulas, comprimidos, soluções orais, injetáveis e gotas pediátricas (BRASIL, 2019; LACHI-SILVA *et al.*, 2020). A incorporação desse fármaco no mercado brasileiro se deu no período de 1970-1980, em decorrência dos bons resultados obtidos na prática clínica pediátrica, o qual ainda persiste atualmente (PORTELA *et al.*, 2014; EPIFANIO; *et al.*, 2018). De Vasconcellos, Duarte e Machado (2014) citaram que a bromoprida está entre as drogas mais usadas para tratamento do vômito, junto com a ondansetrona, metoclopramida, clorpromazina, dimenidrato e domperidona (DE VASCONCELLOS; DUARTE; MACHADO, 2014). Em 2020, Tinido e Lopes-Ortiz, a fim de buscar possíveis interações medicamentosas em uma UTI adulto de um hospital da região noroeste do Paraná, avaliaram as prescrições realizadas durante 4 meses e constataram que o medicamento mais prescrito foi a bromoprida (90%).

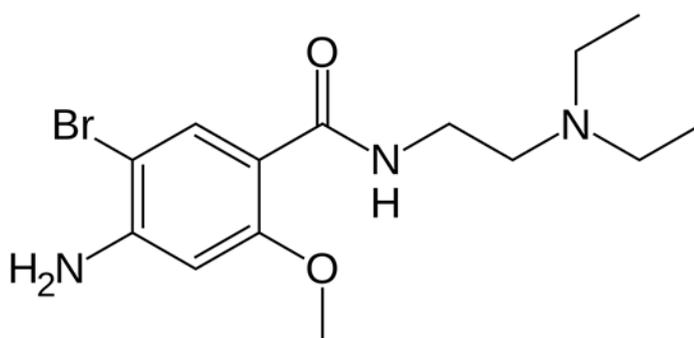
Apesar da grande utilização deste IFA no Brasil, a falta de estudos em

relação a bromoprida foi relatada desde 1982, quando Kilbinger e Weihrauch (1982) chamaram a atenção à existência de poucos estudos sobre o efeito da BROP na motilidade gastrointestinal (KILBINGER; WEIHRAUCH, 1982). Magalhães e colaboradores (2009) também encontraram poucos estudos clínicos a respeito da BROP, mas ainda assim, constataram que medicamentos contendo esse IFA são prescritos com bastante frequência como antieméticos para uso infantil (MAGALHÃES *et al.*, 2009).

3.1.1.1 Propriedades Físico-químicas

A bromoprida ($C_{14}H_{22}BrN_3O_2$), 4-amino-5-bromo-N-[2-(dietilamino)etil]-2-metoxibenzamida (Figura 2), apresenta faixa de fusão entre 151-155°C, é um pó cristalino, branco a marfim, praticamente inodoro e insolúvel em água, pouco solúvel em acetona, etanol e éter etílico, ligeiramente solúvel em acetonitrila e solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais (REYNOLDS *et al.*, 2002; NAZARE *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2014; BRASIL, 2019). Este composto é um bromo-análogo da metoclopramida, ambos derivados da benzamida, é quimicamente considerada uma base fraca ($pK_a = 9,04$) e possui dois grupos ionizáveis (TANAKA; HIRAYAMA, 2004; SILVA *et al.*, 2015; CHEMICALIZE, 2020).

Figura 2 Estrutura química da bromoprida.



Fonte: próprio autor utilizando ChemDraw Pro 8.0

3.1.1.2 Farmacocinética

A bromoprida é classificada como classe II de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, que são medicamentos de baixa solubilidade e

alta permeabilidade. A solubilidade da bromoprida depende do pH, onde o aumento do pH resulta em menor solubilidade (SILVA *et al.*, 2015; CHEMICALIZE, 2020).

A biodisponibilidade da bromoprida é de 54 a 74% via oral e de 78% injetável, via intramuscular. O pico sérico da bromoprida ocorre em 1 a 1,5 horas após a administração de solução oral e gotas, em 2,5 a 3 horas após administração oral de cápsulas e em 30 minutos pós administração intramuscular. Apresenta baixa ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 40%), sendo metabolizada no fígado e excretada na urina (DOS SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013; PARRON; TIYO; ARANTES, 2017; SANOFI, 2020). Cerca de 10-14% são eliminados de forma inalterada, como composto original (SANOFI, 2020; PUBCHEN, 2021). Após administração de dose única por via intravenosa, observou-se clearance sistêmico de 900 mL/min e um volume de distribuição de 215L, apresentando meia vida de eliminação de 4 a 5 horas (DOS SANTOS; TORRIANI; BARROS, 2013).

3.1.1.3 Mecanismo de ação

A principal ação da bromoprida está relacionada ao bloqueio dos receptores da dopamina-2 (D₂) no sistema nervoso central (SNC) e no trato gastrintestinal (TGI). No SNC, a bromoprida tem ação na área postrema/zona quimiorreceptora e no centro de vômito, que se situam fora da barreira hematoencefálica (TONINI *et al.*, 2004; LIRA *et al.*, 2007; BARREIRA; MAGALDI, 2009; DUNNE; BUSHEE; ARGIKAR, 2013; PARRON; TIYO; ARANTES, 2017).

No TGI, a bromoprida age regulando a motilidade, através do aumento do tônus e da amplitude das contrações gástricas e a peristalse do esôfago até o intestino delgado proximal, promove o relaxamento do esfíncter pilórico, melhorando, assim, o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal (GRALLA, 1983; HARRINGTON *et al.*, 1983; KILBINGER; WEIHRAUCH, 1982; DEMOL; RUOFF; WEIHRAUCH, 1989; TONINI, 1996; TONINI *et al.*, 2004; KARAMANOLIS; TACK, 2006; LIRA *et al.*, 2007; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2012; PORTELA *et al.*, 2014).

Os agentes antidopaminérgicos têm sido amplamente utilizados como antieméticos para a prevenção de náusea e vômitos na gravidez, na

quimioterapia anticâncer, nos pós-cirúrgicos, no tratamento da hipostenia motora gástrica e nas crises de enxaqueca (TONINI *et al.*, 2004; DULAY; DULAY, 2020).

3.1.1.4 Efeitos adversos

A utilização de fármacos antieméticos exercem seus efeitos terapêuticos principalmente pelo antagonismo dos receptores D₂ na zona quimiorreceptora e no centro do vômito, porém, infelizmente, não distinguem entre os receptores D₂ nas diferentes vias cerebrais e estes receptores em outras vias também serão bloqueados (SCHMIDT; BAGATINI, 1997; BELKACEMI; DARMANI, 2020). Deste modo, quando se utiliza medicações antidopaminérgicas pode ocorrer efeitos adversos, como efeitos motores extrapiramidais (através do bloqueio dos receptores D₂ na via nigro-estriatal) e aumento da liberação de prolactina (pelo bloqueio dos receptores D₂ na via tuberoinfundibular) (FELICIO; NASELLO; PALERMO-NETO, 1987; FELICIO; NASELLO, 1989; GODEIRO JR; FELÍCIO; DO PRADO, 2006; HENDREN; APONTE-FELICIANO; KOVAC, 2015).

As principais alterações clínicas observadas quando há distúrbios de movimento induzidos por antieméticos são: reações distônicas agudas ou discinesias agudas, rigidez ou hipertonia, acatisia, parkinsonismo ou acinesia, parestesias e discinesia tardia (MARSDEN, 1980; JENNER TONINI *et al.*, 2004; KARAMANOLIS; TACK, 2006; VAN DER PADT; VAN SCHAİK; SONNEVELD, 2006; PROTÓGENES, 2010; BASSOLI, T. *et al.*, 2020).

A incidência dos efeitos extrapiramidais varia de acordo com a medicação e depende de fatores como constante de dissociação do fármaco, a capacidade (%) de penetração na barreira hematoencefálica, a quantidade ingerida e o tempo de uso (KAPUR; SEEMAN, 2001; BARREIRA; MAGALDI, 2009).

A hiperprolactinemia é um efeito colateral bastante observado que pode ocorrer, em intensidade variada, com todos os medicamentos procinéticos, pois agem bloqueando os receptores D₂ da via tuberoinfundibular na glândula pituitária que se encontra fora da barreira hematoencefálica, já as reações extrapiramidais ocorrem somente com os medicamentos que ultrapassam essa barreira (PEREZ-LOPEZ; ABOS; 1982; BARREIRA; MAGALDI, 2009). Embora o aumento na produção de prolactina seja geralmente considerado um efeito adverso, ele pode ser explorado clinicamente como um auxílio para iniciar e

manter produção de leite no caso da lactação (GABAY, 2002).

Epifânio e colaboradores (2018) compararam a eficácia de uma única dose intramuscular de bromoprida, metoclopramida ou ondansetrona no tratamento de vômito. A ondansetrona mostrou melhores resultados que as outras duas drogas na primeira hora, após 6 horas e após 24 horas, e apresentou menos efeitos adversos. A bromoprida neste trabalho apresentou melhores resultados quando comparados a metoclopramida, tanto no tratamento do vômito quanto na ocorrência de efeitos adversos (EPIFÂNIO *et al.*, 2018).

Segundo Toporovski (2009), a ação das drogas procinéticas não é consistente, o que limita o seu uso isolado no tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, e, ainda, demonstra riscos elevados devidos aos efeitos adversos, principalmente com o uso da metoclopramida e bromoprida, já citava a necessidade de futuros estudos que envolvessem um maior número de pacientes, para ter um melhor conhecimento a respeito do uso desse grupo de medicações (TOPOROVSKI, 2009).

Alcântara, Vieira e Albuquerque (2003) também concordam que metoclopramida e a bromoprida não são recomendados para crianças para faixa etária de 0 a 1 ano, pois são responsáveis por quadros de intoxicação com manifestações neurológicas, fazendo com que os pediatras solicitem exames desnecessários para confirmar o quadro (ALCÂNTARA; VIEIRA; DE ALBUQUERQUE, 2003).

3.1.1.5 Métodos analíticos

Na literatura científica existem poucos estudos analíticos publicados para a quantificação da bromoprida em matéria-prima e produto acabado. Nenhum estudo de revisão, com vistas ao controle de qualidade de medicamentos, contendo esse fármaco foi encontrado.

Alguns trabalhos analíticos empregando a análise por injeção em fluxo, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), CLAE acoplada à espectrometria de massa e cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUAE) foram metodologias utilizadas para quantificar bromoprida em diferentes matrizes. A Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019) descreve espectrofotometria na região do UV para a determinação de bromoprida em matéria-prima e em comprimidos e

CLAE, para análise em solução oral. Nenhuma monografia para bromoprida foi encontrada nas Farmacopeias americana (USP - 2014), britânica (2013) e japonesa (2011).

Fontana e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram métodos por espectrofotometria UV e CLAE para a determinação de bromoprida em soluções orais e injetáveis. Lima e colaboradores (2014) propuseram uma metodologia para a determinação direta de bromoprida em comprimidos de formulações farmacêuticas, soluções líquidas e fluidos biológicos por análise de injeção em fluxo. Silva e colaboradores (2015) desenvolveram um teste de dissolução de correlação *in vivo* - *in vitro* para cápsulas de bromoprida de liberação prolongada usando dados de biodisponibilidade para estados de jejum e não-jejum, a análise quantitativa foi validada com sucesso pelo sistema cromatográfico, empregando detector UV (273nm) juntamente com um espectrômetro de massa em tandem triplo quadrupolo. E, recentemente, Abreu, Mahr e do Lago (2021) desenvolveram um método indicativo de estabilidade para quantificação da bromoprida e de cinco impurezas orgânicas por cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detecção de UV (UHPLC-UV).

De todos os métodos citados para insumos ou produtos acabados (Tabela 2), apenas este último apresenta metodologia para produtos de degradação, ou seja, pode ser considerado método indicativo de estabilidade, uma vez que os outros estudos não foram desenvolvidos com essa finalidade.

Outros trabalhos encontrados na literatura científica descreveram determinações de bromoprida em fluidos biológicos usando CLAE e CLAE acoplado a espectrometria de massa. Nestes estudos, foi realizada uma fase de extração, que utiliza uma grande quantidade de solventes com posterior geração vultuosa de resíduos (Tabela 3).

Vale ainda ressaltar que os trabalhos citados, bem com a Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019), utilizam tampão em sua fase móvel. O uso de tampões inorgânicos pode ser prejudicial ao processo cromatográfico, pois, leva ao acúmulo de resíduos, entupimento de tubulações e da cela de detecção, causando a diminuição do fluxo e aumento da pressão do sistema, uma vez que os sais podem precipitar quando não são totalmente eliminados do sistema cromatográfico antes do seu desligamento. As soluções tampão também propiciam o desenvolvimento de algas e fungos, tendo como consequência a

inutilização da coluna e dos capilares do cromatógrafo. Outra desvantagem é o fato de os tampões não serem solúveis em acetonitrila, solvente muito utilizado nas análises cromatográficas por fase reversa (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010; DCTECH, 2017; GOMES; SANTOS; FARIA, 202).

Tabela 2 Métodos utilizados para determinação de bromoprida em formas farmacêuticas.

Cromatografia Líquida de alta eficiência										
Amostra	Coluna	Diluição	Fase Móvel	UV	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção	Linearidade	LD	LQ	Referência
Solução oral e solução injetável	Phenomenex C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm) Gemini Pré-coluna C18 (40 × 3,0 mm, 4 µm)	metanol	10 mM KH ₂ PO ₄ + 0,1% trietilamina (pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico): acetonitrila (80:20)	310 nm	1	5,1 min	5 - 25 µg/mL	0,15µg/mL	0,50 µg/mL	(FONTANA <i>et al.</i> , 2010)
solução oral	Coluna Fenil (250 X 4,6 mm, 5 µm)	-	Tampão pH 7,0: acetonitrila (60:40). Tampão = KH ₂ PO ₄ + H ₂ O + trietilamina + ác fosfórico	310 nm	1	-	-	-	-	(BRASIL, 2019)
Cromatografia Líquida de ultra alta eficiência										
Comprimidos + produtos de degradação	YMC Triart Fenil (100 x 2,0 mm, 1,9 µm)		Gradiente Solução A - bicarbonato de amônio PH 5 mM 8,9 ± 0,1 e solução B - acetonitrila / tetra-hidrofurano (70:30)	275 nm	0,3	15 min (total da corrida)	-	-	-	(ABREU; MAHR; DO LAGO, 2021)
Análise por Injeção em Fluxo										
Comprimidos, sol. líquidas, urina	-	HCl 1,2M	-	565 nm	2,63	-	0,125–10.0 µg/mL	36,9 ng/mL	125 ng/mL	(LIMA <i>et al.</i> , 2014)
Espectrofotometria no UV										
Solução oral e solução injetável	-	HCl 0,1M	-	310 nm	-	-	5 - 25 µg/mL	0,48 µg/mL	1,60 µg/mL	(FONTANA <i>et al.</i> , 2010)
Cápsula	-	HCl 0,1M	-	273 nm	-	-	2,5 – 12,5 µg/mL	-	-	(SILVA <i>et al.</i> , 2015)
Comprimidos	-	HCl 0,1M	-	274 nm	-	-	-	-	-	(BRASIL, 2019)

Fonte: próprio autor.

Tabela 3 Métodos utilizados para determinação de bromoprida em matrizes biológicas.

Método	Amostra	Coluna	Fase Móvel	UV	Vazão (mL/min)	Tempo de retenção	Linearidade	LD	LQ	Referência
CLAE	plasma e urina	C8 (25 cm x 0,46 cm i.d. 6 µm) pré-coluna (7 cm x 0,2 cm i.d.)	Acetonitrila: água com tampão fosfato (0,1% pH 7,5) (40:60) + NaOH 4M para ajuste de pH 7,9	275 nm	2,2 - 2,7	7 - 8 min	5 - 10 ng/mL	2 ng/mL	-	(BRODIE; CHASSEAU; ROONEY, 1984)
CLAE	plasma	C8 (25 cm x 0,46 cm i.d. 6 µm) Zorbax	acetonitrila: água com tampão fosfato (1%) (2:5) ajuste de pH 7,9	275 nm	2,2 - 2,7	8 min	2 - 100 ng/mL	2 ng/mL	-	(BRODIE <i>et al.</i> , 1986)
	urina						20 - 300 ng/mL	20 ng/mL	-	
CLAE acoplado a espectrometria de massas	plasma	C18 (50 × 3 mm i.d., 3 µm) Polaris (Varian, USA)	acetonitrila: água com ácido fórmico 0,1% (8:2)	271 nm	0,2	< 2 min (1,85 min)	1 - 100 ng/mL	-	1 ng/mL	(NAZARE <i>et al.</i> , 2005)
CLAE acoplado a espectrometria de massas	plasma	C18 (100 × 4.6 mm i.d., 5 µm) Phenomenex (Torrance, CA, USA)	acetonitrila: tampão de acetato de amônia (10 mM/L) (80:20)	273 nm	0,7		2,5 - 25 µg/mL		0,8999 ng/mL	(SILVA <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: próprio autor.

3.2 ANÁLISE QUALITATIVA DOS IFAS

As Substâncias Químicas de Referência (SQR) são materiais utilizados na avaliação da conformidade dos insumos farmacêuticos e dos medicamentos, sendo utilizados como referência de controle de qualidade nacional, a Farmacopeia Brasileira prevê que na impossibilidade de aquisição destas SQR, pode-se utilizar padrões secundários que devem ser devidamente caracterizados (BRASIL, 2019).

3.2.1 Caracteres Organolépticos

Na Farmacopeia Brasileira (2019) estão descritas as características físicas e organolépticas como forma, cor, odor, sabor, cristalinidade entre outras características, com a finalidade de qualificar as matérias-primas, como ensaios preliminares à identidade presuntiva de fármacos e excipientes (BRASIL, 2019).

Para a observação dos cristais de um IFA, além da análise direta em microscópio óptico e lupa de aumento, existem várias técnicas utilizadas para determinar as suas formas cristalinas, as mais comumente utilizadas são as técnicas com solventes realizadas com soluções ou suspensões (CUI, 2007; CARRER *et al.*, 2016). Este método é bastante utilizado pela indústria farmacêutica na investigação do fenômeno do polimorfismo nos medicamentos, já que mais de 85% das IFAs foram relatadas como tendo mais de uma forma polimórfica no estado sólido, o que pode levar a mudanças na solubilidade, estabilidade, dissolução, biodisponibilidade e eficácia (MANGIN; PUEL; VEESLER, 2009; LIN, 2015; CARRER *et al.*, 2016).

3.2.2 Faixa de Fusão

Faixa de fusão de uma substância é uma constante físico-química caracterizada pelo intervalo de temperatura compreendido entre o início (no qual a substância começa a fluidificar-se) e o término da fusão (que é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida). É uma propriedade intrínseca das substâncias, utilizada para a confirmação da sua identidade, assim como indicador de pureza (BRASIL, 2019).

3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica de adsorção flexível (sólido - líquido) através da qual podem-se identificar e separar substâncias, impurezas e produtos de degradação. A separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes da mistura pela fase estacionária, que pode ser constituído de diversos materiais tais como vidro, alumínio ou poliéster e revestida de adsorvente geralmente a sílica ou sílica-gel. Após a eluição dos analitos na placa cromatográfica, emprega-se um método de revelação que permite a identificação dos analitos mediante comparação com padrões analíticos através do cálculo do fator de retenção (R_f) de acordo com a Equação 1 (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; BRASIL, 2019; MELO *et al.*, 2020):

$$\text{Equação 1: } R_f = D_x / \Delta S,$$

Onde D_x é a distância percorrida pelo composto (matéria-prima e/ou amostra comercial) e ΔS é a distância percorrida pelo eluente.

A CCD apresenta grande importância por ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e permite a detecção de diversos compostos simultaneamente em uma mesma placa (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010; LINI *et al.*, 2014; CIURA *et al.*, 2017). Possui várias aplicações no CQ de fármacos, nas análises toxicológicas e de alimentos, além de possibilitar a verificação da presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (LINI *et al.*, 2014).

3.2.4 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é um método de identificação de excelência no controle de qualidade de medicamentos, se baseia nas respostas das absorções que surgem das interações vibracionais dos grupos funcionais específicos e das ligações químicas presentes, sendo considerada a impressão digital da molécula, pois revela importantes informações sobre constituição da amostra, sendo que duas moléculas nunca terão o mesmo espectro no IV a não ser que sejam enantiômeras. A região do espectro de maior interesse na análise de fármacos está entre números de onda

de 4000 a 400 cm^{-1} (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; COATES, 2006; PAVIA *et al.*, 2016).

A Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica rápida, de baixo custo, não destrutiva e requer pouco preparo das amostras (LOPES; FASCIO, 2004; COATES, 2006). Quando as amostras são submetidas à radiação infravermelha (IR), resultam em absorção e/ou transmissão de energia de acordo com as vibrações moleculares específicas, que podem ser de dois tipos, estiramento (ν) e dobramento (δ), gerando bandas no espectro que permite a identificação dos grupamentos presentes nas moléculas. Desta forma, o FTIR é considerada uma metodologia simples para a detecção de variações, podendo identificar possíveis impurezas e interações fármaco-fármaco ou fármaco-excipientes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; PAVIA *et al.*, 2016). O desaparecimento de uma banda de absorção, a redução da intensidade de uma banda ou o aparecimento de novas bandas são indicativos da existência de interações entre o API e o excipiente em estudo (SEGALL, 2019).

3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos vários métodos cromatográficos para a separação e análise de misturas de substâncias, sendo muitas vezes a técnica de primeira escolha. É uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. É um método utilizado universalmente, possui precisão de ensaio notável e praticamente todas as amostras têm possibilidade de separação por essa metodologia, pois uma grande variedade de equipamentos e colunas estão disponíveis comercialmente (BHARDWAJ, DWIVEDIA e AGARWALA, 2015; BRASIL, 2019).

Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam no sucesso da separação utilizando a CLAE, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da

temperatura do sistema e da composição e área superficial da fase estacionária (comprimento e o diâmetro interno da coluna, o tipo e o tamanho das partículas da fase estacionária) (BRASIL, 2019).

Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia a líquido de alta eficiência são os espectrofotométricos (UV/Vis), que detectam as substâncias com grupamento cromóforo. Quando os detectores de comprimento de onda são múltiplos e medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, são denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD) (BRASIL, 2019).

3.2.6 Estudo de Degradação Forçada

O estudo de degradação forçada faz parte do estudo de estabilidade, que tem a finalidade de acelerar o processo de degradação química ou alterações físicas sob condições forçadas de armazenamento, como temperaturas e umidade elevadas, exposição a condições oxidantes, ácidas, básicas, fotodegradação, entre outros (ICH, 2003; BRASIL, 2015; BRASIL, 2019).

As amostras geradas a partir da degradação forçada podem ser utilizadas para desenvolver o método indicativo de estabilidade (MIE), definido como um procedimento analítico validado que mede com precisão e exatidão os ingredientes ativos livres de interferências potenciais, como produtos de degradação, impurezas do processo ou excipientes (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH, 2003; DESHMUKH *et al.*, 2019; BHASKAR *et al.*, 2020). A partir da obtenção de amostras degradadas, a maioria das diretrizes regulatórias mencionadas como objetivo o limite de degradação entre 10% e 30%, pode-se identificar os produtos de degradação através de detectores acoplados ao sistema CLAE, obtendo, assim, informações sobre as vias de degradação e os produtos de degradação do ingrediente. Se for observada a ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco deve ser considerado estável. Se a degradação for inferior a 10%, devem-se aumentar as condições de estresse (BAKSHI; SINGH, 2002; BRASIL, 2008; GUPTA *et al.*, 2012; BHASKAR *et al.*, 2020).

3.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A otimização ou conformidade do sistema é a etapa inicial do processo de validação de um método e indica que o sistema selecionado está adequado para ser utilizado e fornecer resultados precisos e exatos, aceitáveis e confiáveis (BHAGAT; SAUDAGAR, 2019; MARSON *et al.*, 2020).

A escolha da melhor condição cromatográfica em uma análise por cromatografia líquida, com a finalidade de garantir o desempenho do método antes ou durante a sua validação, deve ser realizada através de replicatas de injeções da mesma amostra para avaliação de parâmetros como tempo de retenção, assimetria do pico, número de pratos, resolução, pureza do pico e desvio padrão relativo (Tabela 4). Estes parâmetros seguem as recomendações da Anvisa, FDA e International Conference on Harmonisation (FDA, 2000; ICH, 2005; BRASIL, 2017; BHAGAT; SAUDAGAR, 2019; MARSON *et al.*, 2020).

Tabela 4 Limites de aceitação, segundo guias regulatórios de validação, para alguns parâmetros cromatográficos.

Parâmetro	Limites
Assimetria do pico	$\leq 2,0$
Número de pratos	≥ 2000
Resolução	$> 2,0$
Pureza do pico	> 950
Desvio Padrão Relativo (DPR)%	$\leq 2,0$

Fonte: FDA (2000), ICH (2005) e BRASIL (2017).

O objetivo da validação analítica é demonstrar que um determinado procedimento é adequado para a finalidade pretendida (ICH, 2005). Os parâmetros de desempenho que devem estar descritos e avaliados no procedimento e relatório de validação são: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (AOAC, 2005; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

3.3.1 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é sua capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração (quantidade) de um analito na amostra dentro de um intervalo específico (ICH 2005; BRASIL, 2017). A análise é feita utilizando o procedimento proposto e avaliado com diluição de uma solução padrão, 5 (cinco) concentrações diferentes, no mínimo, para a construção de curvas analíticas em triplicatas (BRASIL, 2017). O ajuste linear para o analito é calculado a partir do método de mínimos quadrados ordinários, sendo a expressão resultante uma equação linear (Equação 2):

$$\text{Equação 2: } y = ax + b$$

Onde a e b são, respectivamente, os coeficientes angular e linear. Para que a regressão linear seja válida, além da relação linear entre a concentração e a área de pico, refletida no coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ter distribuição normal (aleatória), serem independentes entre si e homocedásticos (possuírem distribuição regular dentro da faixa de trabalho) (BRASIL – Guia nº 10, 2017).

A homocedasticidade pode ser avaliada no gráfico dos resíduos pela concentração, onde o comportamento esperado dos dados é uma distribuição constante em torno de zero (BRASIL – Guia nº 10, 2017; MARSON *et al.*, 2020).

3.3.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de identificar ou quantificar precisamente os analitos alvo na presença de outros componentes, como impurezas, diluentes, produtos de degradação e componentes da matriz (AOAC, 2002; DA QUALIDADE ANALÍTICA, 2011; BRASIL, 2017; WATSON, 2020). Normalmente, é avaliada comparando uma amostra padrão contendo apenas o analito e outra contendo os possíveis interferentes que provavelmente estarão presentes nas amostras (EUROCHEM, 2018; MARSON *et al.*, 2020).

Na CLAE, este parâmetro é geralmente verificado pela ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito de interesse (BONFILIO *et al.*, 2012; MARSON *et al.*, 2020). Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, é necessário fazer um estudo de degradação,

expondo a amostra a condições de ampla faixa de pH, de oxidação, de calor, de luz, entre outros fatores (BRASIL, 2017).

3.3.3 Precisão

A precisão de um procedimento analítico demonstra a proximidade dos resultados entre uma série de medições obtidas a partir de várias dosagens de uma mesma amostra homogênea nas condições prescritas (BRASIL 2003; ICH, 2005). A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (precisão inter-dia). A dispersão dos dados é demonstrada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula:

$$\text{Equação 3: } \text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (BRASIL, 2017). O valor do DPR deve estar abaixo de 2%, de acordo com preconizado pela literatura, para que o método seja considerado preciso (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004; ICH, 2005).

3.3.4 Exatidão

A exatidão é o parâmetro responsável por avaliar a concordância (o grau de aproximação) entre o resultado encontrado pelo método analítico em estudo e o valor que é aceito como verdadeiro (teórico) ou de referência. Deve ser comprovada no intervalo linear do método analítico em estudo e representa a taxa de recuperação da quantidade de analito existente na amostra preparada (ICH, 2005; DA QUALIDADE ANALÍTICA, 2011; BRASIL, 2017; MARSON *et al.*, 2020). A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível, preparadas independentemente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQRC (BRASIL, 2017).

3.3.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade de analito que pode ser detectada e identificada acima do ruído de fundo do sistema de análise, mas não necessariamente quantificada (ICH, 2005; DA QUALIDADE ANALÍTICA, 2011; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017; EUROCHEM, 2018; MARSON *et al.*, 2020; WATSON, 2020). De acordo com RDC nº 166, a determinação pode ser realizada de três formas, por meio de método visual, da razão sinal-ruído (baseado na determinação do branco, onde a razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1) ou baseada nos parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado, podendo ser calculado pela fórmula:

$$\text{Equação 4: } LD = 3,3 \times b/a$$

Onde b é a estimativa do desvio do coeficiente linear obtido e a , o coeficiente angular da curva analítica média ($y = ax + b$).

Limite de quantificação (LQ) consiste na menor concentração de um analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis ($DPR \leq 2\%$) sob as condições experimentais estabelecidas (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004; ICH, 2005; DA QUALIDADE ANALÍTICA, 2011; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017; EUROCHEM, 2018; MARSON *et al.*, 2020; WATSON, 2020). De acordo com RDC nº 166, a determinação do LQ também pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído (onde a razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 10:1) ou baseada em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado, podendo ser calculado pela fórmula:

$$\text{Equação 5: } LQ = 10 \times b/a$$

Onde b é a estimativa do desvio do coeficiente linear obtido e a , o coeficiente angular da curva analítica média ($y = ax + b$).

O LQ também pode ser determinado como a menor concentração de analito para a qual injeções em replicatas resultam em um DPR $\leq 2\%$ (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004).

3.3.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros de execução do método. É considerado um parâmetro opcional para os estudos de validação (ICH, 2005; BRASIL, 2017; WATSON, 2020). Pode ser realizada através de pequenas alterações nos fatores que influenciam o método de forma univariada (variando um fator de cada vez) ou empregando planejamentos fatoriais, como por exemplo, o planejamento de *Youden* (2002/657/EC) ou de Plackett-Burman. Segundo RDC nº 166 da Anvisa, as condições para a avaliação da robustez do método por Cromatografia Líquida são: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e vazão da fase móvel. A robustez garante a confiabilidade do método durante uma aplicação rotineira (INMETRO, 2016; BRASIL, 2017; EUROCHEM, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INGREDIENTES FARMACÊUTICOS ATIVOS, AMOSTRAS COMERCIAIS E SOLVENTES

- Bromoprida (BROP) com teor de pureza atribuída de 100,50%, lote: 8009.82, origem: Espanha;
- Digesan® 4mg/mL gotas - Laboratório Sanofi;
- Digestina® 4mg/mL gotas - Laboratório União-Qímica;
- Bromoprida Genérica 4mg/mL gotas - Laboratório Pratti-Donaduzzi;
- Bromoprida Genérica 10mg cápsulas – Laboratório Medley;
- Água ultra purificada do sistema Milli-Q Gradient da Merck-MilliporeR (Massachusetts, EUA) para preparar todas as soluções;
- Acetonitrila grau HPLC da Tedia® (Fairfield, EUA);
- Acetato de etila P.A. - A.C.S. 99,5%, CAQ – Casa da Química Ind. e Com. LTDA (Diadema, São Paulo);
- Ácido acético P.A.- ACS da Synth (Diadema, São Paulo);
- Ácido clorídrico (HCl) P.A.- ACS - Êxodo (Sumaré, São Paulo);
- Ácido fórmico - Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, RJ);
- Ácido orto-fosfórico 85% F.C.C. da Synth (Diadema, São Paulo);
- Butanol - Vetec Química Fina LTDA (Rio de Janeiro, RJ),
- Clorofórmio P.A. - ACS da Synth (Diadema, São Paulo);
- Diclorometano - ALPHATEC (São Jose dos Pinhais, PR);
- Éter etílico - Cromato Produtos Químicos LTDA (Diadema, São Paulo);
- Hexano - Cromato Produtos Químicos LTDA (Diadema, São Paulo);
- Hidróxido de amônio P.A. - ACS Synth (Diadema, São Paulo);
- Hidróxido de sódio (NaOH) - Synth (Diadema, São Paulo);
- Metanol grau HPLC - Sigma Aldrich (Missouri, EUA),
- Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% - Êxodo (Sumaré, São Paulo).

4.2 ANÁLISE QUALITATIVA

4.2.1 Substância Química de Referência Caracterizada (SQRC)

O IFA BROP com teor declarado de 100,50%, lote: 8009.82, de origem espanhola, foi adquirido do laboratório SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, a qual veio acompanhada do laudo do fornecedor, e foi utilizado sem processo adicional de purificação.

Com o intuito de empregá-lo como substância química de referência caracterizada (SQRC), devido a impossibilidade de aquisição de padrão farmacopeico, vários ensaios analíticos, como observação das características organolépticas, faixa de fusão, cromatografia em camada delgada (CCD), espectroscopia na região do IV e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), foram realizados.

4.2.1.1 Características físicas e organolépticas

O IFA adquirido foi avaliado visualmente em relação ao aspecto e cor e com auxílio de uma lupa binocular, conforme recomenda a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

Também foram observados os cristais da BROP do medicamento Genérico da Medley na apresentação de cápsulas, após a dissolução do conteúdo em ACN, a solução foi filtrada, primeiramente em papel de filtro e em seguida em filtro de seringa de nylon (FilterPro 0,22 μm), a solução foi colocada em placa de petri e levada a estufa 50°C por 24h, após a recristalização, os cristais foram observados na lupa binocular (CARRER *et al.*, 2016).

4.2.1.2 Faixa de Fusão

A faixa de fusão foi determinada no IFA, descrita no item 4.2.1, utilizando equipamento aparelho PF 1500 Gehaka® (São Paulo, Brasil). Essa análise foi realizada em triplicata, utilizando tubos capilares de 1,6 mm de espessura e 7,5 cm de comprimento. Os capilares preenchidos com 1 cm do IFA, em pó, alocado na extremidade fechada, foram aquecidos a uma taxa de aquecimento de 2,0°C por minuto até a temperatura base de 132°C, seguido por aquecimento a uma taxa de 1,0°C por minuto até a fusão completa (BRASIL, 2019).

4.2.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

No estabelecimento da metodologia de CCD, foram utilizadas amostras dos IFAs BROP, MPB e PPB. Não foi encontrado trabalho na literatura que descrevesse a técnica de CCD para o BROP, assim, a mistura de solventes usada como fase móvel foi cuidadosamente escolhida a partir de vários testes preliminares, a fim de obter a separação da bromoprida e dos conservantes.

Tabela 5 Composição das fases móveis testadas na CCD para separação da BROP, MPB e PPB.

Composição das fases móveis	
1	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (2:10:88)
2	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (2:30:68)
3	Clorofórmio: Metanol (95:5)
4	Hexano: Acetato de Etila (70:30)
5	Hexano: Acetato de Etila (80:20)
6	Hexano Acetato de Etila (60:40)
7	Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:10)
8	Hexano: Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (40:40:15:5)
9	Hexano: Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (20:60:15:5)
10	Acetato de Etila: Metanol: Água: Hidróxido de Amônio (85:15:5:10)
11	Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:15)
12	Clorofórmio: Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (20:80:20:10)
13	Hexano: Acetato de Etila: Metanol (70:30:30)
14	Hexano: Acetato de Etila: Metanol (20:85:15)
15	Metanol: Água: Ácido acético (70:30:10)
16	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (20:30:68)
17	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (20:50:48)
18	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (20:40:40)
19	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (40:20:40)
20	Clorofórmio: Butanol: Diclorometano (50:20:30)
21	Clorofórmio: Acetato de Etila: Diclorometano (50:20:30)
22	Metanol: Água: Hidróxido de Amônio (80:20:1)
23	Metanol: Água: ácido acético (70:30:1)
24	Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (75:25:10)
25	Acetato de Etila: Metanol: Água: Hidróxido de Amônio (80:15:05:10)

Fonte: próprio autor

Foram testados vinte e cinco sistemas eluentes como fases móveis, variando as combinações e proporções entre os seguintes solventes: acetato de etila, hexano, metanol, clorofórmio, diclorometano, butanol, éter etílico e

hidróxido de amônio (Tabela 5). Todos os solventes foram de grau analítico de pureza. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

As amostras, na forma de soluções na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$, diluídas em metanol, foram aplicadas nas cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄, fabricada pela Macherey-Nagel® da Alemanha com dimensões de $7,5 \times 4 \text{ cm}$. As aplicações foram feitas com auxílio de tubos capilares de vidro, sendo aplicados dois toques na cromatoplasma para cada amostra a distância de $1,0 \text{ cm}$ entre elas e a $0,7 \text{ cm}$ da borda inferior da placa, foi feita uma demarcação na parte superior para a limitação da corrida cromatográfica em 6 cm .

Para montagem da cuba de eluição foi utilizado béquer de 250 mL , as fases móveis foram preparadas nos volumes entre 10 mL e 12 mL , volume suficiente para cobrir totalmente o fundo e altura inferior às amostras aplicadas nas placas. Foi colocado papel de filtro nas paredes da cuba, com a base mergulhadas no solvente (fase móvel), para garantir que a cuba ficasse saturada com vapor de solvente e tampadas com vidro de relógio.

As cromatoplasmas foram colocadas na cuba cromatográfica na posição quase vertical, apoiada no fundo da cuba e inclinada em direção às paredes laterais. A corrida cromatográfica deu-se em aproximadamente 5 minutos, após a secagem até a completa evaporação do solvente, a detecção das zonas foi realizada sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ e } 365 \text{ nm}$) e os valores dos fatores de retenção (R_f) referentes às corridas cromatográficas das matérias-primas e das amostras comerciais foram calculadas através da Equação 1: $R_f = D_x / \Delta S$, onde D_x é a distância percorrida pelo composto (matéria-prima e/ou amostra comercial) e ΔS é a distância percorrida pelo eluente ($6,0 \text{ cm}$).

4.2.1.4 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

As análises por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos IFAs BROP, MPB e PPB foram realizadas no espectrômetro Thermo Scientific™, modelo Nicolet iS5, utilizando pastilha de brometo de potássio (KBr) como reagente. Cada espectro foi registrado na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando um software OMNIC versão 7.3

(Thermo Nicolet Analytical Instruments, Madison, WI) para registrar e operar espectros FTIR.

As análises foram realizadas homogeneizando, em gral e pistilo de ágata, cada matéria-prima isolada BROP, MPB e PPB juntamente com o reagente KBr e comprimidos em discos usando uma prensa manual. Antes de cada análise, um novo espectro do branco foi obtido com as mesmas condições instrumentais. Os perfis espectrais encontrados nas análises foram posteriormente comparados com dados descritos na literatura.

4.2.1.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)

O espectro de absorção da BROP foi registrado na faixa de 200 e 400 nm, empregando o espectrofotômetro UV/Vis Thermo Scientific™, modelo Evolution 60® (Massachusetts, EUA), operado pelo programa VISIONlite®, utilizando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A amostra foi diluída em acetonitrila e em fase móvel e os perfis espectrais obtidos foram comparados com o perfil encontrado na literatura e com o espectro obtido pelo detector de arranjo de diodos (DAD) Ultimate 3000 RS presente no cromatógrafo a líquido de alta eficiência.

4.2.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatógrafo modelo Dionex® Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) Ultimate 3000 RS e bomba Ultimate 3000, conectado a um microcomputador com software Chromeleon® 7.2.10 - Chromatography Data System, com loop fixo de 20 µL, permitiu a obtenção dos espectros de absorção na região do UV dos IFAs BROP, MPB e PPB. A bromoprida foi confirmada pela espectrofotometria de absorção na região do UV e os espectros dos excipientes MPB e PPB foram obtidos através do DAD e comparados com os perfis descritos na literatura.

As análises foram realizadas em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), empregando a coluna Inertsustain® C18 column (100 × 4,6 mm, tamanho da partícula de 3 µm), produzida pela GL Sciences (Tokyo, Japan). A eluição da BROP, MPB e PPB foram obtidas utilizando como fase móvel acetonitrila: água

(52: 48 v/v, pH 3,5, ajustado com ácido orto-fosfórico), nas concentrações de 16 µg/mL, 8 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente, e com vazão da fase móvel de 0,6 mL/min. O detector DAD foi fixado nos comprimentos de onda de 276 nm (BROP) e 256 nm (MPB e PPB).

4.2.2 Estudo de Compatibilidade Fármaco – Excipiente

O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente das misturas binárias de BROP + MPB e BROP + PPB e da mistura ternária BROP + MPB + PPB foram realizados através da técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).

Os IFAs, equipamentos e condições de análise utilizadas foram as mesmas citadas anteriormente na etapa de identificação e caracterização dos IFAs por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier.

Foram misturadas quantidades equivalentes na proporção 1:1 (m/m) de BROP e MPB, 1:1 (m/m) de BROP e PPB e 1:1:1 (m/m/m) de BROP, MPB e PPB. Posteriormente, as misturas foram homogeneizadas em gral e pistilo de ágata e comprimido em discos usando prensa manual juntamente com o reagente KBr. Antes de cada análise, um novo espectro (branco) de fundo foi obtido com as mesmas condições instrumentais. Os perfis espectrais isolados e combinados encontrados nas análises foram posteriormente comparados entre si e com dados descritos na literatura.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

4.3.1 Preparo das Soluções Padrões-estoques

Todas as soluções preparadas foram filtradas com um filtro de seringa de nylon (FilterPro 0,22 µm) antes das injeções.

4.3.1.1 Solução Padrão A e B

A Solução Padrão A, contendo 16 µg/mL de BROP, 8 µg/mL de MPB e 8 µg/mL de PPB, foi preparada pesando 10 mg de BROP e 5 mg de MPB e PPB e

dissolvendo em 50 mL de ACN obtendo uma concentração de 200,0 µg/mL de BROP e 100,0 µg/mL de MPB e de PPB. Esta primeira diluição foi *sonicada* durante 10 minutos em aparelho de ultrassom Unique® modelo UltraCleaner 1400. Uma alíquota de 2 mL foi transferida com precisão, usando uma pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 25 mL e o volume final foi completado com ACN: H₂O pH = 3,5 (50:50 v/v) e assim a concentração final foi obtida. Esta solução foi utilizada no desenvolvimento, otimização e na seletividade.

A Solução Padrão B, contendo 40 µg/mL de BROP, foi preparada pesando 10 mg de BROP e dissolvendo em 50 mL de fase móvel ACN: H₂O (52:48 v/v), pH 3,5, obtendo uma concentração de 200,0 µg/mL. Após 10 minutos de sonicação no aparelho de ultrassom Unique® modelo UltraCleaner 1400, uma alíquota de 10 mL foi transferida com precisão, usando uma pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final foi completado a mesma fase móvel e, assim obtendo uma concentração de 40,0 µg/mL (Solução B), que foi utilizada no ensaio de linearidade, no limite de quantificação e na exatidão.

4.3.1.2 Solução C

A Solução C é a solução estoque preparada a partir do medicamento comercial na forma de solução oral gotas 4 mg/mL. Esta solução foi preparada transferindo 1 mL do medicamento com pipeta volumétrica em um balão volumétrico de 25 mL, o volume foi completado com fase móvel ACN: H₂O (52:48 v/v), pH 3,5, resultando numa solução de 160 µg/mL de BROP, uma alíquota de 1,0 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Os volumes foram completados com a fase móvel até a obtenção da concentração final de 16 µg/mL de BROP. Esta solução foi utilizada na precisão, na exatidão e na aplicabilidade do método.

4.3.2 Condições Cromatográficas

O método foi desenvolvido e validado no cromatógrafo a líquido de alta eficiência Dionex® modelo Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA), descrito no item 4.2.1.6, utilizando as condições cromatográficas da Tabela 6.

Tabela 6 Condições cromatográficas para o ensaio de doseamento.

Condições	Especificação
Coluna	C18 InertSustain® (4,6 x 100 mm e 3 µm)
Vazão	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Fase Móvel	acetonitrila e água ácida (52:48, v/v) com pH 3,5
Modo	isocrático
Temperatura da coluna	Ambiente (24 ± 2°C)
Detector	UV 276 nm / DAD

Fonte: próprio autor

O pH da fase móvel foi ajustado com ácido orto-fosfórico, o comprimento de onda utilizados para detecção da BROP foi de 276 nm e o tempo de corrida foi inferior a 6 minutos.

4.3.3 Desenvolvimento e otimização do método analítico por CLAE-DAD

Diversas condições cromatográficas foram testadas para otimizar os parâmetros cromatográficos do método CLAE-DAD como tipo de coluna, composição da fase móvel, vazão da fase móvel, detecção do comprimento de onda a fim de obter um cromatograma com boa separação, resolução > 2,0, um formato de pico adequado da BROP, do MPB e do PPB com assimetria do pico ≤ 2,0, número de pratos ≥ 2000, pureza do pico > 950 e DPR ≤ 2,0%.

Para o desenvolvimento do método foram testadas duas colunas cromatográficas diferentes:

- Coluna Kinetex® C18 (100 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,6 µm), produzida pela Phenomenex Inc. (Califórnia, EUA);
- Coluna Inertsustain® C18 (100 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 3 µm), produzida por GL Sciences (Tóquio, Japão).

As fases móveis testadas foram compostas por metanol e água sem ajuste de pH, acetonitrila e água sem ajuste de pH e acetonitrila e água pH 3,5, ajustado com ácido orto-fosfórico, em diferentes proporções e diferentes vazões variando de 0,3 a 0,8 mL/min.

A solução padrão A foi injetada em cinco replicatas para cada condição a ser ajustada e a escolha da melhor condição cromatográfica foi realizada através da avaliação dos parâmetros citados acima.

4.3.4 Validação do Método

O método cromatográfico foi validado de acordo com as especificações dos guias internacionais, Internacional Conference on Harmonization (ICH, 2005) e Association of Official Analytical Chemists International (AOAC, 2005), e o guia nacional da Anvisa, Resolução nº 166 (BRASIL, 2017). Os parâmetros de desempenho analisados na validação foram: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (AOAC, 2005; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

4.3.4.1 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da obtenção da curva de calibração (área do pico x concentração do IFA). A curva de calibração foi realizada com 7 pontos, onde alíquotas de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL e 7 mL da solução Padrão B foram transferidas com precisão, usando uma bureta, para balões volumétricos de 10,0 mL e os volumes foram completados com fase móvel, obtendo as concentrações finais de BROP de 4 µg/mL, 8 µg/mL, 12 µg/mL, 16 µg/mL, 20 µg/mL, 24 µg/mL e 28 µg/mL, respectivamente. Todas as soluções foram filtradas com filtro de seringa de náilon (FilterPro 0,22 µm) antes da injeção em triplicata.

4.3.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi determinada comparando os tempos de retenção dos cromatogramas da amostra padrão (Solução Padrão A) contendo apenas os IFAs BROP, MPB e PPB com o cromatograma de uma solução de placebo contendo os excipientes metilparabeno (0,02%), propilparabeno (0,01%), edetato de sódio (0,01%) e citrato de sódio di-hidratado (0,3%), bissulfito de sódio (0,01%) e água ultrapura. As informações dos excipientes

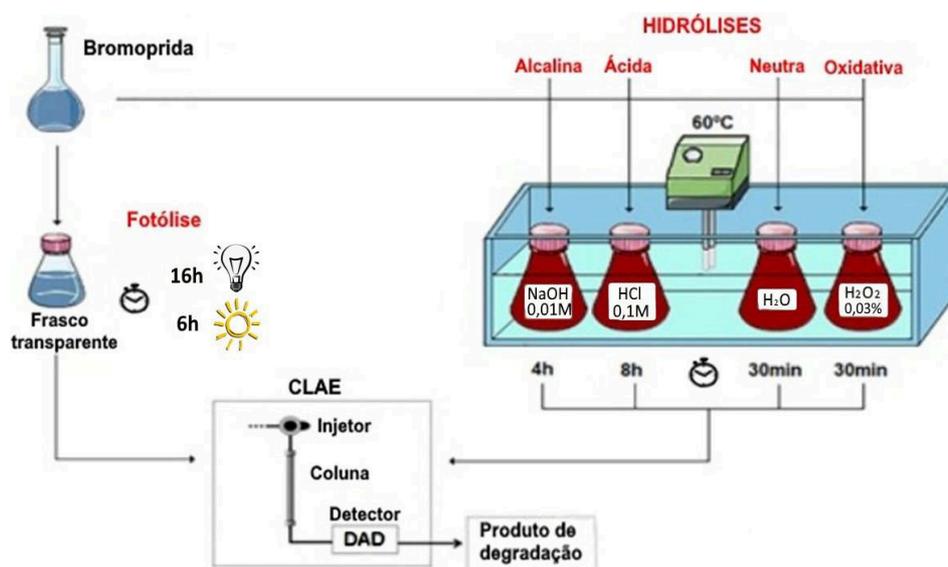
foram retiradas das bulas dos medicamentos Digesan[®] fornecidos pelo Laboratório Sanofi, Digestina[®] do Laboratório União-Química e da bromoprida genérica do Laboratório Pratti-Donaduzzi e as proporções para o preparo da solução placebo seguiu as recomendações do *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A solução placebo preparada foi injetada nas condições da metodologia desenvolvida e foi avaliada a interferência dos picos dos excipientes com o pico do IFA.

A seletividade do método por CLAE-DAD também foi analisada através da realização do estudo de degradação forçada.

4.3.4.2.1 Estudo de Degradação Forçada do IFA Isolado

O estudo de degradação forçada foi realizado com o IFA com a finalidade de verificar a formação de produtos de degradação sem interferência dos excipientes na análise. Devido à falta de informações detalhadas para as condições experimentais, foi utilizado um protocolo experimental elaborado por Sversut e colaboradores (2019) (Figura 3) com algumas adaptações que foram realizadas devido a infraestrutura do ambiente e posterior alteração com a finalidade de atingir a degradação do IFA necessária para a análise.

Figura 3 Protocolo experimental utilizado para a realização do estudo de degradação forçada.



Fonte: adaptado de Sversut e colaboradores (2019)

Foi preparada uma solução padrão de BROP 400 µg/mL, pesando 20 mg de SQRC (BROP), adicionado a um balão volumétrico de 50mL e dissolvido com acetonitrila. Em seguida, alíquotas de 10 mL dessas soluções foram adicionadas a 10 mL dos degradantes, ficando na concentração de 200 µg/mL e submetidas, separadamente, às condições de degradação descritas na Tabela 7.

Tabela 7 Condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada da BROP.

Condição de degradação	Degradante	Duração
Hidrólise alcalina ^a	NaOH 0,01 M	4 h
Hidrólise ácida ^a	HCl 0,1 M	8 h
Hidrólise neutra ^a	H ₂ O	30 min
Hidrólise oxidativa ^a	H ₂ O ₂ 0,03%	30 min
Fotólise ^b	Luz branca ^c , H ₂ O	16 h
Fotólise	Luz Solar, H ₂ O	6 h

Temperatura de exposição: ^a 60°C e ^b temperatura ambiente (24 ± 2°C); ^c lâmpada fluorescente tubular luz branca.

A partir das soluções degradadas, obtidas nos diferentes intervalos de tempo, foram transferidas, separadamente, alíquotas de 1 mL para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com fase móvel ACN: H₂O (52:48 v/v), pH 3,5, obtendo a concentração final de BROP 20 µg/mL. Essas soluções foram filtradas e injetadas em triplicata, utilizando o método por CLAE-DAD previamente desenvolvido e validado.

As soluções resultantes da hidrólise alcalina não foram neutralizadas antes da análise por CLAE, apenas diluídas com a fase móvel, devido à possível formação de precipitados de sais ou artefatos de reação secundários que podem danificar o sistema cromatográfico e alterar os resultados (BAERTSCHI; ALSANTE; REED; 2011). Já as soluções resultantes da hidrólise ácida foram neutralizadas com hidróxido de sódio, devido ao aumento da assimetria.

As porcentagens do teor do IFA foram calculadas pela equação da reta obtida a partir da curva analítica, as purezas dos picos foram observadas e o perfil espectral comparado com o perfil encontrado na literatura (FONTANA *et al*, 2010).

4.3.4.3 Precisão

A precisão do método proposto foi avaliada através da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia). A precisão intradia foi determinada analisando seis determinações em uma mesma concentração dentro da faixa de linearidade do método (16 µg/mL) por um único analista, em um único dia utilizando as mesmas condições cromatográficas do método proposto. Para esta análise foi preparada a solução C a partir da amostra comercial Digesan®. A precisão intermediária (precisão interdia) foi avaliada da mesma forma (seis replicatas), porém, foi conduzida por dois analistas diferentes, em três dias diferentes e com preparo das amostras independentes para cada análise. As precisões intra e interdia são expressas em termos de Desvio Padrão Relativo (DPR) (ICH, 2005; ANVISA, 2017).

4.3.4.4 Exatidão

A exatidão do método, com base no guia internacional da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e na ANVISA, foi determinada através da adição de quantidades conhecidas da solução padrão (preparadas a partir da Solução Padrão B) na faixa de 50, 100 e 150% da concentração da solução da amostra na concentração de 8 µg/mL (preparada pela diluição 1:2 da Solução C), a fim de obter concentrações teóricas do IFA em três níveis diferentes: baixo (12 µg/mL), médio (16 µg/mL) e alto (20 µg/mL) como mostra a Tabela 8.

As análises foram realizadas em triplicata e o percentual de recuperação (Rec) foi calculado pela comparação das concentrações teóricas e das concentrações encontradas, utilizando a equação 6 abaixo:

$$\text{Equação 6: } \text{Rec} = [(C_f - C_{nf}) / C_t] \times 100$$

Onde C_f representa a concentração do analito medida na amostra de teste fortificada; C_{nf} , a concentração do analito medida na amostra de teste não fortificada; e C_t , a concentração teórica do analito adicionado à amostra de teste fortificada (AOAC, 2016, BRASIL, 2017).

Tabela 8 Preparo das soluções para o ensaio de recuperação de BROP para avaliação da exatidão do método proposto, empregando amostra comercial^a.

Balão volumétrico	Solução padrão (µg/mL)	Solução amostra (µg/mL) ^a	Concentração teórica final (µg/mL)
Amostra	-----	8	8,0
R1	4	8	12,0
R2	8	8	16,0
R3	12	8	20,0
Padrão	8	-----	8,0

^aDigesan[®]; soluções preparadas com acetonitrila:água (52:48, v/v) pH 3,5.

4.3.4.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram determinados a partir da média das curvas de calibração padrão e foram calculados usando o desvio padrão da interceptação com o eixo X (SD) e a inclinação média da curva (α) (BRASIL, 2017). Assim, o LD e LQ foram calculados pela equação 4 e 5 demonstradas anteriormente.

O limite de quantificação (LQ) foi também realizado na prática, através da análise da repetibilidade em triplicata de amostras conhecidas e diluídas 1:2 sucessivamente a partir da Solução Padrão B de amostra padrão iniciando as dosagens com a concentração de 2 µg/mL até a menor concentração detectada mantendo o DPR < 2%.

4.3.4.6 Robustez

Para avaliação da robustez, foram realizadas pequenas variações nos parâmetros cromatográficos do método proposto, tais como a variação da proporção de acetonitrila na fase móvel (52 ± 1), pH da fase móvel ($3,50 \pm 0,1$), vazão da fase móvel ($0,6 \pm 0,01$), temperatura ambiente (24 ± 2 °C) e diferentes fabricantes de colunas com características semelhantes. As condições cromatográficas foram alteradas de forma univariada, para cada parâmetro alterado, as injeções foram realizadas em triplicata, empregando a solução C preparada a partir da amostra comercial Digesan[®], de acordo com o preconizado pela ANVISA (2017).

Os parâmetros cromatográficos analisados foram área do pico, tempo de retenção e fator de assimetria que foram avaliados através do cálculo do DPR para cada triplicata de injeções em cada alteração de parâmetro do método (BRASIL, 2017).

4.3.5 Aplicabilidade do Método

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido para a quantificação do IFA BROP foram analisados os seguintes medicamentos na forma de solução oral gotas: Digesan[®], Bromoprida Genérica marca Pratti-Donaduzi e Digestina[®]. Para isso, as soluções C das amostras comerciais foram injetadas em triplicada usando as mesmas condições do método desenvolvido e o teor foi determinado através da equação da reta da curva de calibração.

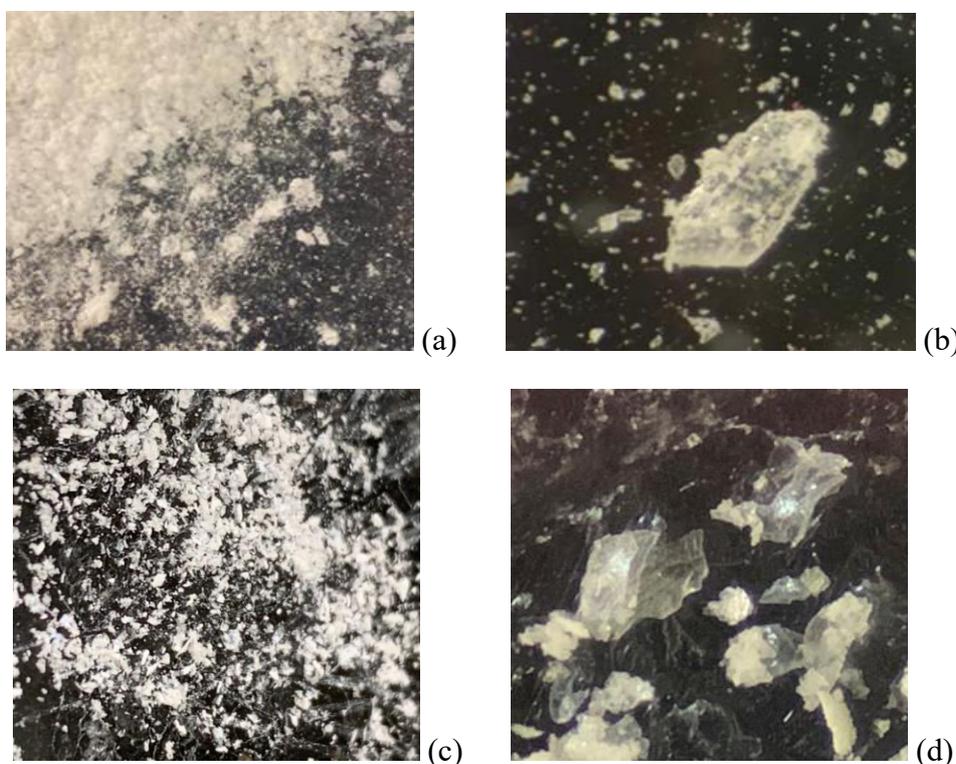
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA CARACTERIZADA (SQRC)

5.1.1 Características físicas e organolépticas

A BROP apresentou-se sob a forma de pó cristalino branco, a observação foi realizada com uso de uma lupa binocular (Figura 4).

Figura 4 Cristais de Bromoprida padrão em aumento de 10x (a) e 40x (b) e cristais de bromoprida recristalizado após diluição em ACN em aumento de 10x (c) e 40x (d), foto visualizada na lupa binocular Olympus.



Fonte: próprio autor.

As características observadas no IFA de BROP e nos comprimidos, após recristalização, são condizentes com àquelas relatadas pela Farmacopeia Brasileira (2019), porém apresentaram diferenças visualmente significativas na sua estrutura, podendo indicar a presença de polimorfismo. Este fato também foi relatado por Carrer e colaboradores (2016) onde observaram alterações na morfologia dos cristais de bromoprida após recristalização devido à diferença

nas taxas de resfriamento e quando diferentes solventes foram usados nas mesmas taxas de resfriamento, comprovando, assim, a existência de polimorfismo na bromoprida.

5.1.2 Faixa de Fusão

O valor da temperatura da faixa de fusão teórica encontrada na Farmacopeia Brasileira (2019) varia de 151°C a 155°C, o valor experimental encontrado foi de 153,1°C \pm 0,3°C (média da triplicata). No certificado de análise do IFA da SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA, o ponto de fusão declarado como referência é o mesmo da farmacopeia e o valor encontrado foi de 153,4°C, estando dentro da faixa esperada com resultado semelhante ao que foi encontrado neste estudo.

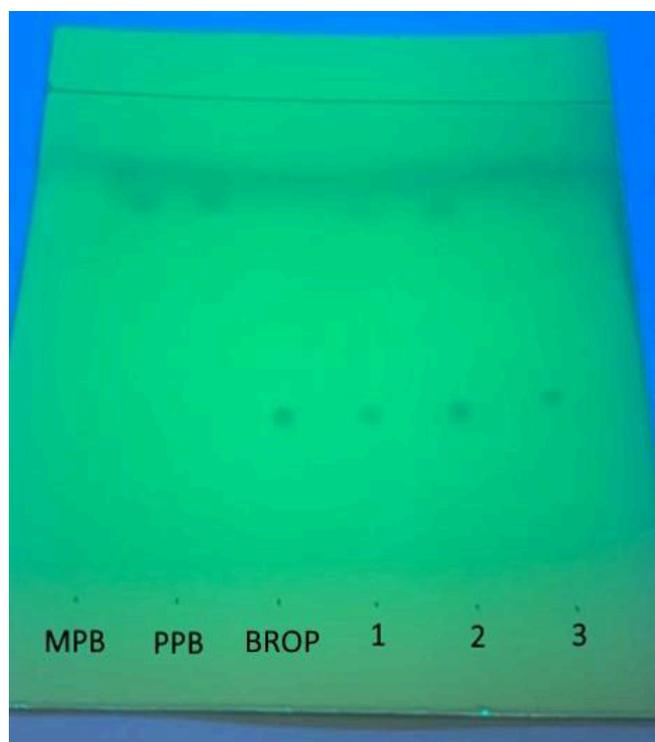
5.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram testados vários sistemas solventes e elegeu-se o melhor tanto para a identificação da BROP, separação dos conservantes MPB e PPB, formato da mancha visualizada na revelação (que não ficasse disforme) e valor de R_f, que permitisse a detecção de possíveis contaminantes através do aparecimento de outras manchas ao longo da distância percorrida.

Nos sistemas 1 a 6, 13, 14, 16 a 21 não houve migração do IFA BROP, ficando retido no ponto de aplicação. Nos sistemas 10 e 23, a amostra migrou, mas não de modo homogêneo, ficando com a mancha arrastada, nos sistemas 11, 15, 22 e 24, a BROP ficou com R_f bom, porém o MPB e PPB, não tiveram interação com a placa e foram carregados pelo solvente até o final da corrida. No sistema 8 e 9, houve pequena migração com R_f menor que 0,2, o sistema 25 ficou bom, porém o sistema 7 obteve R_f um pouco melhor e este foi o sistema que apresentou as melhores condições cromatográficas.

A Figura 5 mostra a fotografia do cromatograma da BROP SQRC, dos excipientes e das amostras comerciais no solvente do sistema 7.

Figura 5 Cromatoplaca dos compostos: metilparabeno (MPB), propilparabeno (PPB), Bromoprida (BROP), Digesan[®] (1), Bromoprida genérica marca Pratti-Donaduzi (2) e Digestina[®] (3), desenvolvida com o sistema eluente Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:10).



Fonte: próprio autor

As análises em CCD permitiram a identificação preliminar do IFA BROP e dos conservantes MPB e PPB, através da comparação das manchas obtidas das amostras comerciais com os IFAs, apresentando mesma posição, cor e intensidade. Os valores dos fatores de retenção (Rf) estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Condição escolhida para realização da CCD da BROP, MPB e PPB com resultados de Rf (Fator de Retenção).

IFAs	Fase estacionária	Fase móvel	Revelação	Rf
BROP		Acetato de Etila: Metanol:		0,33
MPB	Sílica gel F ₂₅₄	Hidróxido de Amônio (85:15:10 v/v/v)	Luz UV (254 nm)	0,80
PPB		(Bakke & Segura, 1976)		0,80

Fonte: próprio autor

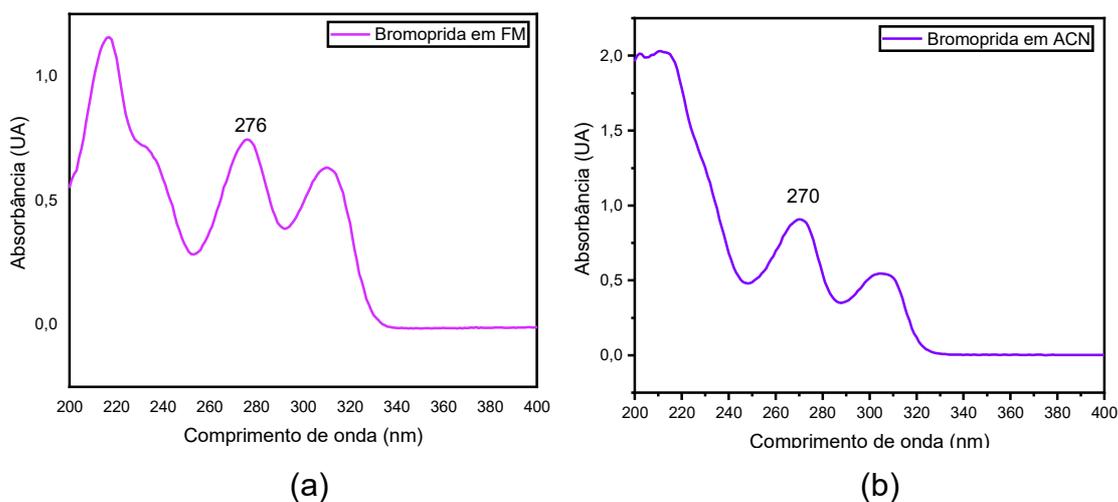
Na literatura não foram encontrados trabalhos utilizando CCD para BROP, foi encontrado um trabalho de Bakke & Segura (1976) que utilizou o Sistema 7 de solventes para identificação da metoclopramida e este foi reproduzido com sucesso neste trabalho.

A CCD apresenta-se como uma importante ferramenta para caracterização da maioria das moléculas farmacêuticas. É um método de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. O método desenvolvido demonstrou ser adequado para a identificação de Bromoprida na forma farmacêutica de solução oral gotas, e o melhor sistema desenvolvido e adequado para identificação de produtos de degradação foi o sistema 7 composto por Acetato de Etila: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:10 v/v/v).

5.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV)

Foi utilizada a solução de BROP 16 µg/mL diluída em fase móvel (acetonitrila: água ácida - 52:48, v/v, pH 3,5) e em acetonitrila. Os espectros de absorção foram registrados na faixa de 200 e 400 nm (figura 6(a) e 6(b)). Os perfis espectrais obtidos foram comparados com os perfis encontrados na literatura e os obtidos no DAD.

Figuras 6(a) e 6(b) Espectro experimental de absorção na região do UV do IFA bromoprida na concentração de 16,0 µg/mL diluída em (a) fase móvel (acetonitrila: água ácida - 52:48 v/v, pH 3,5) e (b) acetonitrila.



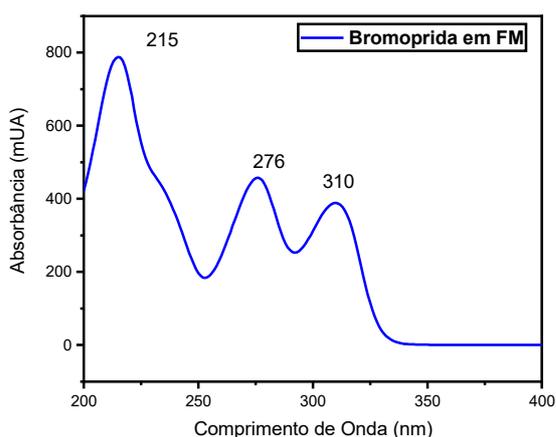
Fonte: espectrofotômetro UV/Vis Thermo Scientific™, modelo Evolution 60® (Massachusetts, EUA), operado pelo programa VISIONlite®, dados trabalhados no Origin 2019b.

5.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

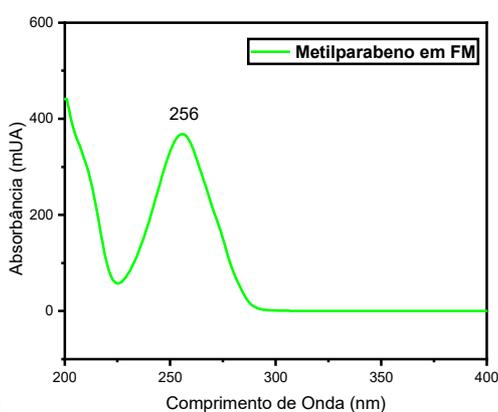
IFAs podem ser identificados através da análise de seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm) obtidos pelo DAD da CLAE, que apesar de ser frequentemente aplicado para separação de misturas e para análise quantitativa, pode ser muito útil na identificação, pela comparação dos espectros fornecidos pelo DAD com os espectros de referências bibliográficas.

Os espectros no UV dos IFAs em estudo, obtidos através do DAD durante a análise pela CLAE, podem ser visualizados nas Figuras 7(a), 7(b) e 7(c).

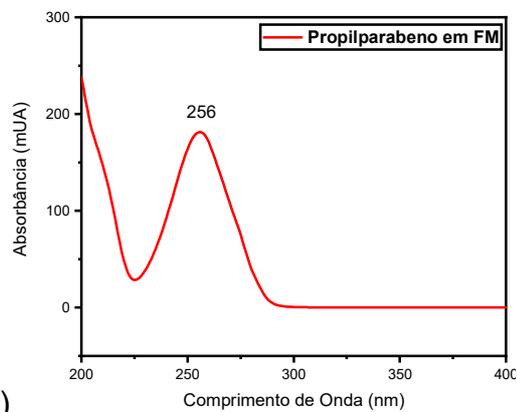
Figura 7(a), 7(b) e 7(c) Espectros de absorção na região do UV dos IFAs BROP, MPB e PPB, obtidos através do DAD durante a análise pela CLAE, nas concentrações de 16 µg/ mL, 8 µg/ mL e 8 µg/ mL, respectivamente, utilizando como fase móvel acetoneitrila: água ácida (52:48 v/v, pH 3,5 e vazão de 0,6 mL/min), coluna Inertsustain® C18.



7(a)



7(b)



7(c)

Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

A BROP, na Figura 7(a), apresentou absorvâncias em 215 nm, 276 e 310 nm. Este espectro obtido pelo DAD ficou bem semelhante ao obtido pelo espectrofotômetro da Figura 6(a). A banda em 215 nm não foi considerada para análise de determinação do analito pelo fato de solventes absorverem neste comprimento de onda e a banda em 276 nm foi a escolhida para a realização das análises. O comprimento de onda de 310 nm não foi escolhido devido à ausência de absorção UV do MPB e PPB neste comprimento, dificultando a visualização da separação da BROP e dos conservantes durante a análise. Perfil espectral similar foi observado no estudo de Fontana e colaboradores (2010) com absorvâncias máximas em torno de 216 nm, 275 e 310 nm, utilizando padrão, soluções orais e injetáveis de BROP com concentração de 15 µg/mL diluídas com HCl 0,1 M, e espectrofotômetro Shimadzu UV 1601 PC (Kyoto, Japão) equipado com células de quartzo de 1 cm com detecção em 310 nm.

O perfil do espectro na região do ultravioleta do MPB e do PPB são idênticos, com absorvância máxima em 256 nm, pois ambas as moléculas possuem os mesmos cromóforos, a carboxila e o anel aromático.

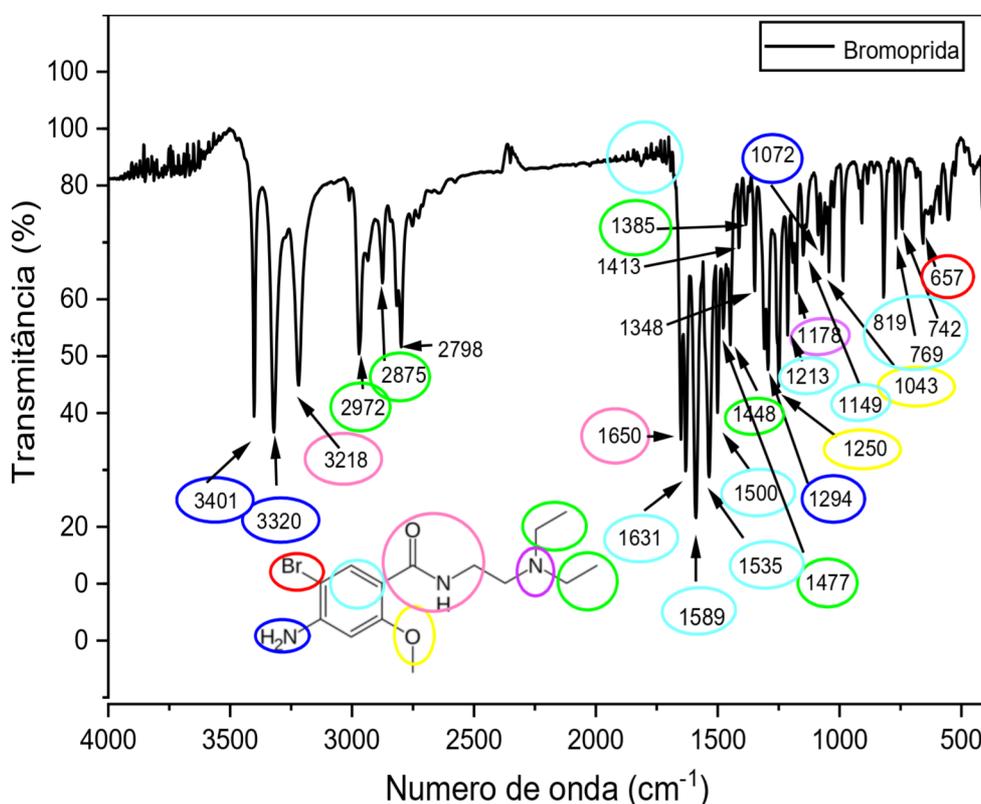
5.1.6 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

5.1.5.1 Bromoprida

O espectro da bromoprida (Figura 8) foi construído a partir das bandas dos grupos funcionais descritos na literatura e comparado com o espectro de sua análoga metoclopramida, uma vez que o espectro da bromoprida não foi encontrado nas bibliografias pesquisadas. A presença de bandas, onde ν = vibrações de estiramento e δ = vibrações de dobramento, de absorção em 1650 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) associada a banda de absorção em 3218 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$) é indicativa da presença da função amida secundária. A combinação das bandas de absorção em 3401 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$), 3320 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$) assimétrica e 1072 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$) permite confirmar a amina primária, em 1294 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$) confirma a amina aromática primária e em 1178 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$) a presença de uma amina terciária. A absorção em 2972 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ assimétrico e a absorção em 2875 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ simétrico indica a presença de um grupo

metil. As absorções em 1631, 1589, 1535 e 1500 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{C}$, ArH) e 1213 e 1149 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, ArH) dentro do plano do anel aromático, 819, 769 e 742 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, ArH) fora do plano do anel aromático confirmam a presença de estrutura aromática. A absorção em 1250 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{C}$, ArH) assimétrica e 1043 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{C}$, ArH) simétrica indica a presença da função éter ligada ao anel aromático e, finalmente, a banda 657 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{Br}$) identifica a presença do halogênio bromo na molécula (Tabela 10) (LOPES, 2004; COATES, 2006; PAVIA, 2016; NANDIYANTO 2019).

Figura 8 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA bromoprida (BROP), em pastilhas de KBr.



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Tabela 10 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de BRP.

Número de onda teórica (cm ⁻¹)	Nº de onda encontrado (cm ⁻¹)	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
3600 - 3200	3401	ν , F	N – H (Amina primária)	Lopes, 2004
3400 - 3380	3320	ν ass, F	N – H (Amina primária)	Lopes, 2004
3500 - 3070	3218	ν , F	N – H (amida secundária)	Lopes, 2004
2970 - 2950	2972	ν ass, m-F	CH ₃	Nandiyanto, 2019
2880 - 2860	2875	ν sym, m-F	CH ₃	Coates, 2006 Nandiyanto, 2019
2000 - 1660	Várias bandas	ν , f Combinações e harmônicas	C = C (anel aromático)	Nandiyanto, 2019 Lopes, 2004 Pavia, 2016
1820 - 1630	1650	ν , F	C = O (amida)	Lopes, 2004
1680 - 1630				Coates, 2006
2 a 4 bandas ~1600, 1580, 1500, 1450	1631 1589 1535 1500	ν , m-F	C = C (anel aromático)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
1615 - 1580 1510 - 1450				Nandiyanto, 2019
~1465	1477	δ tes, m	C – H (CH ₂ no plano)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
1485 - 1445		δ sym, m		Nandiyanto, 2019
1470 - 1430	1448	δ ass, m	CH ₃ no plano	Nandiyanto, 2019
~1450				Lopes, 2004 Pavia, 2016
1380 - 1370	1385	δ sym, f-m	CH ₃ no plano	Nandiyanto, 2019
1375				Pavia, 2016
1340 - 1250	1294	ν , f	C - N (amina primária aromática)	Nandiyanto, 2019
1270 - 1230	1250	ν ass, F	C – O – C (éter aromático)	Coates, 2006
1210 - 1150	1178	ν , f	C – N (amina terciária)	Lopes, 2004 Coates, 2006 Nandiyanto, 2019
1225 - 950	1213 1149	δ , m-F	C-H (anel aromático) dentro do plano	Nandiyanto, 2019
1150 - 1050	1043	ν sym, m-F	C – O – C (éter aromático)	Coates, 2006
1090 - 1020	1072	ν , f	C – N (amina primária)	Coates, 2006

Continua

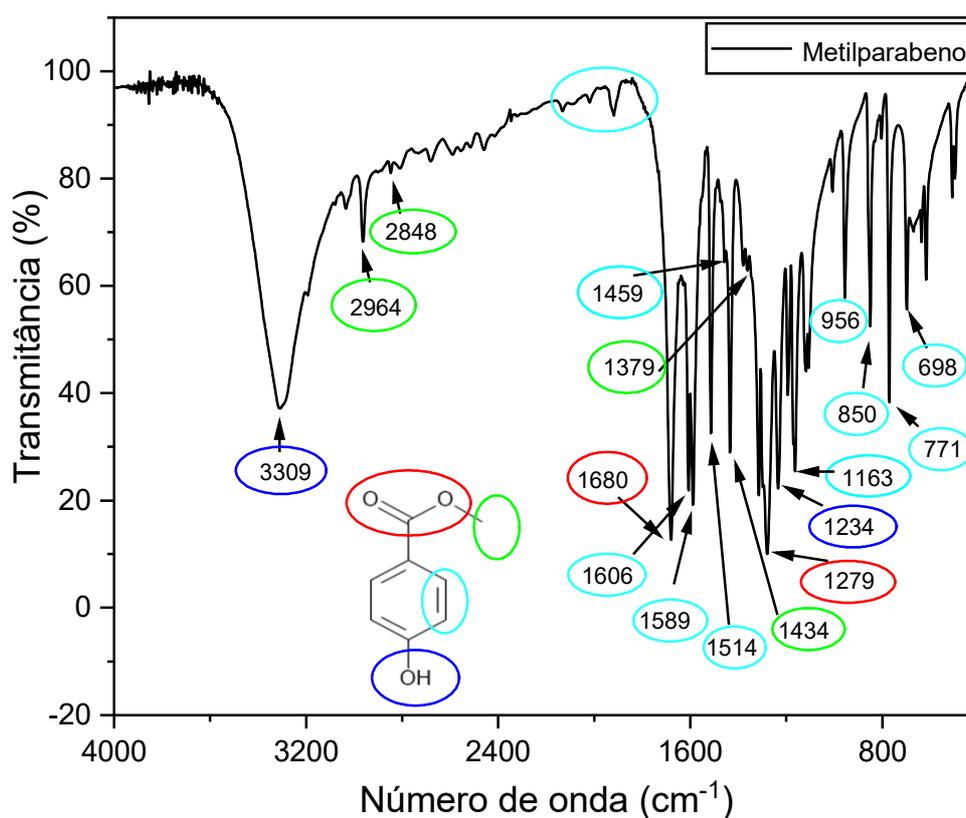
Número de onda teórica (cm ⁻¹)	Nº de onda encontrado (cm ⁻¹)	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
900 - 670	819	δ, f-m	= C – H (anel aromático) fora do plano	Nandiyanto, 2019
860 - 800	769			Lopes, 2004 Nandiyanto, 2019
700 - 600	657	δ, f-m	C – Br (halogênio)	Nandiyanto, 2019 Coates, 2006

v = estiramento, δ= dobramento, ass= assimétrico, sym= simétrico, tes= tesoura, f= fraca, m= média, F=forte

Fonte: próprio autor, dados do Espectrômetro Thermo Scientific™.

5.1.5.2 Metilparabeno

Figura 9 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA Metilparabeno (MPB), em pastilhas de KBr.



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

O espectro infravermelho do Metilparabeno (Figura 9) obtido coincidiu com o encontrado no trabalho de LOPES (2004). Ambos foram constituídos por

bandas características, sendo a presença de banda de absorção a 1680 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) associado à absorção em 1279 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$) é indicativo da função éster. A presença de banda de absorção em 3309 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{H}$) e em 1234 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{O}$) permite confirmar a função fenólica. A absorção em 2964 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H}$ assimétrico e a absorção em 2848 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H}$ simétrico indica a presença de um grupo metil. As absorções em 1606 , 1589 , 1514 e 1459 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{C}$, ArH) e 1163 e 956 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, ArH) (δ = vibrações de dobramento) dentro do plano do anel aromático, 850 e 771 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, ArH) fora do plano do anel aromático confirmam a presença de estrutura aromática. A absorção a 850 cm^{-1} ($\delta\text{C}-\text{H}$, ArH) indica o padrão 1,4-dissubstituído (Tabela 11) (LOPES, 2004; COATES, 2006; PAVIA, 2016; NANDIYANTO 2019).

Tabela 11 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de MPB.

Número de onda teórica (cm^{-1})	Nº de onda encontrado (cm^{-1})	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
3650 - 3100	3309	ν , F	O – H (fenol) Banda larga	Lopes, 2004
2970 - 2950	2964	ν ass, m-F	CH_3	Nandiyanto, 2019
2880 - 2860	2848	ν sym, m-F	CH_3	Coates, 2006 Nandiyanto, 2019
2000 - 1660	Várias bandas	ν , f Combinações e harmônicas	C = C (anel aromático para-substituído)	Nandiyanto, 2019 Lopes, 2004 Pavia, 2016
1750 - 1630	1680	ν , F	C = O (éster)	Lopes, 2004
2 a 4 bandas ~ 1600, 580, 1500, 1450	1606 1589 1514	ν , m-F	C = C (anel aromático)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
1615 - 1580 1510 - 1450	1459			Nandiyanto, 2019
1470 - 1430	1434	δ ass, m	CH_3 no plano	Nandiyanto, 2019
~1450				Lopes, 2004 Pavia, 2016
1380 - 1370 1375	1379	δ sym, f-m	CH_3 no plano	Nandiyanto, 2019 Pavia, 2016
1300 - 1000	1279	ν , F	C – O (éster)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
~1200	1234	ν , F	C – O (fenol)	Coates, 2006 Nandiyanto, 2019

Continua

Conclusão

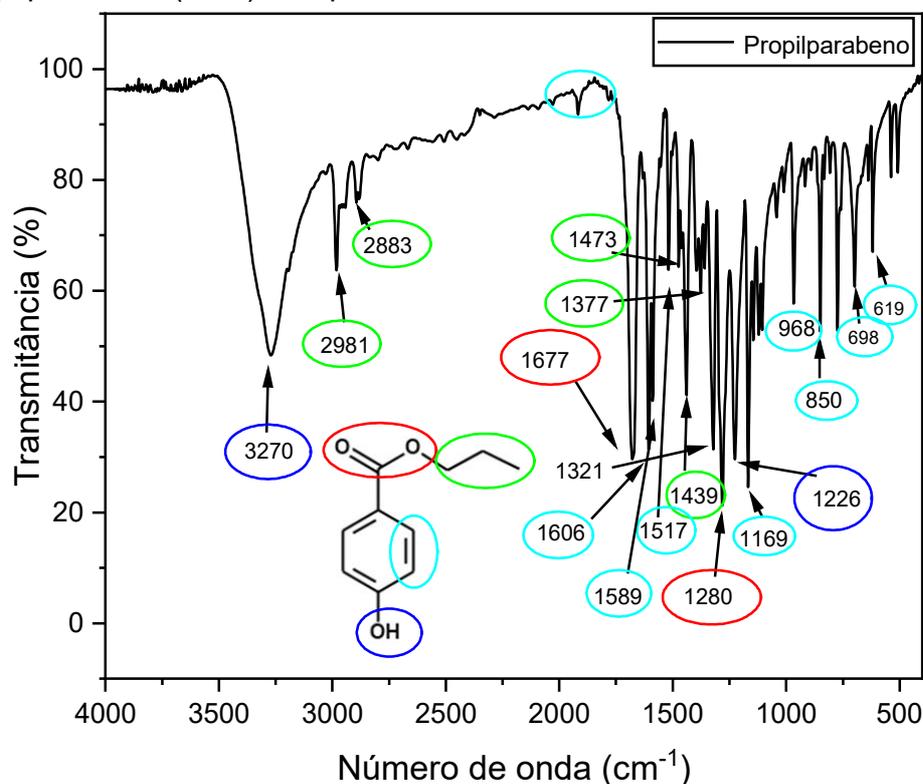
Número de onda teórica (cm ⁻¹)	Nº de onda encontrado (cm ⁻¹)	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
1225 - 950	1163 956	δ, m-F	C – H (anel aromático) dentro do plano	Nandiyanto, 2019
900 - 670	850 771	δ, F	C – H (anel aromático) fora do plano	Nandiyanto, 2019 Pavia, 2016
860 - 800			Banda forte em aromáticos para-substituído	Lopes, 2004 Nandiyanto, 2019
700 - 550	698	δ, m	C=C de anel aromático fora do plano	Pavia, 2016

v = estiramento, δ= dobramento, ass= assimétrico, sym= simétrico, tes= tesoura, f= fraca, m= média, F=forte

Fonte: próprio autor, dados do Espectrômetro Thermo Scientific™.

5.1.5.3 Propilparabeno

Figura 10 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR do IFA Propilparabeno (PPB), em pastilhas de KBr.



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

O espectro infravermelho do Propilparabeno (Figura 10) coincidiu com o obtido na literatura (Chemical Book, 2021). O propilparabeno e o metilparabeno possuem praticamente as mesmas bandas, pois suas estruturas químicas são muito semelhantes. A presença de uma banda de absorção em 1677 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$) associada a outra banda de absorção em 1280 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$) é indicativa da função éster. A combinação das bandas de absorção a 3270 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$) e a 1226 cm^{-1} ($\nu\text{C-O}$) confirma a função do fenol. A absorção em 2981 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ assimétrico e a absorção em 2883 cm^{-1} é característica de $\nu\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ simétrico. As absorções em 1606 , 1589 e 1517 cm^{-1} ($\nu\text{C=C}$, ArH) e 1169 e 968 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$, ArH) dentro do plano do anel aromático, 850 e 619 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$, ArH) fora do plano do anel aromático confirmam a presença de estrutura aromática. A absorção em 850 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$, ArH) também indica o padrão 1,4-dissubstituído (Tabela 12) (LOPES, 2004; COATES, 2006; PAVIA, 2016; NANDIYANTO 2019).

Tabela 12 Principais bandas de absorção características encontradas no espectro IV de PPB.

Número de onda teórica (cm^{-1})	Nº de onda encontrado (cm^{-1})	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
3650 - 3100	3270	ν , F	O-H (fenol) Banda larga	Lopes, 2004
2970 - 2950	2981	ν ass, m-F	CH_3	Nandiyanto, 2019
2880 - 2860	2883	ν sym, m-F	CH_3	Coates, 2006 Nandiyanto, 2019
2000 - 1660	Várias bandas	ν , f Combinações e harmônicas	C = C (anel aromático para-substituído)	Nandiyanto, 2019 Lopes, 2004 Pavia, 2016
1750 - 1630	1677	ν , F	C = O (éster)	Lopes, 2004
2 a 4 bandas ~ 1600, 580, 1500, 1450	1606 1589 1517	ν , m-F	C = C (anel aromático)	Lopes, 2004 Pavia, 2016 Nandiyanto, 2019
~1465	1473	δ tes, m	C – H (CH_2 no plano)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
1485 - 1445		δ sym, m		Nandiyanto, 2019
1470 - 1430	1439	δ ass, m	CH_3 no plano	Nandiyanto, 2019 Lopes, 2004 Pavia, 2016
~1450				

Continua

Número de onda teórica (cm ⁻¹)	Nº de onda encontrado (cm ⁻¹)	Tipo de vibração/ Intensidade da banda	Grupo funcional - estrutura relacionada	Referências
1380 - 1370 1375	1377	δ sym, f-m	CH ₃ no plano	Nandiyanto, 2019 Pavia, 2016
1300 - 1000	1280	ν, F	C – O (éster)	Lopes, 2004 Pavia, 2016
~ 1200	1226	ν, F	C – O (fenol)	Pavia, 2016 Coates, 2006 Nandiyanto, 2019
1225 - 950	1169 968	δ, f-m	C – H (anel aromático) dentro do plano	Nandiyanto, 2019
900 - 670	850 619	δ, F	C – H (anel aromático) fora do plano	Nandiyanto, 2019 Pavia, 2016
860 - 800			Banda forte em aromáticos para-substituído	Lopes, 2004 Nandiyanto, 2019
700 - 550	698	δ, m	C=C (anel aromático) fora do plano	Pavia, 2016

ν = estiramento, δ= dobramento, ass= assimétrico, sym= simétrico, tes= tesoura, f= fraca, m= média, F=forte

Fonte: próprio autor, dados do Espectrômetro Thermo Scientific™.

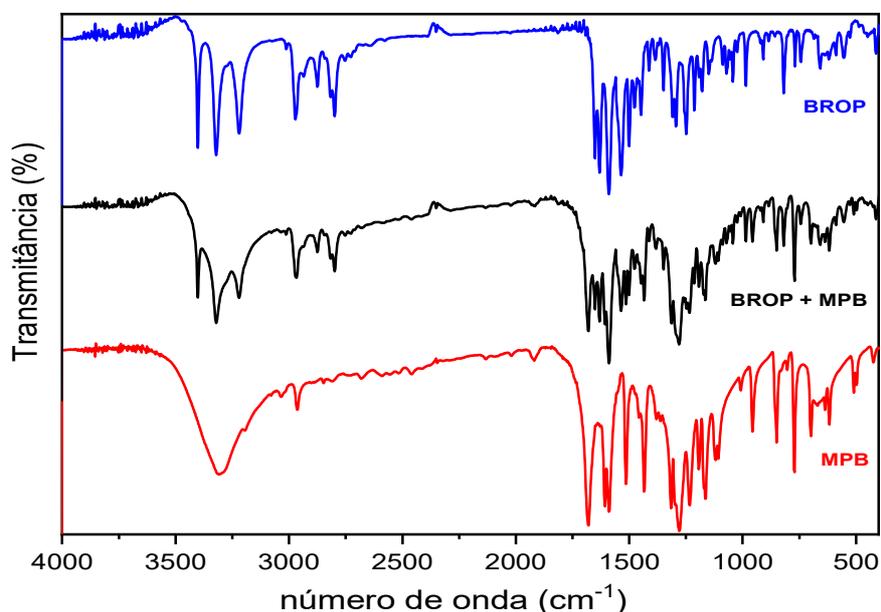
Este método tem fundamental importância para ensaios de identificação, pois o espectro de infravermelho é específico para determinar vibrações moleculares específicas contidas na amostra, originando bandas de absorção em frequências características de acordo com os grupos funcionais e ligações presentes na amostra. As bandas encontradas na análise por espectroscopia no infravermelho dos IFAs BROP, MPB e PPB estão em concordância com os espectros encontrados na literatura, permitindo uma identificação complementar destes componentes.

5.2 COMPATIBILIDADE FÁRMACO-EXCIPIENTE DA MISTURA SÓLIDA DE BROP, MPB e PPB

5.2.1 Análise por IV da mistura binária sólida de BROP e MPB

A Figura 11 representa o espectro de absorção na região do IV por transformada de Fourier (FTIR) de BROP, MPB e da mistura binária BROP + MPB.

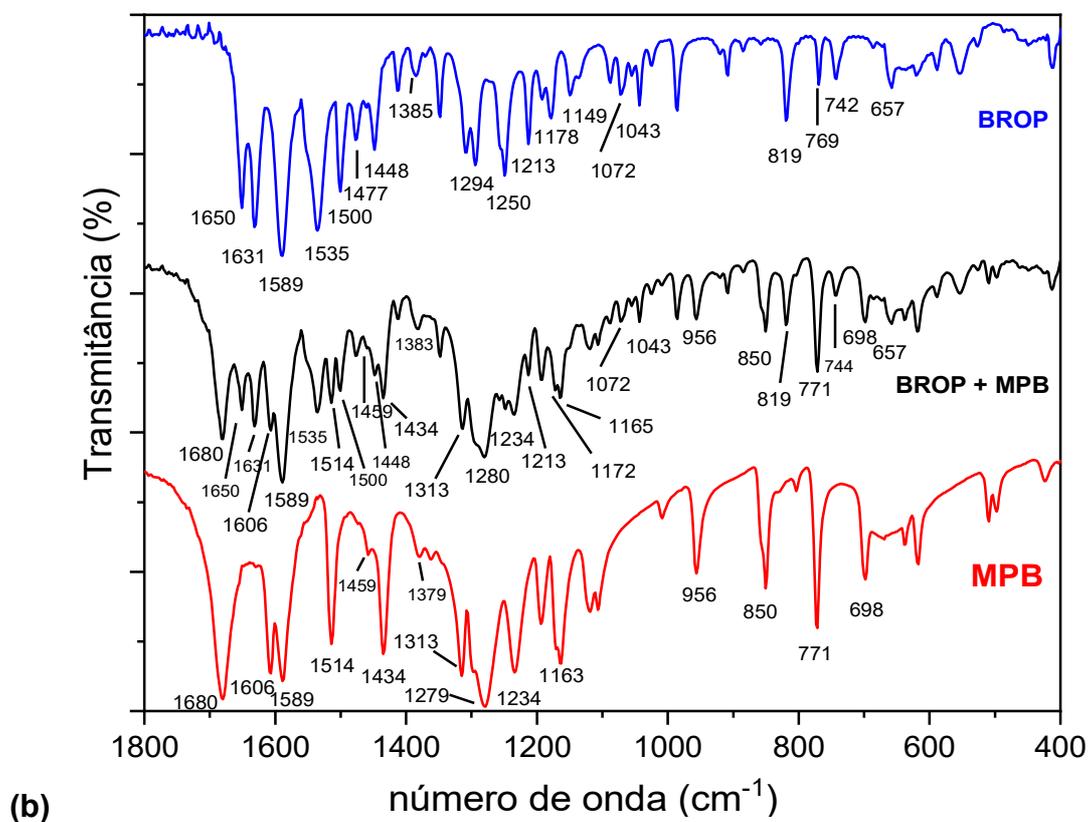
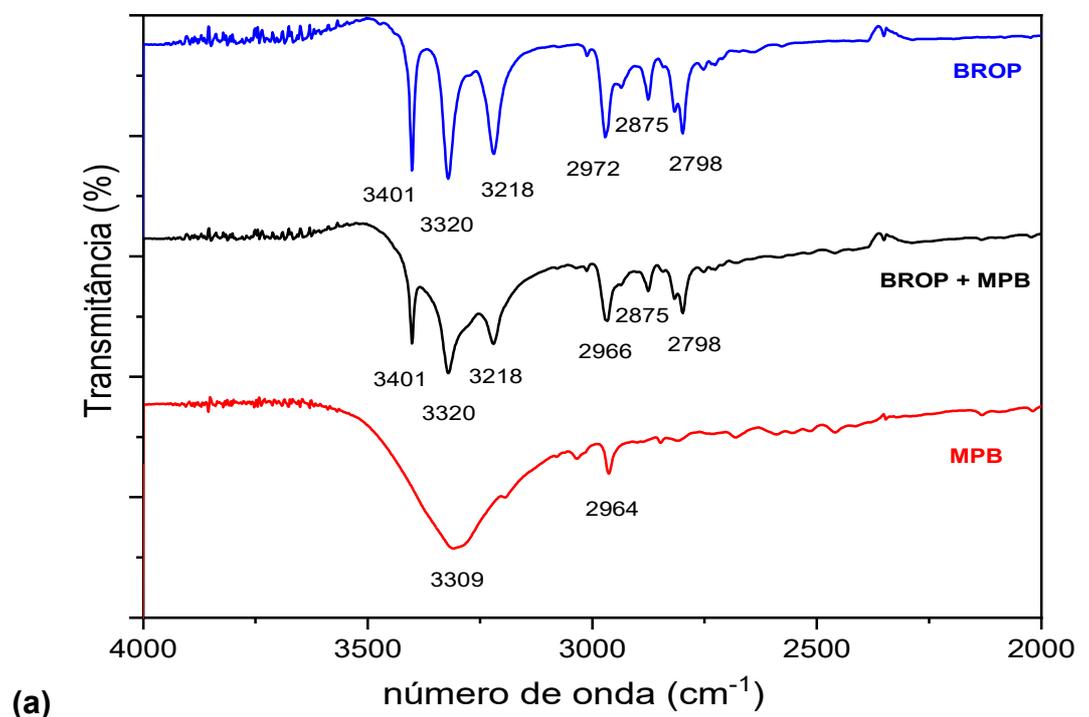
Figura 11 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, MPB e BROP + MPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para analisar as bandas e as prováveis interações o espectro foi dividido de 4000 a 2000 cm^{-1} e de 2000 a 400 cm^{-1} , conforme pode ser visto nas Figuras 12(a) e 12(b).

Figura 12(a) e 12(b) Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, MPB e BROP + MPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-2000 cm^{-1} e (b) número de onda 1800-400 cm^{-1} .



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para a mistura BROP + MPB, os espectros de FTIR podem ser analisados pela sobreposição dos espectros individuais com algumas modificações na intensidade e posição das bandas como pode ser observado na Tabela 13. Na análise do espectro de FTIR de BROP comparando com a mistura BROP + MPB, pequenos deslocamentos são notados nas bandas correspondentes à amina aromática primária, ao grupo metil e as bandas do anel aromático, houve o desaparecimento de uma banda referente ao éter aromático devido a sobreposição de bandas do fenol do MPB e da banda de dobramento do C-H do anel aromático dentro do plano, além de encurtamento das bandas relacionadas ao anel aromático. No espectro de FTIR da MPB comparando com a mistura binária, pequenos deslocamentos são notados nas bandas correspondentes ao éster e nas bandas do anel aromático, houve encurtamento das bandas relacionadas ao éster do anel aromático e às bandas de dobramento do anel aromático dentro e fora do plano e não mostra nenhum desaparecimento dos picos característicos.

Tabela 13 Bandas de absorção no espectro IV de BROP e MPB que apresentaram alterações após mistura física utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

BROP ^a	MPB ^a	BROP + MPB ^a	Evento Observado
3401	---	3401	Sobreposição da banda N-H da amina primária aromática da BROP com O-H do fenol do MPB
3320	3309	3320	Sobreposição da banda N-H da amina primária aromática da BROP com O-H do fenol do MPB
3218	---	3220	Sobreposição da banda N-H da amida secundária da BROP com O-H do fenol do MPB
2972	2964	2966	Sobreposição e pequeno deslocamento das bandas ν ass da CH_3 da BROP e da MPB
2875	---	2875	Pequeno encurtamento bandas ν ass da CH_3 da BROP
	1680	1680	Encurtamento da banda de ν C=O do éster do MPB
1650		1650	Sobreposição da banda ν C=O da amida secundária da BROP
1631		1631	Sobreposição da banda ν C=C do ArH
1589	1589	1589	Sobreposição da banda ν C=C do ArH

Continua

BROP ^a	MPB ^a	BROP + MPB ^a	Evento Observado
1535		1535	Encurtamento da banda ν C=C do ArH na mistura BROP + MPB
	1514	1514	
1500		1500	
	1459	1459	
1448		1448	Encurtamento da banda δ ass CH ₃ no plano do MPB
	1434	1434	
1385	1379	1383	Sobreposição de banda e pequeno deslocamento do pico δ sym CH ₃ no plano da BROP e do MPB
	1313	1313	Sobreposição da banda ν C–O do éster do MPB sem alteração
1294	1279	1280	Sobreposição da banda e pequeno deslocamento do pico ν C–N da amina primária aromática da BROP, com a banda ν C–O do éster do MPB
1250	1234	1234	Desaparecimento aparente do pico 1250 ν sym C–O do éter aromático da BROP devido a sobreposição do pico ν C–O do fenol do MPB
1213		1213	Pequeno encurtamento do pico δ C–H do anel aromático dentro do plano
1178		1172	Pequeno deslocamento do pico ν C–N da amina terciária
	1163	1165	Encurtamento e pequeno deslocamento do pico δ C–H do anel aromático dentro do plano do MPB
1149		NA	Desaparecimento do pico δ C–H do anel aromático dentro do plano da BROP
1072		1072	Encurtamento do pico ν sym C–N da amina primária da BROP
1043		1043	Encurtamento da banda ν C–O–C do éter aromático
	956	956	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH dentro do plano
	850	850	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH fora do plano
819		819	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH fora do plano
769	771	771	Sobreposição de banda e pequeno deslocamento do pico δ C–H do ArH fora do plano da BROP e do MPB
742		744	Pequeno deslocamento de pico δ C–H do ArH fora do plano
	698	698	Encurtamento do pico δ C=C do ArH fora do plano
657		657	Pico δ C – Br (halogênio) sem alteração

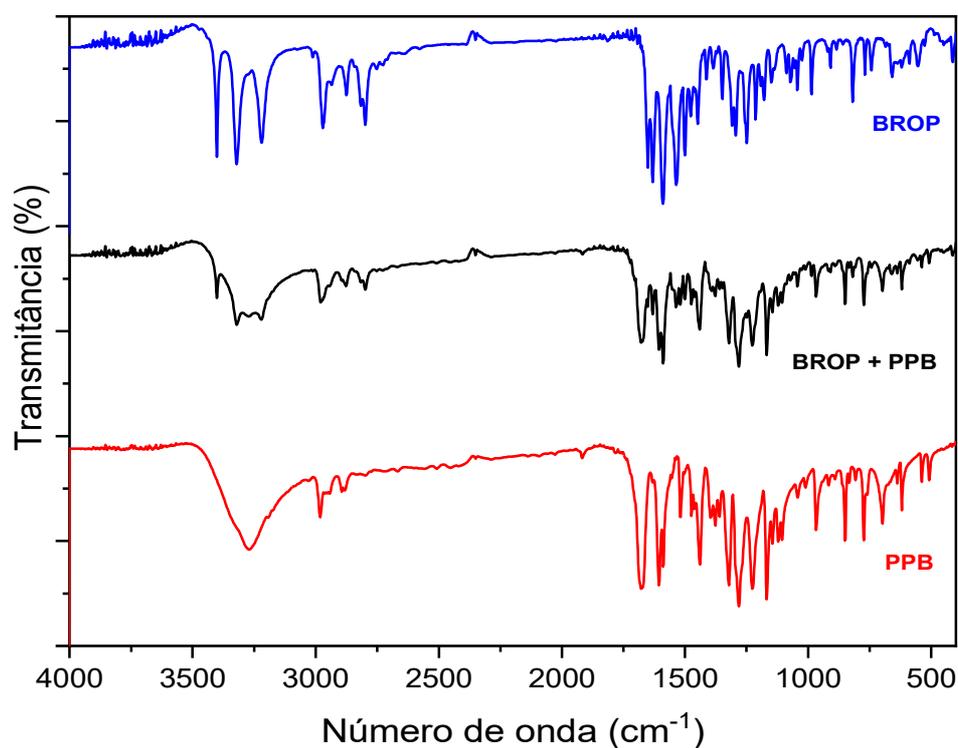
^a Número de onda (cm⁻¹), ν = estiramento, δ = dobramento, ass= assimétrico, sym= simétrico, ArH = anel aromático.

Fonte: próprio autor, dados do Espectrômetro Thermo Scientific™.

5.2.2 Análise por IV da mistura binária sólida de BROP e PPB

A Figura 13 representa o espectro de absorção na região do IV por transformada de Fourier (FTIR) de BROP, PPB e da mistura binária BROP + PPB com pastilha de KBr.

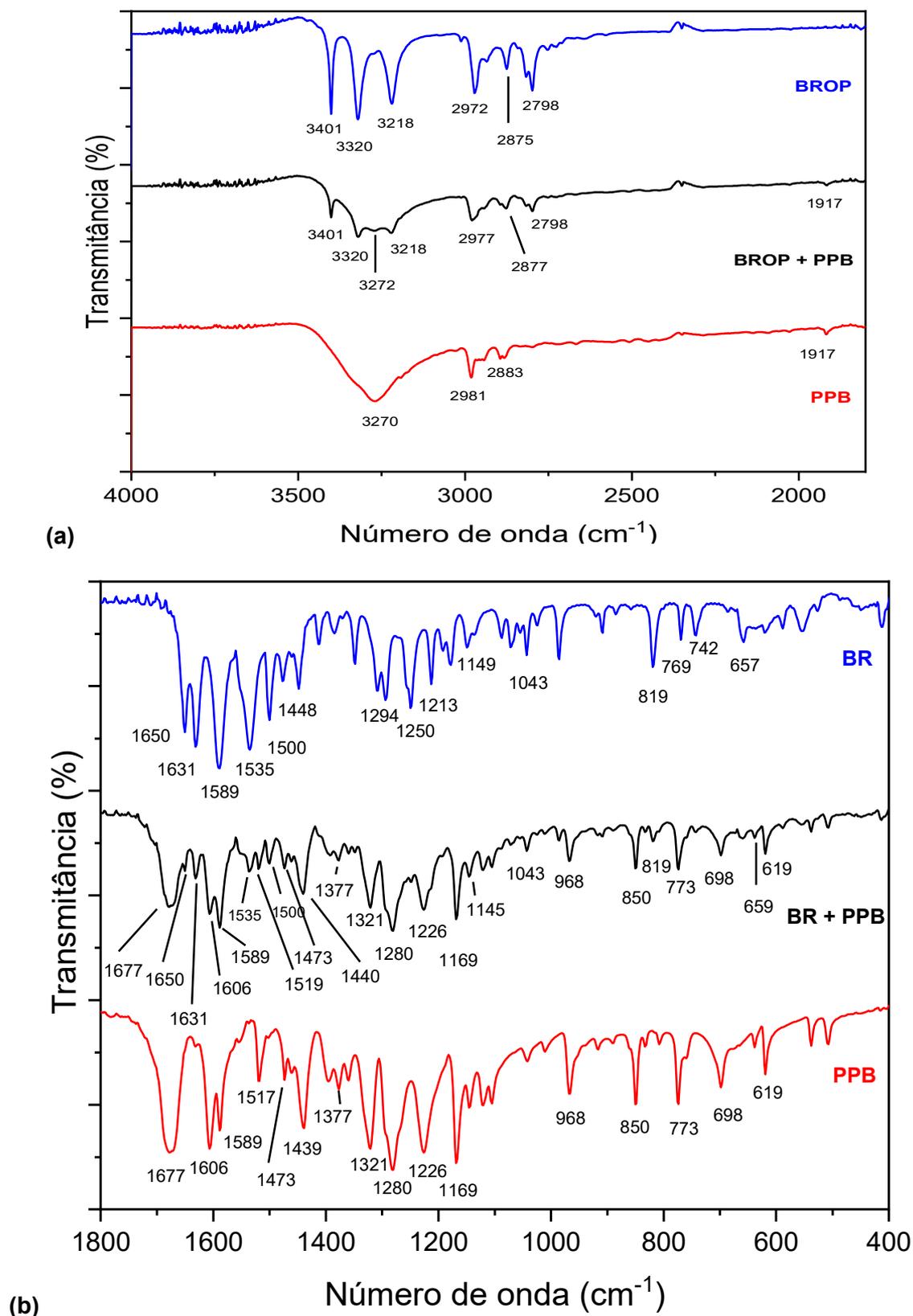
Figura 13 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, PPB e BROP + PPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para melhor visualização e análise das bandas e as prováveis interações, o espectro foi dividido, de 4000 a 2000 cm^{-1} e de 1800 a 400 cm^{-1} , conforme pode ser visto nas Figuras 14(a) e 14(b).

Figura 14(a) e 14(b) Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, PPB e BROP + PPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-1800 cm^{-1} e (b) número de onda 1800-400 cm^{-1} .



Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para a mistura BROP + PPB, os espectros de FTIR foram analisados através da sobreposição dos espectros individuais, algumas modificações nas características das bandas podem ser observadas na Tabela 14. No espectro da BROP, pequenos deslocamentos são notados nas bandas correspondentes à amina aromática primária, à amida, ao grupo metil e às bandas do anel aromático, houve o desaparecimento de dois picos característicos à banda referente ao éter aromático e à banda de dobramento C-H do anel aromático dentro do plano, por sobreposição a banda do fenol do PPB e, ainda, o encurtamento de várias das bandas do espectro. No espectro de FTIR do PPB, pequenos deslocamentos são notados nas bandas correspondentes às bandas de fenol, éster e anel aromático, houve encurtamento da maioria das bandas do espectro e nenhuma banda desapareceu.

Tabela 14 Bandas de absorção no espectro IV de BROP e PPB que apresentaram alterações após mistura física utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

BROP ^a	PPB ^a	BROP + PPB ^a	Evento Observado
3401		3401	Sobreposição e encurtamento da banda N–H da amina primária aromática da BROP com a banda do O–H do fenol do PPB
3320		3320	Sobreposição e encurtamento da banda N–H da amina primária aromática da BROP com O–H do fenol do PPB
	3270	3272	Pequeno deslocamento e encurtamento do pico ν O–H do fenol
3218		3218	Sobreposição e encurtamento da banda N–H da amida secundária da BROP com O–H do fenol do PPB
2972	2981	2977	Sobreposição de banda, pequeno deslocamento e encurtamento do pico ν ass do CH_3
2875	2883	2877	Sobreposição de banda, pequeno deslocamento e encurtamento do pico ν sym do CH_3
	1677	1677	Encurtamento da banda ν C=O do Éster do PPB
1650		1650	Encurtamento da banda ν C=O da amida da BROP
1631		1631	Encurtamento da banda ν C=C do ArH
	1606	1606	
1589	1589	1589	
1535		1535	

Continua

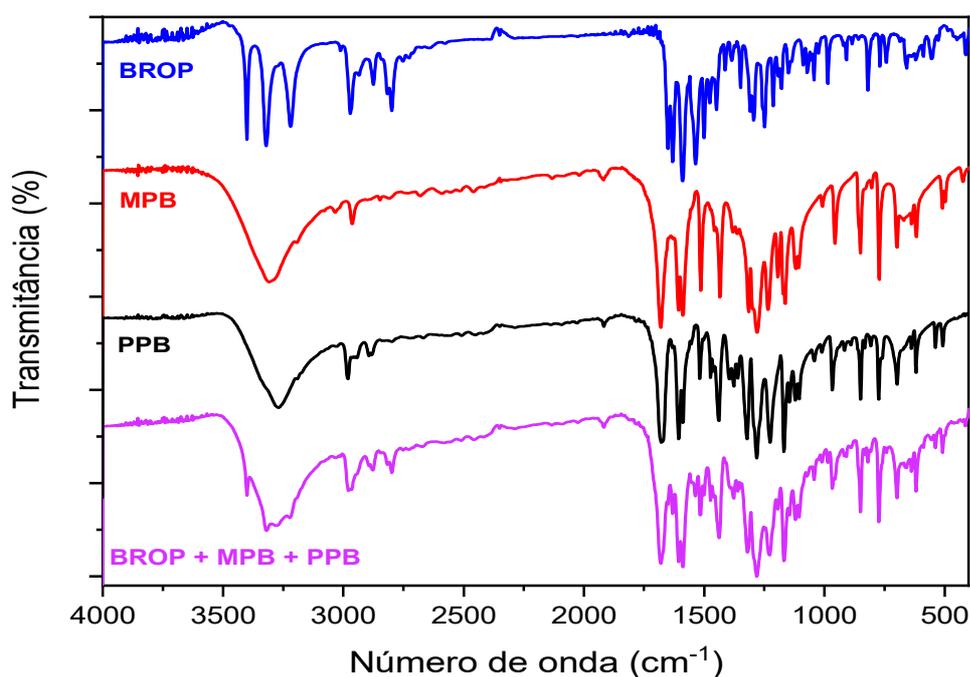
BROP ^a	PPB ^a	BROP + PPB ^a	Evento Observado
	1517	1519	Encurtamento e pequeno deslocamento do pico ν do ArH
1500		1500	Encurtamento da banda ν C=C do ArH
	1473	1473	Encurtamento da banda δ ass CH ₃ no plano do PPB
1448	1439	1440	Sobreposição, pequeno deslocamento do pico δ ass CH ₃ no plano da BROP e do PPB e encurtamento da banda do PPB
	1377	1377	Encurtamento do pico δ sym CH ₃ no plano do PPB
1294	1280	1280	Sobreposição da banda e pequeno deslocamento do pico ν C–N da amina primária aromática da BROP e encurtamento da banda ν C–O do éster do PPB
1250		NA	Desaparecimento do pico ν sym C–O do éter aromático
1213	1226	1226	Desaparecimento devido sobreposição do pico δ C–H do ArH dentro do plano da BROP e encurtamento do pico ν C–O do fenol do PPB
	1169	1169	Encurtamento do pico δ C–H do anel aromático dentro do plano do PPB
1149		1145	Pequeno deslocamento do pico δ C–H do ArH dentro do plano
1043		1043	Encurtamento da banda ν C–O–C do éter aromático
	968	968	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH dentro do plano
	850	850	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH fora do plano
819		819	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH fora do plano
769	773	773	Sobreposição e pequeno deslocamento do pico δ C–H do ArH fora do plano
742		NA	Desaparecimento de pico δ C–H do ArH fora do plano
	698	698	Pequeno encurtamento do pico δ C=C ArH fora do plano
657		659	Pequeno deslocamento do pico δ C–Br (halogênio)
	619	619	Encurtamento do pico C–H do ArH fora do plano

^a Número de onda (cm⁻¹), ν = estiramento, δ = dobramento, as = assimétrico, sym = simétrico, ArH = anel aromático.

5.2.3 Análise por IV da mistura ternária sólida de BROP, MPB e PPB

A Figura 15 representa o espectro de absorção na região do IV por transformada de Fourier (FTIR) de BROP, PPB e da mistura binária BROP + PPB com pastilha de KBr.

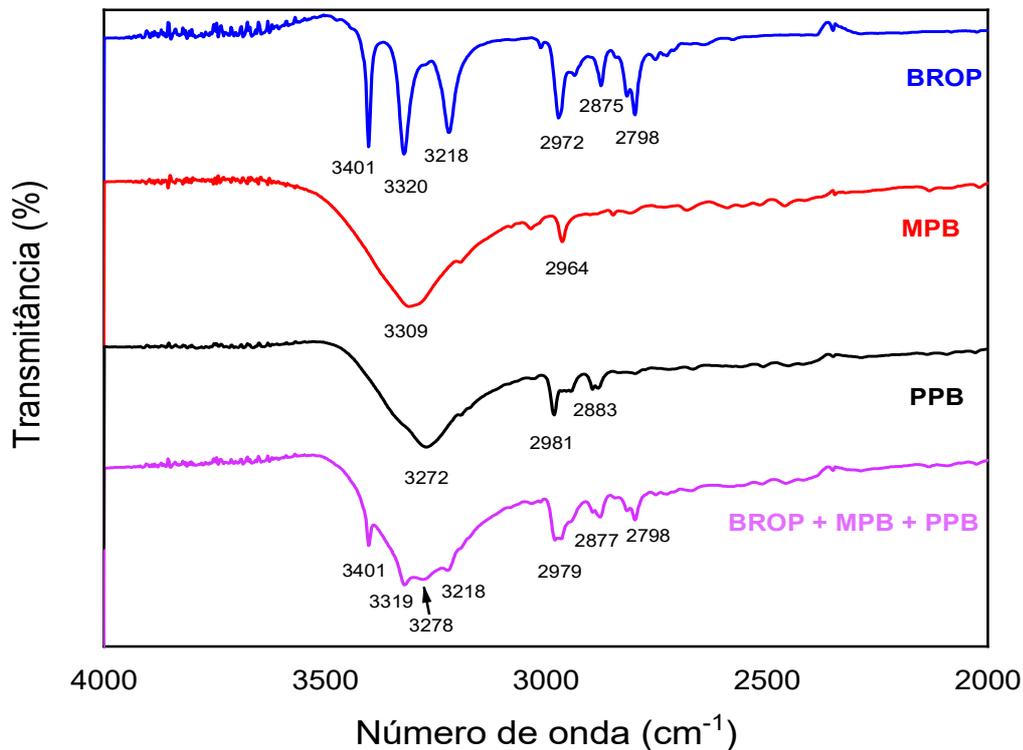
Figura 15 Espectro de absorção por transformada de Fourier na região IR dos IFAs BROP, MPB e PPB e BROP + MPB + PPB, em pastilhas de KBr, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .



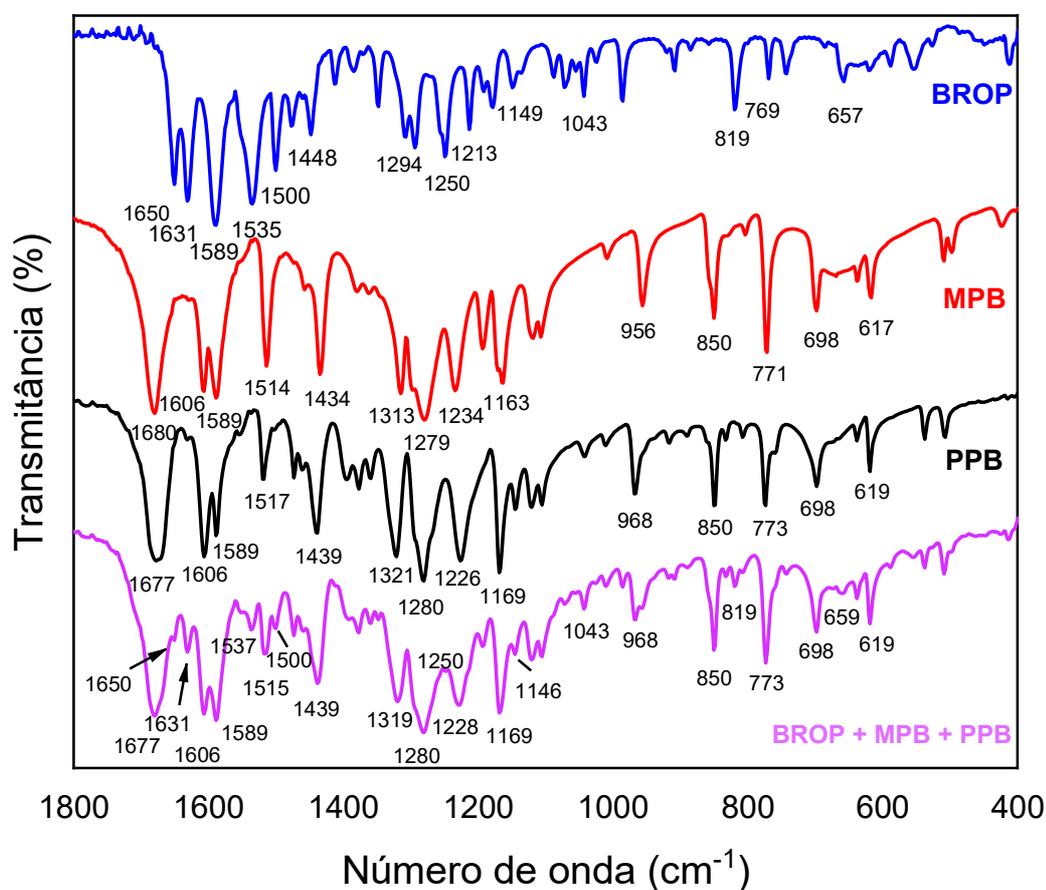
Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para melhor visualização e análise das bandas e as prováveis interações, o espectro foi dividido, de 4000 a 2000 cm^{-1} e de 1800 a 400 cm^{-1} , conforme pode ser visto nas Figuras 16(a) e 16(b).

Figura 16(a) e 16(b) Espectro de absorção de FTIR dos IFAs BROP, MPB e PPB e BROP + MPB + PPB com pastilhas de KBr, (a) número de onda 4000-1800 cm^{-1} e (b) número de onda 1800-400 cm^{-1} .



(a)



(b)

Fonte: Espectrômetro Thermo Scientific™, dados trabalhados no Origin 2019b.

Para a mistura BROP + MPB + PPB, os espectros de FTIR foram analisados através da sobreposição dos espectros individuais. A mistura ternária apresentou poucas modificações nas características das bandas quando comparadas com os espectros individuais, como pode ser observado na Tabela 15. No espectro da BROP, pequenos deslocamentos são notados nas bandas correspondentes à amina aromática primária, ao grupo metil e às bandas do anel aromático, houve o desaparecimento por sobreposição de um pico característicos à banda referente à banda de dobramento C-H do anel aromático dentro do plano e o encurtamento de poucas bandas do espectro. No espectro de FTIR do MPB e do PPB quando comparados com a mistura ternária foram observados pequenos deslocamentos nas bandas correspondentes às bandas de fenol, éster e anel aromático, houve encurtamento de algumas bandas do espectro e nenhuma da banda desapareceu.

Tabela 15 Bandas de absorção no espectro IV de BROP, MPB e PPB que apresentaram alterações após mistura sólida utilizando pastilha de KBr na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

BROP ^a	MPB ^a	PPB ^a	BROP + MPB + PPB ^a	Evento Observado
3401	---	---	3401	Sobreposição e encurtamento da banda N–H da amina primária aromática da BROP com a banda do O–H do fenol do PPB
3320	3309	---	3319	Sobreposição e encurtamento da banda N–H da amina primária aromática da BROP com O–H do fenol do PPB
---	---	3272	3278	Pequeno deslocamento do pico ν O–H do fenol
3218	---	---	3218	Sobreposição da banda N–H da amida secundária da BROP com O–H do fenol do MPB e PPB sem alteração
2972	2964	2981	2979	Sobreposição das bandas e pequeno deslocamento do pico ν ass do CH_3
2875	---	2883	2877	Sobreposição de banda, pequeno deslocamento e encurtamento do pico ν sym do CH_3
---	1680	1677	1677	Sobreposição e pequeno deslocamento da banda ν C=O do Éster do MPB
1650	---	---	1650	Sobreposição e encurtamento da banda ν C=O da amida da BROP

Continua

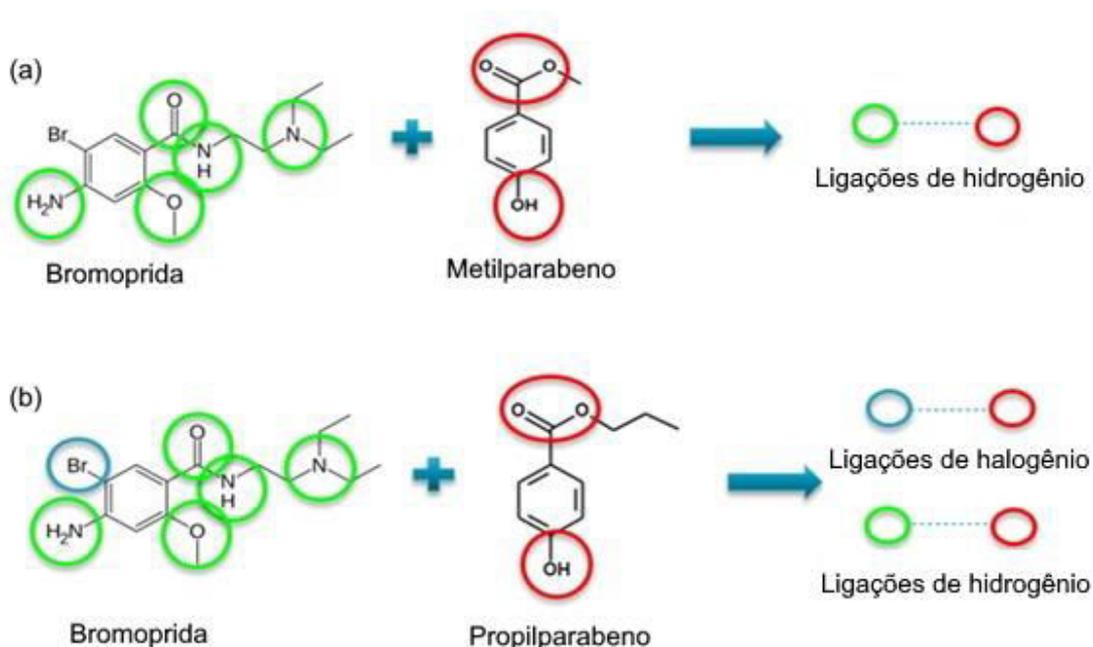
BROP ^a	MPB ^a	PPB ^a	BROP + MPB + PPB ^a	Evento Observado
1631	---	---	1631	Encurtamento da banda ν C=C do ArH
---	1606	1606	1606	
1589	1589	1589	1589	
1535	---	---	1537	Encurtamento e pequeno deslocamento da banda ν C=C do ArH da BROP
---	1514	1517	1515	Sobreposição e pequeno deslocamento do pico ν do ArH
1500	---	---	1500	Encurtamento da banda ν C=C do ArH
1448	1434	1439	1439	Sobreposição e pequeno deslocamento do pico δ ass CH ₃ no plano da BROP e do MPB
1294	1279	1280	1280	Sobreposição da banda e pequeno deslocamento do pico ν C–N da amina primária aromática da BROP com as bandas ν C–O do éster do MPB e PPB
1250	1234	1226	1228	Sobreposição do pico ν sym C–O do éter aromático da BROP e deslocamento dos picos ν C–O do fenol do MPB e PPB
1213	---	---	NA	Sobreposição e desaparecimento pico δ C–H do ArH dentro do plano da BROP
---	1163	1169	1169	Sobreposição do pico δ C–H do ArH dentro do plano do MPB e PPB
1149	---	---	1146	Pequeno deslocamento do pico δ C–H do ArH da BROP dentro do plano
1043	---	---	1043	Encurtamento da banda ν C–O–C do éter aromático
---	956	968	968	Sobreposição dos picos δ =C–H do ArH dentro do plano
---	850	850	850	Sobreposição dos picos δ =C–H do ArH fora do plano
819	---	---	819	Encurtamento do pico δ =C–H do ArH fora do plano
769	771	773	773	Sobreposição e pequeno deslocamento do pico δ C–H do ArH fora do plano da BROP
---	698	698	698	Pequeno encurtamento do pico δ C=C do ArH fora do plano
657	---	---	659	Pequeno deslocamento do pico δ C–Br (halogênio)
---	617	619	619	Sobreposição e pequeno deslocamento dos picos C–H do ArH fora do plano do MPB

^a Número de onda (cm⁻¹), ν = estiramento, δ = dobramento, ass = assimétrico, sym = simétrico, ArH = anel aromático.

Fonte: próprio autor.

A análise da mistura binária dos sólidos BROP + MPB e BROP + PPB e a mistura ternária BROP + MPB + PPB por IV mostrou poucas alterações nas bandas, podendo, assim, estar ocorrendo algum tipo de interação entre o fármaco e os excipientes. Observou-se maior interação entre BROP e PPB do que entre BROP e MPB. As alterações de deslocamento de algumas bandas são, provavelmente, devido a interações físicas e/ou físico-químicas entre as moléculas, principalmente, por ligação de hidrogênio (Figura 17). Essas ligações ocorrem entre a carbonila presente no fármaco e nos excipientes, os grupos OH do ácido carboxílico dos excipientes, o C–O–C do grupo éter e o nitrogênio da amida e da amina presentes no fármaco. O encurtamento das bandas provavelmente se dá pela diluição das amostras nas misturas binárias e ternária e/ou por interações físicas e/ou físico-químicas (DA SILVA *et al*, 2016; SEGALL, 2019).

Figura 17 Ilustração dos possíveis sítios de interação molecular entre os IFAs BROP e MPB (a) e BROP e PPB (b).



Fonte: próprio autor.

5.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

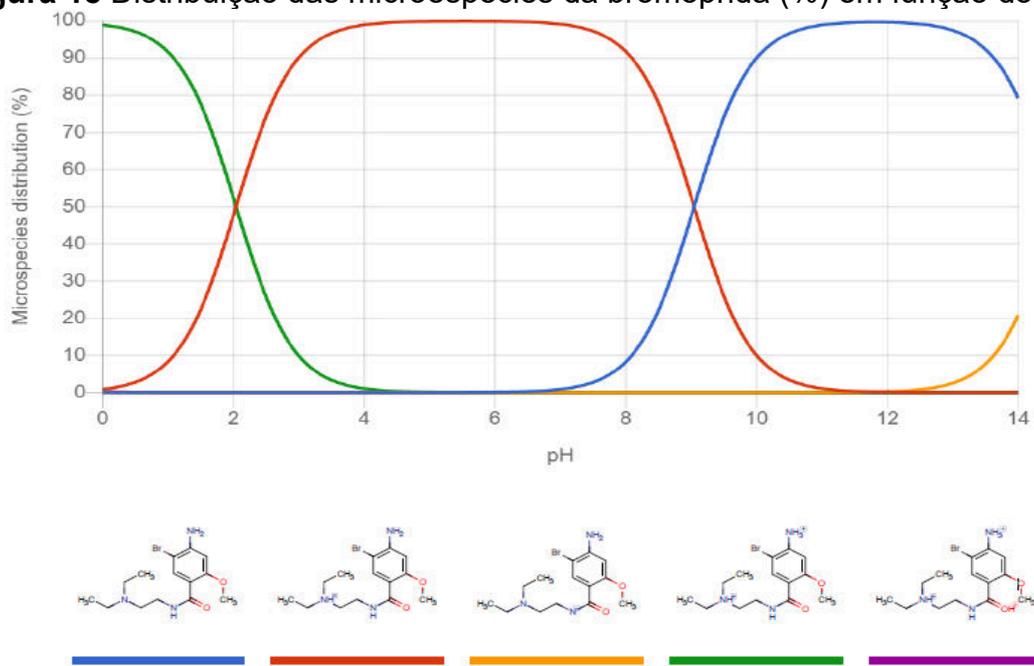
O desenvolvimento do método começou com a seleção de uma coluna e fase móvel adequadas para separar o BROP dos conservantes MPB e PPB. Duas colunas diferentes foram testadas. Os resultados obtidos com a coluna Kinetex® C18 não foram promissores, a pressão do sistema ficou muito alta, quando foi testado a fase móvel metanol: água, devido as partículas da coluna serem muito pequenas, além do cromatograma apresentar um pico bifurcado e sem a separação da bromoprida e dos conservantes. A mudança da fase móvel para acetonitrila: água, apesar da pressão ter diminuído, também não apresentou boa eficiência de acordo com os parâmetros cromatográficos estudados, ficando o cromatograma da bromoprida com ombro e sem separação dos conservantes.

A segunda coluna testada Inertsustain® C18 apresentou bons resultados de acordo com os parâmetros de desenvolvimento e obteve bom desempenho para separação analítica do IFA e dos excipientes. A coluna InertSustain® C18 tem um tipo de configuração, no qual a superfície da sílica é modificada de forma exclusiva, deixando os grupos silanóis bem distribuídos e totalmente encapados, permitindo o controle preciso das propriedades da coluna. Além disso, esta coluna possui tamanho de partícula pequeno (3 µm), resultando em separação cromatográfica eficiente com picos simétricos, boa resolução, menor tempo de análise e apresenta maior estabilidade frente a ampla faixa de pH (1 a 10) e pressão do sistema cromatográfico (≤ 500 bar), aumentando, assim, a durabilidade da coluna.

A escolha do valor de pH da fase móvel levou em consideração o valor de pKa da bromoprida (pKa = 9,04), este composto possui dois grupos ionizáveis. No pH = 3,5, a molécula de bromoprida encontra-se na forma ionizada (Figura 18), com os dois grupos amino protonados (CHEMICALIZE, 2020; TANAKA; HIRAYAMA, 2004), desta forma a molécula possui melhor interação com a coluna, evitando a forte adsorção do IFA na fase estacionária reversa, pois ocorre poucas interações hidrofóbicas com as cadeias hidrofóbicas covalentemente ligadas à sílica, além da formação de pares iônicos entre o ânion ácido contido na fase móvel e o cátion dos grupos amino protonados, evitando a forte interação com os silanóis residuais presentes na superfície da sílica. Outra

justificativa é dada pelo fato de que a solubilidade da bromoprida aumenta com a diminuição do pH (BORGES; GORAIEB; COLLINS, 2012; SILVA *et al.*, 2015; CHEMICALIZE, 2020).

Figura 18 Distribuição das microespécies da bromoprida (%) em função do pH.



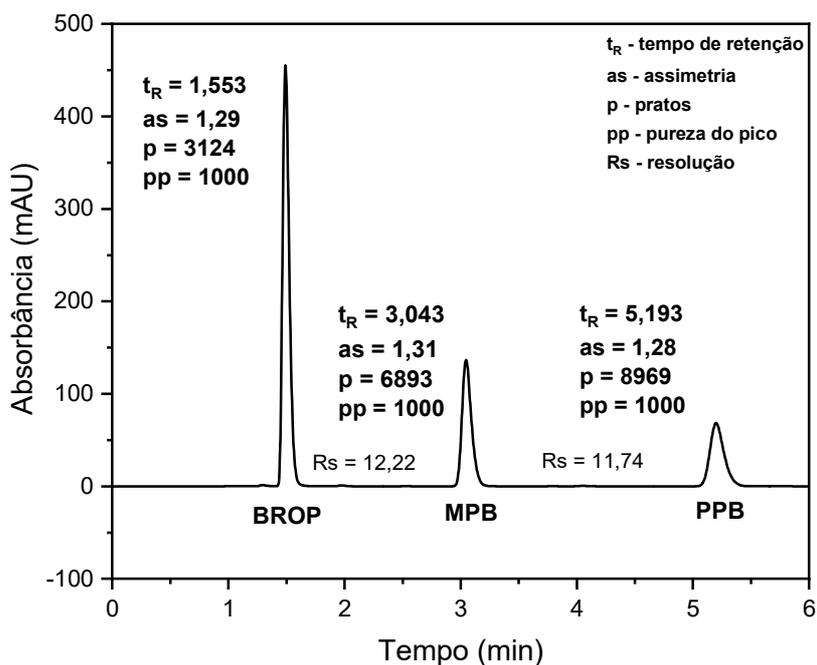
As proporções da fase móvel variaram de acetonitrila: água na faixa de 20:80 a 80:20 (v/v), onde nos extremos o número de pratos diminuiu. As vazões variaram de 0,3 a 0,8 mL/min, na proporção inversa houve diminuição do tempo de retenção, nesta última vazão, o tempo de retenção diminuiu muito.

Assim, o melhor desempenho do método foi observado utilizando a coluna InertSustain® C18, fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v), pH = 3,5, no modo de eluição isocrática, vazão de 0,6 mL/min, condições tais que foram escolhidas para as análises do IFA e dos conservantes.

A fase móvel escolhida foi trabalhada em bomba binária, porém também foi realizado a mistura dos solventes na proporção escolhida e com posterior ajuste de pH, para ser testado a fase móvel em bomba única, os resultados foram reproduzidos para os parâmetros analisados.

Após otimizar os parâmetros (Tabela 04), a adequação do sistema foi verificada (Figura 19).

Figura 19 Cromatograma ilustrando os parâmetros cromatográficos tempo de retenção (t_R), assimetria (as), pratos (p), pureza do pico (pp) e resolução (R_s) da bromoprida (BROP), metilparabeno (MPB) e propilparabeno (PPB).



Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 μ L.

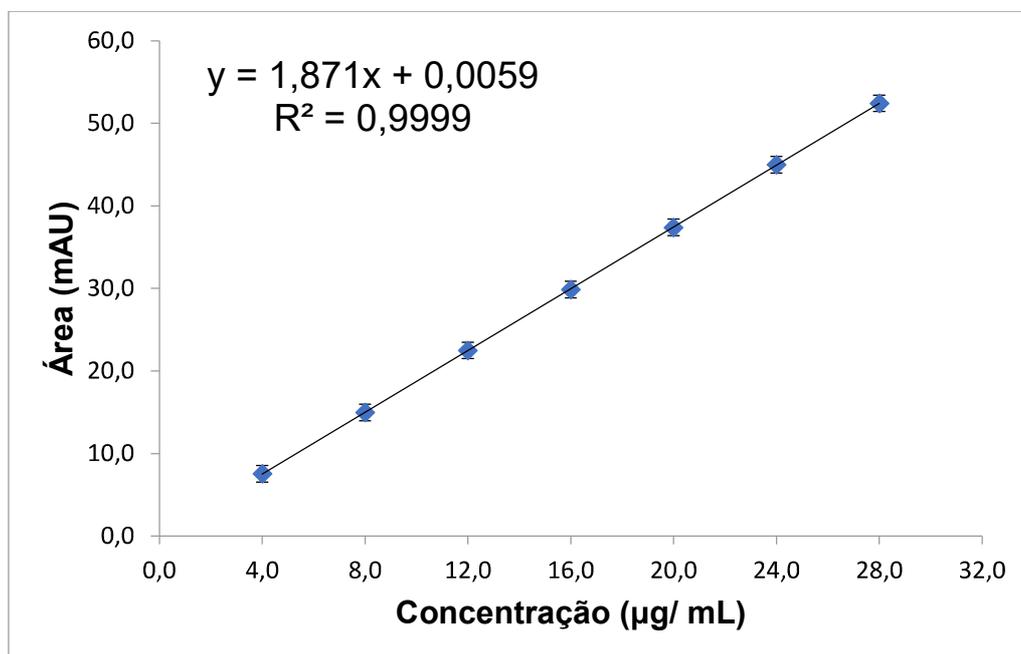
Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.4.1 Linearidade

O gráfico da curva de calibração (Figura 20) foi obtido através da média de três análises, plotando a área obtida do pico versus os dados de concentração, que variou de 4 a 28 μ g/mL para BROP. A equação de regressão da reta foi obtida ($y = 1,871x + 0,0059$) e o coeficiente de correlação foi de 0,9999, o que indica a qualidade da curva (coeficiente de correlação maior que 0,999). Para o método ser considerado linear, o coeficiente de correlação da curva de calibração deve estar entre 0,99 e 1,00, sendo $\geq 0,99$ segundo a RDC nº 166 (BRASIL, 2017) e melhor ainda se encontrar resultados $\geq 0,999$ (PAPADOYANNIS; SAMANIDOU, 2004; ICH, 2005; ERMER; MILLER, 2006). Esta equação da reta foi utilizada para os cálculos de concentração dos IFAs em todas as análises durante a validação.

Figura 20 Curva de calibração analítica da bromoprida desenvolvida em ACN:H₂O ácida (52:48, v/v), pH 3,5, vazão de 0,6 mL/min e comprimento de onda de 276 nm.



Fonte: próprio autor.

A avaliação estatística ANOVA indicou uma regressão linear significativa. Esses resultados indicaram uma correlação linear entre as áreas de pico e as concentrações do IFA.

A Tabela 16 mostra os resultados da análise estatística pelo teste ANOVA, onde pode-se observar que a regressão foi significativa (F calculado > F crítico) para o IFA.

Tabela 16 Análise de variância (ANOVA) da regressão linear da BROP.

	GL	SQ	MQ	F calculado	F crítico
Regressão	1	4705,679	4705,679	93926,30	$1,455 \cdot 10^{-36}$
Resíduo	19	0,951894	0,0501		
Total	20	4706,631			

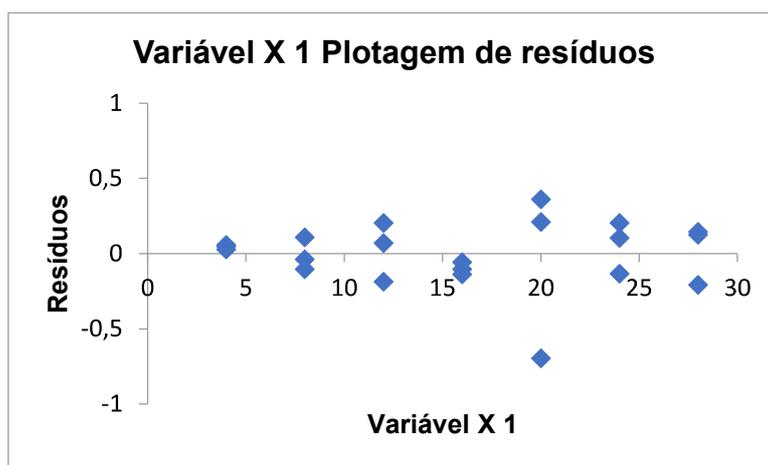
Fonte: próprio autor.

A linearidade da curva analítica também foi confirmada por meio da análise dos resíduos da regressão. De acordo com a distribuição dos resíduos, pode-se verificar se existem dados potencialmente discrepantes pela avaliação

da normalidade dos resíduos por meio da análise visual do gráfico e, consequentemente, se a variância é homogênea ou não.

Os resíduos do BROP mantiveram-se homogeneamente distribuídos e próximos ao eixo zero do gráfico, confirmando a homocedasticidade da curva analítica (Figura 21).

Figura 21 Análise dos resíduos obtidos a partir das curvas de regressão linear do BROP.

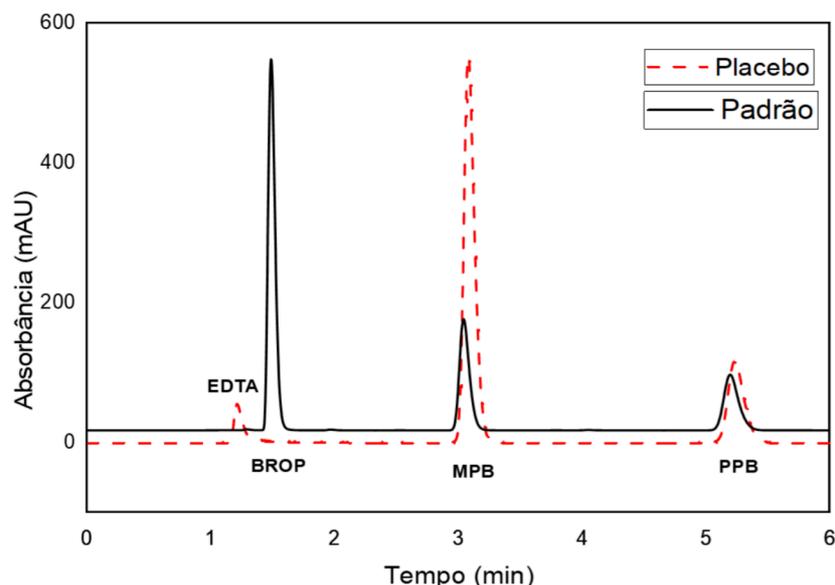


Fonte: próprio autor.

5.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação de dados espectrais da amostra padrão contendo apenas os analitos BROP, MPB e PPB com os dados espectrais da solução de placebo. Foi confirmado que nenhum excipiente coeluiu com o composto alvo, uma vez que não foram observados picos nos tempos de retenção do IFA (Figura 22), o que comprova a seletividade do método.

Figura 22 Cromatograma da solução adjuvante sobrepostos ao cromatograma de amostra padrão de bromoprida (BROP), metilparabeno (MPB) e propilparabeno (PPB).



Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL; placebo: metilparabeno (0,02%), propilparabeno (0,01%), edetato de sódio (0,01%) e citrato de sódio di-hidratado (0,3%), bissulfito de sódio (0,01%) e água ultrapura; padrão: bromoprida 16 µg/mL + MPB 8 µg/mL + PPB 8 µg/mL diluídos em fase móvel.

Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

A seletividade do método também foi avaliada verificando a pureza do pico após os estudos de degradação forçada cujos resultados estão expostos na Tabela 17.

Tabela 17 Porcentagem de degradação do IFA, sob as condições selecionadas para realização do estudo de degradação forçada da BROP.

Condição de degradação	Degradante	Duração	Degradação (%)	Pureza de Pico
Hidrólise ácida ^a	HCl 0,1 M	8 h	0,00	1000
Hidrólise alcalina ^a	NaOH 0,01 M	4 h	22,12	999
Hidrólise oxidativa ^a	H ₂ O ₂ 0,03%	30 min	1,82	999
Hidrólise neutra ^a	H ₂ O	30 min	0,00	1000
Fotólise ^b	Luz branca ^c , H ₂ O	16 h	0,00	1000
Fotólise	Luz Solar, H ₂ O	6 h	7,92	1000

Temperatura de exposição: ^a 60°C e ^b temperatura ambiente (24 ± 2°C); ^c lâmpadas fluorescente tubular luz branca.

Fonte: próprio autor.

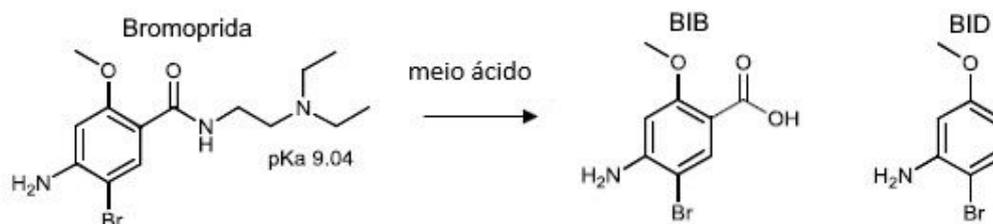
5.4.2.1 Degradação ácida

A degradação ácida foi realizada com HCl 0,1 M por 8h a 60°C, foram realizadas coletas das amostras nos tempos de 1h, 2h, 4h e 8h para serem analisadas. No protocolo de Sversut e colaboradores (2019) não foram realizadas as neutralizações das amostras antes da injeção na CLAE, porém foi observado um aumento no valor da assimetria, então, preferiu-se realizar a neutralização com 0,5mL de NaOH 0,1M logo após cada coleta de 1mL da amostra + degradante, seguindo a diluição (1:10) e filtração antes da injeção no cromatógrafo. Após o tempo final de 8h, não foi observado alteração no teor, no t_R e pureza de pico (PP) cromatográfico igual 1000, confirmando, assim, a identidade da BROP, indicando estabilidade desta frente ao meio ácido. Para tentar obter a degradação do analítico, o tempo de exposição foi prolongado para 24h nestas condições de exposição e, ainda assim, não houve alteração.

As aminas podem sofrer hidrólise em presença de ácido, os éteres também podem ser hidrolisados via catálise ácida formando álcoois, porém a protonação do nitrogênio e do oxigênio adquirem estabilidade devido a ressonância do anel aromático ao qual estão ligados na molécula de BROP, não sofrendo degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

As amidas podem sofrer quebra na parte carbonila do grupo, resultando em ácido carboxílico e amina (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011), esta reação foi observada no estudo de degradação da bromoprida realizado por Abreu, Mahr e Do Lago (2021), onde obtiveram como impureza o ácido 4-amino-5-bromo-2-metoxibenzoico (BIB) (Figura 23), ainda na degradação ácida obtiveram como produto de degradação o 2-bromo-5-metoxianilina (BID).

Figura 23 Bromoprida e seus produtos de degradação BIB e BID obtido pela quebra da ligação carboxílica do grupo amida na degradação ácida realizada.



Fonte: adaptado de Abreu, Mahr e Do Lago (2021).

5.4.2.2 Degradação alcalina

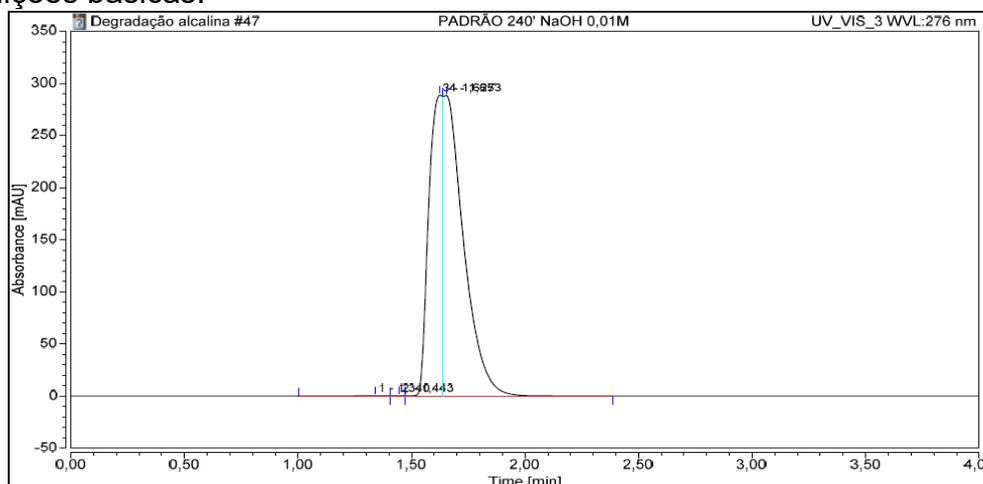
Na degradação alcalina, realizada com NaOH 0,01 M por 4h a 60°C com coletas nos tempo 1h, 2h e 4h, observou-se que no tempo de 1h não ocorreu degradação, pois o teor da BROP se manteve e a pureza do pico da SQRC foi de 999, no tempo de 2h, o gráfico ficou dividido indicando que possivelmente estaria acontecendo o início da degradação da BROP (Figura 24), porém não observou-se a redução do teor, já no tempo 4h o teor caiu para 77,88%, o pico continuou dividido, porém sem separação e ainda os espectros de ambos os picos permaneceram bem semelhantes, não sendo possível a separação de prováveis produtos de degradação que estivessem começando a se formar.

As amins alifáticas estão sujeitas a hidrólise catalisada por base com liberação de amônia e resultando em composto hidroxilados ou compostos com uma ligação dupla (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

O grupo amida não sofre hidrólise em meio alcalino, devido à deslocalização parcial do par de elétrons do nitrogênio para o grupo carbonila frente a adição de um nucleófilo como o hidróxido de sódio, levando à repulsão eletrostática. O grupo éter é razoavelmente estável em condições neutras e básicas (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

No estudo de Abreu, Mahr e Do Lago (2021) não foi observado hidrólise da BROP após 10 dias de exposição a NaOH 3,0 M a 25°C e 55°C.

Figura 24 Cromatograma da BROP após 4 horas de exposição a 60°C sob condições básicas.



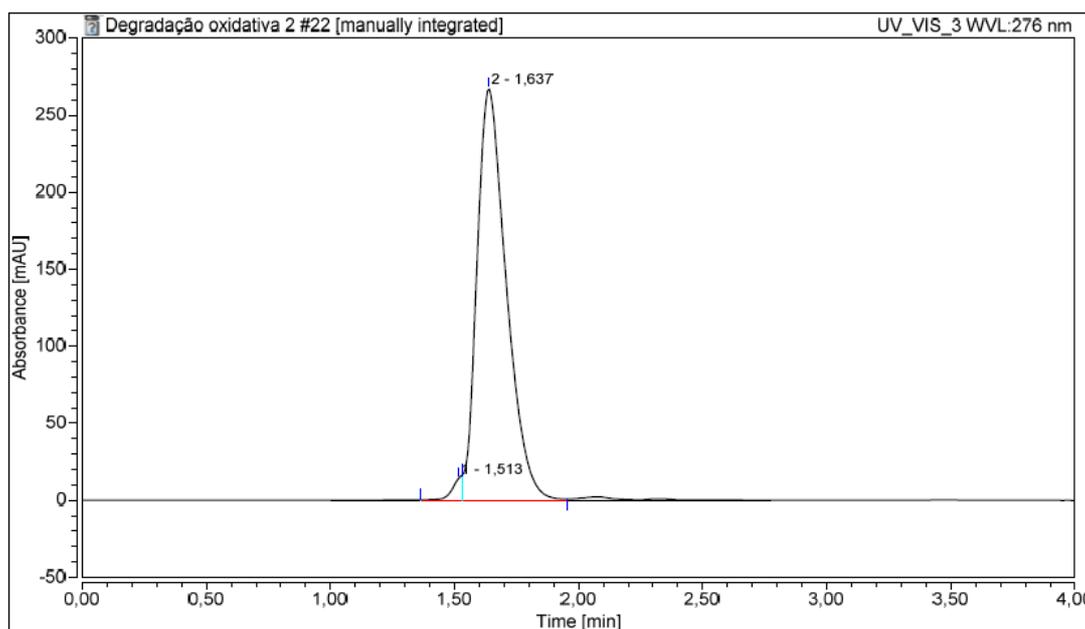
Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.
Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000.

5.4.2.3 Degradação oxidativa

Na degradação oxidativa, realizada com H₂O₂ 0,03% por 30 min a 60°C, o valor alcançado de degradação da BROP SQRC foi de 1,82% após as condições de estresse realizadas. Foi observado a presença de uma fenda (“ombro”) no cromatograma anterior ao pico da BROP, podendo ser referente a um provável produto de degradação (Figura 25).

Não houve mudança no t_R, e a pureza do pico cromatográfico principal foi de 1000, permanecendo dentro dos valores preconizados (PP= 950-1000), identificando a presença da BROP inalterada, o produto referente à área anterior ao pico (“ombro”) formado provavelmente representa o produto de degradação e tem o mesmo espectro de absorção da BROP. A baixa quantidade deste produto e a não separação do pico da bromoprida nos indica a necessidade de alteração no protocolo seguido para degradação oxidativa com aumento de tempo de exposição ao degradante ou aumento da concentração do peróxido de hidrogênio para tentar obter resultados dentro da porcentagem esperada de 10 a 30%.

Figura 25 Cromatograma da BROP após 30 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio 0,03% a 60°C.

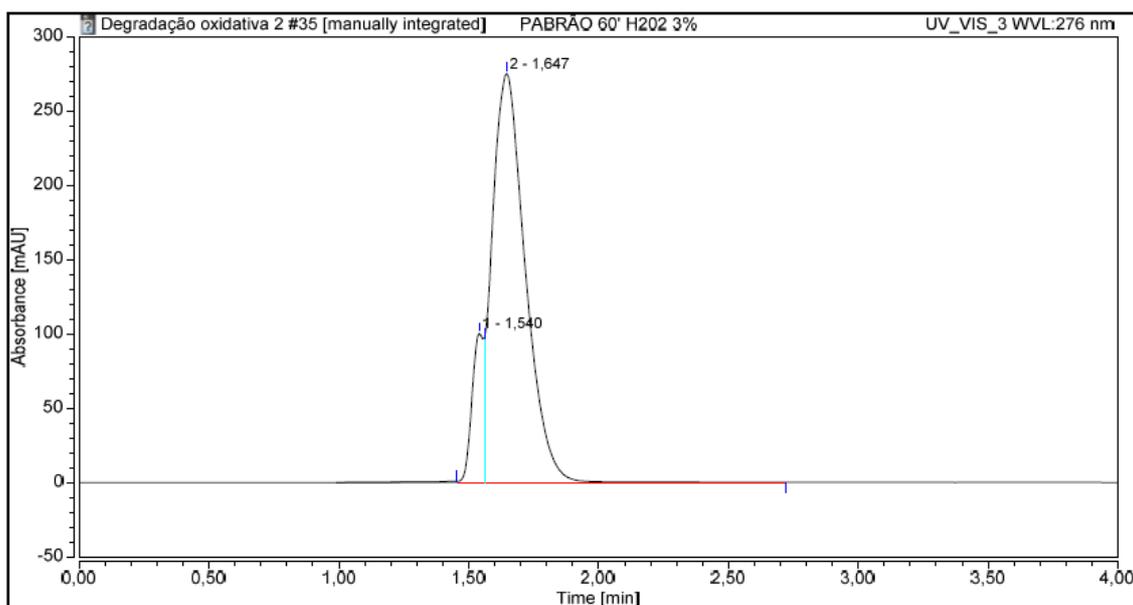


Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.

Fonte: HPLC DAD Dione® Ultimate 3000.

Como o objetivo é alcançar a degradação de 10 a 30%, o protocolo seguido foi alterado, aumentando o tempo de exposição e a concentração do degradante. A BROP SQRC foi exposta à H_2O_2 0,03% por 90 min a 60°C , o valor alcançado de degradação da BROP SQRC foi de 1,28% após as condições de estresse realizadas, indicando que esta alteração não foi suficiente para obter a degradação entre 10 e 30%. Foi alterada, então, a concentração do H_2O_2 para 3% e realizada a exposição por 30 e 60 minutos a 60°C . Foi observado que a fenda (“ombro”) no cromatograma anterior ao pico da BROP aumentou bastante (Figura 26), porém não separou do pico da bromoprida, o valor da área aumentou, provavelmente por estar formando produtos de degradação que não separaram do pico, a porcentagem do aumento da área ficou em 11,11% nos primeiros 30 minutos de exposição e 12,11% em 60 minutos de exposição.

Figura 26 Cromatograma da BROP após 60 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio 3% a 60°C .

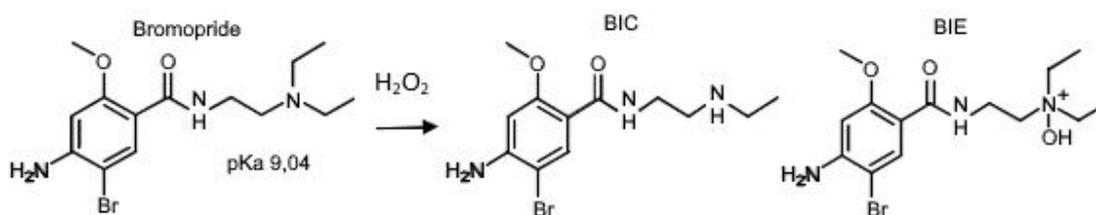


Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 μL .
Fonte: HPLC DAD Dione® Ultimate 3000.

A oxidação é uma das vias mais comuns de degradação farmacêutica e, dada a abundância de grupos amina em produtos farmacêuticos, é plausível que as ligações C–H adjacentes aos grupos amina possam ter uma suscetibilidade à abstração do átomo H por radicais peróxi, que é dependente do estado de

protonação do par de elétrons do átomo de nitrogênio. Oxidação do grupo amina primária presente na BROP resulta na formação de hidroxilaminas, que nem sempre podem ser observadas e/ ou podem ser difíceis de isolar (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011), já as aminas terciárias são conhecidas por sua propensão a oxidar formando óxido de amina (N-óxido) (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; ABREU; MAHR; DO LAGO, 2021) ou apenas perder uma cadeia e se tornar uma amida secundária, como foi obtido, no trabalho de Abreu, Mahr e Do Lago (2021), a impureza 4-Amino-5-bromo-N-(2-(etilamino)etil)-2-metoxibenzamida (BIC) resultando em uma amina secundária e a impureza N-(2-(4-amino-5-bromo-2-metoxibenzamido) etil)-N,N-dietilhidroxilamônio (BIE) (Figura 27), resultando em uma hidroxilamina. Neste estudo a porcentagem de degradação oxidativa foi superior a 10% com H₂O₂ 0,3% por 4 horas, resultando em duas impurezas (ABREU; MAHR; DO LAGO, 2021).

Figura 27 Bromoprida e seus produtos de degradação (BIC e BIE) obtidos pela perda da cadeia carbônica e pela hidroxilação da amina terciária no estudo de degradação oxidativa realizada.

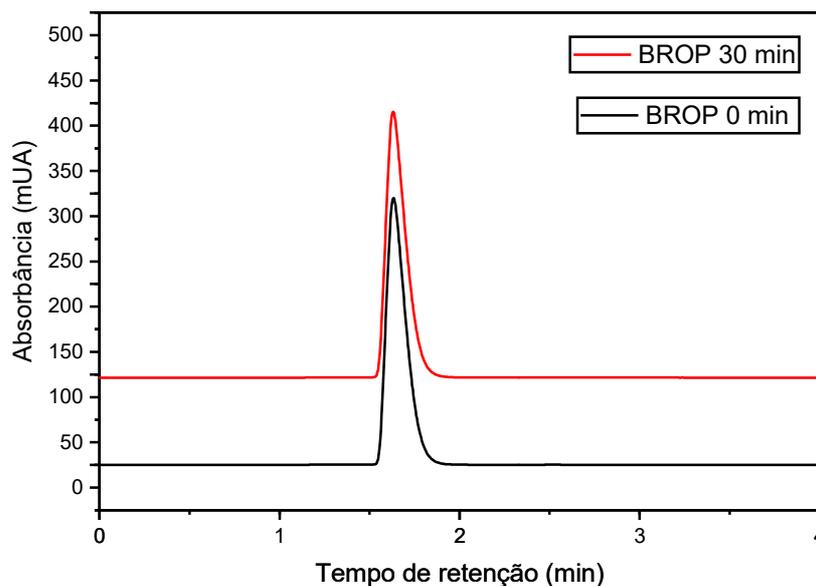


Fonte: adaptado de Abreu, Mahr e Do Lago (2021).

5.4.2.4 Degradação neutra

Na degradação neutra não foi observado nenhum pico de produto de degradação (Figura 28), não houve mudança no t_R e a pureza dos picos cromatográficos de 1000, permaneceu dentro dos valores preconizados (PP = 950-1000), confirmando que a BROP não sofreu degradação e tem estabilidade nestas condições (ICH, 2005; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Figura 28 Cromatograma da BROP antes e após exposição à hidrólise neutra.



Condições: Coluna InertSustain® C18, fase móvel acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; no modo de eluição isocrático; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 μ L.

Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

A estabilidade das amidas se deve à deslocalização parcial do par de elétrons do nitrogênio no grupo carbonila da amida, a adição de um nucleófilo, como a água, torna a degradação mais difícil se o eletrófilo for rico em elétrons, devido a repulsão eletrostática (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

5.4.2.5 Degradação fotolítica

Na análise da degradação fotolítica na luz fluorescente branca após 16h não foi observado degradação da SQRC, a área se manteve constante, não houve alteração do t_R , não houve aparecimento de picos de degradação no cromatograma e a pureza do pico foi de 1000 após o estresse. Essa degradação foi ampliada para ver a presença de produtos de degradação, porém, a amostra se manteve nas mesmas condições após 100h de exposição à luz fluorescente branca, indicando estabilidade da BROP frente a esse degradante.

Na análise da degradação fotolítica na luz Solar foi observado a degradação de 7,92% da BROP SQRC após 6h de exposição a luz solar, não houve alteração do t_R e a pureza do pico foi de 1000, porém apareceu um pico

(“ombro”) anterior ao pico da BROP que não separou totalmente, podendo ser referente a um provável produto de degradação.

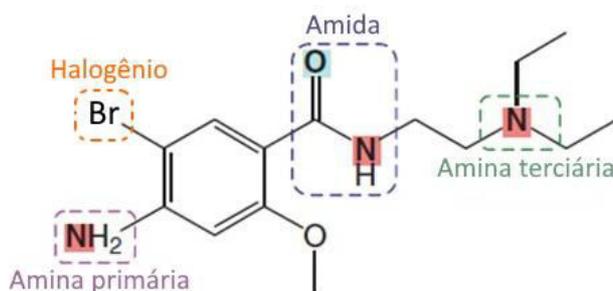
As reações fotoquímicas envolvem estados eletronicamente excitados que são formados por meio de absorção de luz ultravioleta ou visível pelas moléculas. Ao ar livre, ambos ultravioleta (UVA e UVB) e luz visível são emitidos pelo sol, nesta exposição observamos a presença de degradação da BROP, já nas luzes fluorescentes observa-se níveis baixos da radiação UVB e a BROP não sofreu degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Compostos contendo anéis aromáticos são conhecidos pela forte absorção no UV e no visível, as amidas e aminas também são grupos fotorreativo presente na molécula da BROP. Juntamente com a reação fotolítica, os processos de oxidação são uma ocorrência comum na irradiação, em particular, na presença de oxigênio (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Outra possibilidade de degradação da BROP é pela dissociação do bromo (Br) do anel aromático, seguida da ligação com outros produtos gerando moléculas de alto peso molecular ou formando moléculas hidroxiladas, como foi observado com a metoclopramida, sua análoga, no trabalho de Maquile e Jiwan (2009). A hidroxilação do anel aromático e a desalquilação do grupo amino também foi observado por Dabić e colaboradores (2021) no estudo de fotodegradação da metoclopramida, neste estudo um dos produtos de degradação formado, apenas na água do mar, como resultado da substituição nucleofílica do átomo de cloro por um átomo de bromo, foi a BROP.

A Figura 29 mostra os principais sítios reativos da molécula de BROP que podem sofrer ligações e/ hidrólise frente aos degradantes.

Figura 29 Molécula de Bromoprida demonstrando os sítios reativos doadores de elétrons, provavelmente envolvidos nas reações de degradação.



Fonte: próprio autor.

5.4.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os valores de LQ = 0,3 µg/mL e LD = 0,09 µg/mL foram obtidos através de cálculo, o valor obtido experimentalmente para LQ foi 0,25 µg/mL bem próximo do valor calculado, o que indica que o método desenvolvido por CLAE-DAD apresenta sensibilidade adequada para a determinação de BROP.

5.4.4 Precisão

A precisão do método para BROP em presença de MPB e PPB foi avaliada através de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia), os valores de DPR estão demonstrados na Tabela 18 e são inferiores ao limite máximo recomendado de 1,0% para $n \geq 5$ (BRASIL, 2017). Portanto, o método proposto tem boa precisão para a determinação do IFA na presença dos excipientes.

Tabela 18 Resultados obtidos na precisão intermediária e na repetibilidade.

IFA	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL) ± DPR (%)		
		Precisão Interdia ^a		Precisão Intradia ^b
BROP (Digesan®)	16	Dia 1	15,3401 ± 0,36	15,2638 ± 0,47
		Dia 2	15,2946 ± 0,63	
		Dia 3	14,9867 ± 0,44	
		Média	15,2072 ± 0,48	

^aMédia de 6 determinações em 3 dias diferentes. ^bMédia de 3 determinações em 1 dia. Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.

Fonte: próprio autor.

5.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi expressa na forma de porcentagem de recuperação do IFA após a adição de concentrações conhecidas da solução preparada com a SQRC de BROP na solução amostra, de acordo como recomendado pelo guia internacional da *Association of Official Analytical Chemists* e ANVISA, a faixa de limite aceitável varia de 98-102% (AOAC, 2016;

BRASIL, 2017). O DPR das médias foi inferior a 2% e os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 Resultados do ensaio de exatidão de BROP através do método CLAE-DAD proposto.

IFA	Concentração teórica adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	
			Resultado	Média (%) \pm DPR
BROP (Digesan [®])	4	3,9333	98,33% \pm 0,07%	99,60% \pm 1,10%
	8	8,0135	100,17% \pm 0,05%	
	12	12,0362	100,30% \pm 0,04%	

Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain[®] C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 μL .

Fonte: próprio autor.

5.4.5 Robustez

Os resultados obtidos no ensaio para robustez com a amostra contendo BROP na presença de MPB e PPB mostraram que pequenas mudanças nas condições cromatográficas, como variação na composição da fase móvel, pH, temperatura ambiente e vazão da fase móvel não interferiram significativamente nos parâmetros cromatográficos (Figura 30), como área do pico, tempo de retenção dos IFAs e fator de assimetria (Tabela 20). O valor de DPR inferior a 2%, mostra que as mudanças não comprometeram a análise da BROP, indicando confiança no método proposto, pois manteve-se robusto frente às mudanças.

A coluna cromatográfica empregada no ensaio de robustez utilizando colunas de marcas diferentes foi a Coluna Kromasil (4,6 x 100 mm, tamanho de partícula 5 μm) produzida pela Nouryon (Bohus, Suécia), apresentou área do pico e assimetria semelhantes, com valor de DPR inferior a 2%, já os valores de tempos de retenção apresentaram maior variação, provavelmente devido ao tamanho das partículas das colunas serem diferentes, a coluna Kromasil possui partículas de 5 μm enquanto a coluna Inertsustain possui partículas com tamanho de 3 μm , o que mostrou menor interação com a primeira coluna, fazendo com que a BROP saísse com tempo de retenção menor (Figura 31).

O ensaio de robustez utilizando colunas de mesma marca e lotes diferentes foi realizado em duas etapas, comparando-se o resultado da coluna Inertsustain utilizada no desenvolvimento do método (Lote: GO26 – 07444) e uma coluna nova (Lote: WR3 – 5994) e os resultados de duas colunas novas da mesma marca e especificações (Lote: GO26 – 07444 e Lote: WR3 – 5925). Comparando a coluna utilizada no desenvolvimento do método e a coluna nova (Figura 32), foi observado que a área do pico e o tempo de retenção apresentaram resultados com DPR inferior a 2%, já os valores de assimetria apresentaram maior variação. A coluna nova apresentou um pico mais afilado com base menor e com assimetria maior que a coluna usada anteriormente nas análises, porém todos resultados permaneceram dentro dos parâmetros esperados (Tabela 4). Esse resultado provavelmente ocorreu devido à falta de tempo hábil para realizar um melhor condicionamento da coluna com a fase móvel utilizada no sistema, porém os resultados que caracterizam e determinam o analito em questão foram fielmente reproduzidos, como o tempo de retenção, a área do pico e o seu espectro no UV fornecido pelo DAD. Na segunda etapa, quando comparamos as duas colunas novas, de lotes diferentes e de mesma marca e especificações, obtivemos o DPR inferior a 2% para todos os parâmetros avaliados (Figura 33).

Tabela 20 Resultados do ensaio de robustez da BROOP através do método CLAE-DAD proposto.

Parâmetros cromatográficos			
Fatores	t_R (minutos)	Fator de assimetria	Área
% de acetonitrila na fase móvel (v/v)			
53	1,628	1,44	29,2171
52	1,626	1,42	29,2669
51	1,660	1,44	29,3614
Média	1,638	1,432	29,282
± DPR (%), n=3	1,17%	0,97%	0,25%
Vazão da fase móvel (mL min⁻¹)			
0,61	1,641	1,40	29,5400
0,60	1,626	1,42	29,2669
0,59	1,687	1,43	30,2550
Média	1,651	1,416	29,687
± DPR (%), n=3	1,92%	1,30%	1,72%

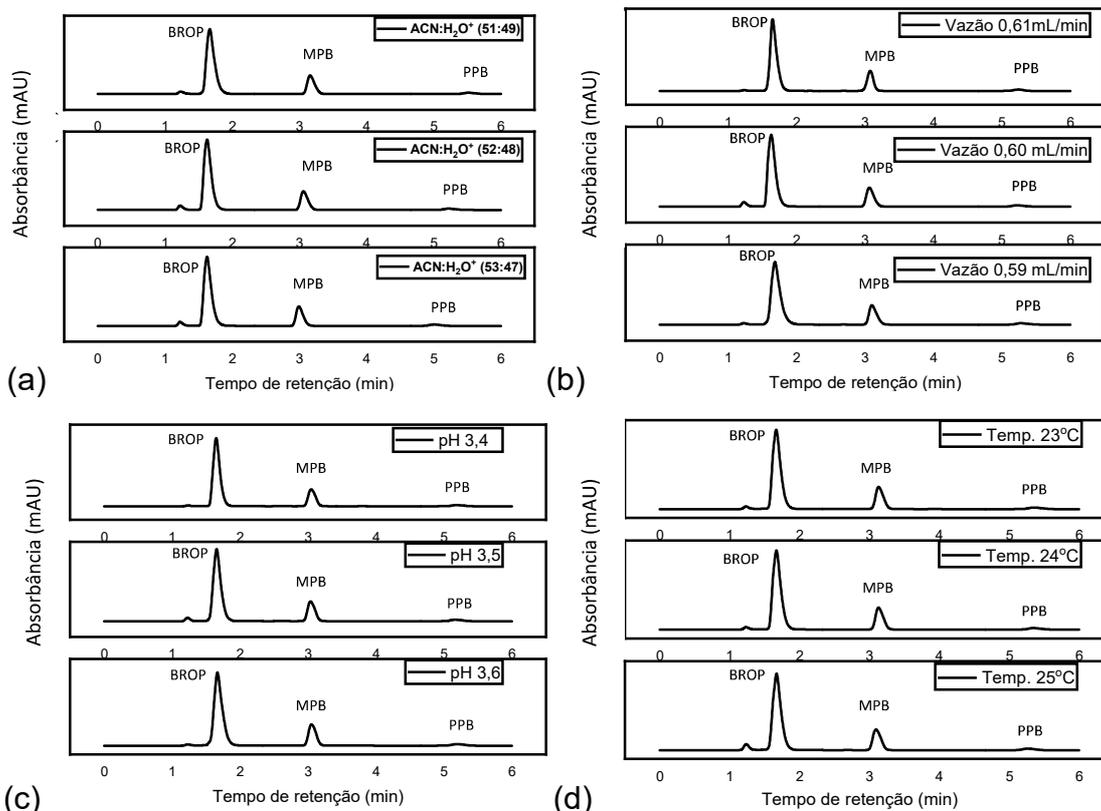
Continua

Parâmetros cromatográficos			
Fatores	t_R (minutos)	Fator de assimetria	Área
pH da fase móvel			
3,4	1,641	1,30	29,7183
3,5	1,657	1,30	29,9381
3,6	1,666	1,29	30,0768
Média	1,655	1,293	29,911
± DPR (%), n=3	0,76%	0,45%	0,60%
Temperatura do ambiente (°C)			
23	1,666	1,33	30,4112
24	1,669	1,31	30,3921
25	1,670	1,30	29,7265
Média	1,668	1,316	30,177
± DPR (%), n=3	0,14%	1,02%	1,29%
Tipos de Colunas			
Coluna Kromasil	1,403	1,29	30,2261
Coluna Inertsustain	1,657	1,30	29,9381
Média	1,530	1,295	30,082
± DPR (%), n=3	11,72%	0,18%	0,68%
Lotes diferentes de Coluna (usada no desenvolvimento e coluna nova)			
Coluna inertsustain (LOTE: WR3 - 5994)	1,493	1,68	30,2206
Coluna inertsustain (LOTE: GO26 - 07444)	1,491	1,35	30,6089
Média	1,492	1,517	30,415
± DPR (%), n=3	0,11%	15,23%	0,90%
Lotes diferentes de Colunas Inertsustain (duas colunas novas)			
(LOTE: WR3 - 5925)	1,546	1,75	29,4060
(LOTE: WR3 - 5994)	1,519	1,75	29,0919
Média	1,533	1,748	29,249
± DPR (%), n=3	1,26%	0,13%	0,76%

Condições cromatográficas normais: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/ min e injeção de 20 µL.

Fonte: próprio autor

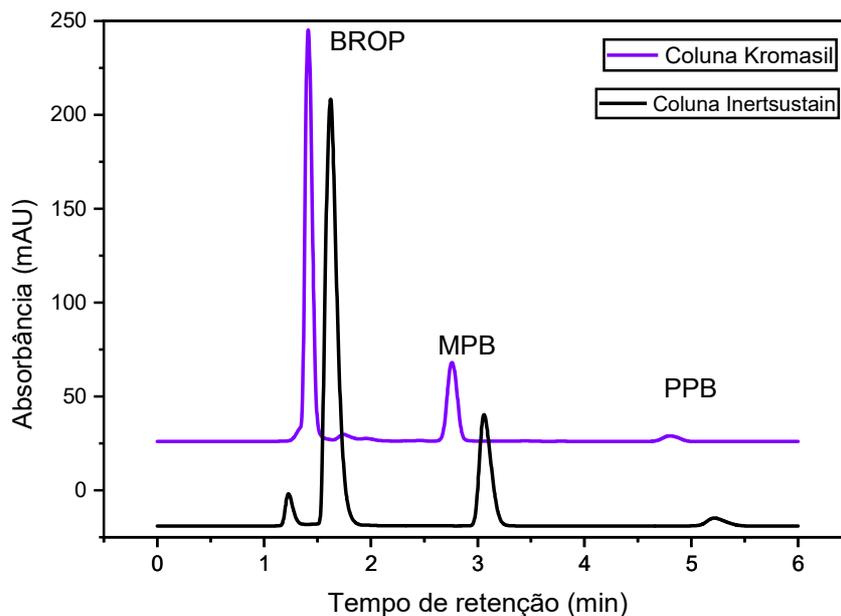
Figura 30 Cromatogramas comparativos de acordo com as alterações de composição da fase móvel (a), vazão da fase móvel (b), pH (c) e temperatura (d) no teste de robustez.



Condições cromatográficas normais: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.

Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

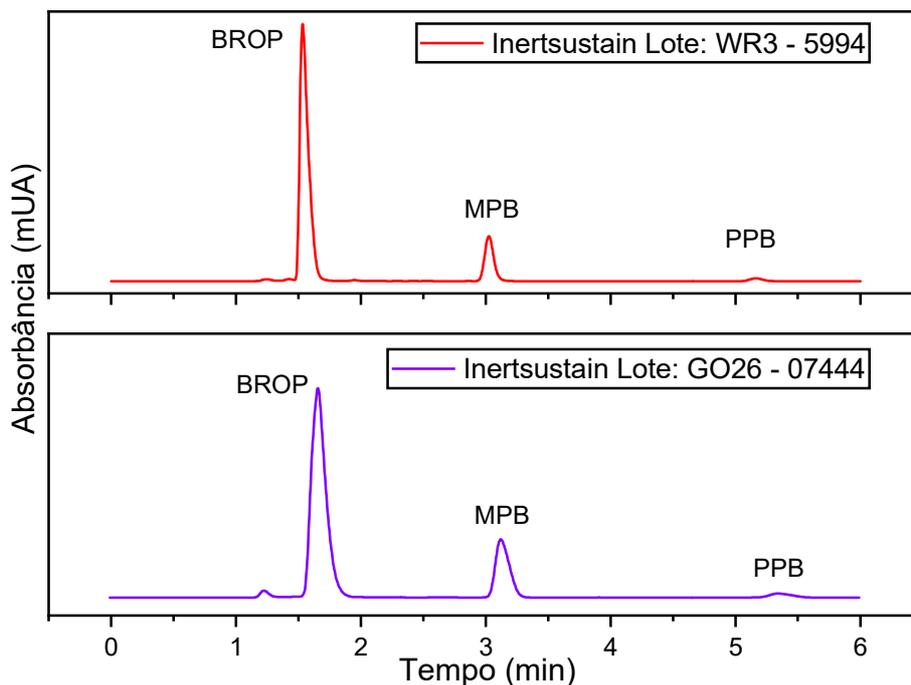
Figura 31 Cromatograma comparativo alterando marca da coluna cromatográfica no teste de robustez.



Condições cromatográficas normais: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.

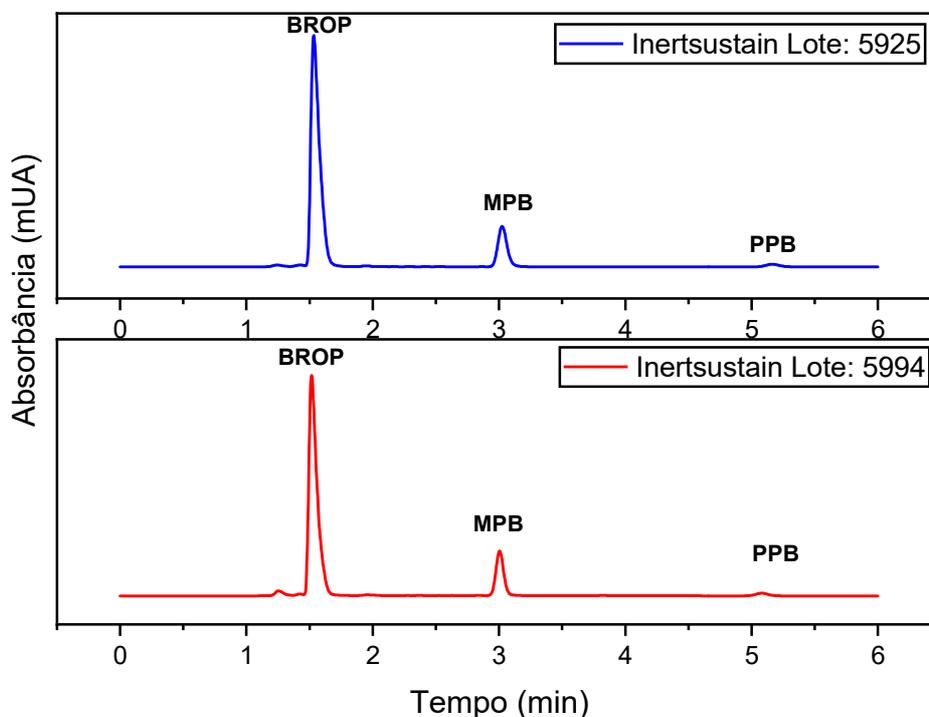
Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

Figura 32 Cromatograma comparativo de uma coluna nova e a coluna utilizada no desenvolvimento do método no teste de robustez.



Condições cromatográficas normais: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.
Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

Figura 33 Cromatograma comparativo de duas colunas cromatográficas Inertsustain novas de lotes diferentes no teste de robustez.



Condições cromatográficas normais: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain® C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL.
Fonte: HPLC DAD Dionex® Ultimate 3000, dados trabalhados no Origin 2019b.

5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS

Os resultados da análise das amostras comerciais de solução oral gotas Digesan[®] (medicamento de referência), Digestina[®] - Laboratório União-Qímica (medicamento similar) e Bromoprida Genérica - Laboratório Pratti-Donaduzzi estão apresentados na Tabela 21. O método CLAE-DAD desenvolvido foi utilizado para dosagem do teor do princípio ativo BROP. A análise do produto farmacêutico mostrou que o teor encontrado está dentro dos limites mínimo e máximo, entre 90 e 110%, estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (2019) para solução oral de bromoprida na amostra industrializada, indicando que o método pode ser empregado nas análises rotineiras no controle de qualidade em indústrias farmacêuticas.

Tabela 21 Análise do produto farmacêutico na forma de solução oral gotas através do método CLAE-DAD proposto.

Produto farmacêutico	IFA	Concentração teórica (µg/mL)	Teor encontrado ± D.P.R. (%) ^a
Digesan [®]			97,75 ± 0,20
Digestina [®]	BROP	16	98,4 ± 0,21
Bromoprida Genérica			100,15 ± 0,24

^a Média de 3 determinações. Condições cromatográficas: fase móvel composta por acetonitrila: água (52:48, v/v); pH 3,5; Coluna Inertsustain[®] C18; vazão de 0,6 mL/min e injeção de 20 µL. Fonte: próprio autor.

6 CONCLUSÕES

As análises qualitativas da amostra de BROP, como observação das características organolépticas, a faixa de fusão, juntamente com a CCD, a CLAE e a FTIR foram técnicas úteis para a identificação e caracterização preliminar dos IFAs. Não foram identificadas alterações físicas e químicas nas moléculas, comprovando a autenticidade das informações contidas no laudo de análise do fabricante, permitindo, assim, o uso do IFA como substância química caracterizada (SQRC).

Um método por CLAE - DAD isocrático, seletivo, linear, preciso, exato, robusto e rápido foi descrito para a determinação de bromoprida na presença dos excipientes MPB e PPB em formulação farmacêutica na forma de solução oral gotas. Os IFAs foram separados e a BROP quantificada com sucesso por este método sem qualquer interferência do branco, placebo e quaisquer outros aditivos.

No estudo de degradação, seguindo o protocolo desenvolvido por Sversut e colaboradores (2019) com algumas adaptações, a BROP se manteve estável nas condições de estresse ácida, neutra, fotolítica sob luz branca fluorescente e foi observado degradação nas condições básica, oxidativa, na degradação fotolítica sob a luz solar, mostrando-se suscetível a estes fatores.

O método desenvolvido e validado mostrou resultados satisfatórios para todos os parâmetros testados de acordo com os critérios aceitos pelas diretrizes ICH, AOAC e ANVISA e vantajosos em relação ao único método encontrado publicado na literatura para dosagem da BROP em solução oral gotas por CLAE, por apresentar um tempo de eluição menor com menos gasto de solventes orgânicos, não fazer uso de solução tampão, ter faixa de linearidade mais ampla e menores LD e LQ.

O estudo de compatibilidade fármaco-excipiente por FTIR mostrou poucas alterações, com pequenos deslocamentos das bandas e alteração na intensidade das bandas. Essas características evidenciam interações entre fármaco e excipientes, porém não confirmam a presença de incompatibilidade na associação. Para descartar ou confirmar a incompatibilidade, essas interações precisam ser confirmadas por técnicas termoanalíticas, como

calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria / termogravimetria derivada (TG / DTG) e difração de raios-x entre outros.

O método validado é indicativo de estabilidade e pode ser aplicado com sucesso no controle de qualidade dos medicamentos comerciais e em outras análises de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Juliana Caldeira; MAHR, Amanda Guiraldelli; DO LAGO, Claudimir Lucio. Stability-indicating method development for quantification of bromopride, its impurities, and degradation products by ultra-high performance liquid chromatography applying Analytical Quality by Design principles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 205, p. 114306, 2021.

ALCÂNTARA, Denilce Alves; VIEIRA, Luiza Jane Eyre de souza; DE ALBUQUERQUE, Vera Lúgia Montenegro. Medicine Poisoning in Child. **Revista Brasileira em Promocao da Saude**, v. 16, n. 1, p. 10-16, 2003.

ALEX, Abin Lalu *et al.* Formulation Design and Evaluation of Chewing Gum of Anti-Emetic Drug. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 142-158, 2017.

AMBHORE, Jaya P. *et al.* Futuristic review on progress in force degradation studies and stability indicating assay method for some antiviral drugs. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 133-149, 2021.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. Appendix F, 20^a ed Washington, DC, 2016.

BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. 2. ed. Colchester: Informa Healthcare, 2011.

BARATA-SILVA, C. *et al.* Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 362–370, 2017.

BARREIRA, E. R.; MAGALDI, R. B. Distonia aguda relacionada ao uso de bromoprida em pacientes pediátricos. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 1, p. 110-114, 2009.

BASSOLI, T. *et al.* Metoclopramida e seus efeitos extrapiramidais em crianças / Metoclopramide and its extrapyramidal effects on children. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 77339–77345, 2020.

BELKACEMI, Louiza; DARMANI, Nissar A. Dopamine receptors in emesis: Molecular mechanisms and potential therapeutic function. **Pharmacological Research**, p. 105124, 2020.

BHAGAT, Roshan; SAUDAGAR, Ravindranath B. A Review on Analytical method Development and Validation. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3-s, p. 1064-1067, 2019.

BHARDWAJ, S. K.; DWIVEDIA, K.; AGARWALA, D. A review: HPLC method development and validation. **International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 5, n. 4, p. 76-81, 2015.

BHASKAR, Rajveer *et al.* Current Trend in Performance of Forced Degradation Studies for Drug Substance and Drug Product's. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 10, n. 2-s, p. 149-155, 2020.

BONFILIO, R. *et al.* Validação Analítica de Métodos Quantitativos de Cromatografia Líquida de Alta Performance em Análise Farmacêutica: Uma Abordagem Prática. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 42, n. 1, p 87-100, 2012.

BORGES, Endler Marcel; GORAIEB, Karen; COLLINS, Carol H. O desafio de analisar soluções básicas por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. **Química Nova**, v. 35, p. 993-1003, 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2022 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 181 p. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2022.pdf Acesso em 19/03/2022 às 17:00h.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª ed. Brasília, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União nº 141**, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

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

Brasil. Ministério da Saúde. RDC Nº 301, de 21 de agosto de 2019, que dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União nº 162**, 22 de agosto de 2019. Seção: 1. Página: 64-74.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização dos Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União nº 216**, 07 de novembro de 2019. Seção 1. p. 97 – 101.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008. Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade [Internet]. Agência

Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 15 jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica N° 188 /2012. Bromoprida. [Internet]. Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, Atualizado em 25/11/2015.

BRODIE, R. R. *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of the anti-emetic agent bromopride. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 7, n. 3, p. 215-222, 1986.

BRODIE, R. R.; CHASSEAUD, L. F.; ROONEY, L. Determination of bromopride in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 310, n. C, p. 353–360, 1984.

Bromoprida Genérica: 4mg/mL gotas. Responsável técnico: Dr. Luiz Donaduzzi. Toledo: Laboratório Pratti-Donaduzzi, 2020. 1 bula de remédio (6 p.). file:///C:/Users/Acer/Downloads/bula_1644457231934.pdf Acesso em 09/02/2022 às 21:35.

BRUNTON, Laurence L.; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012.

CARRER, Heloísa et al. Caracterização térmica da bromoprida recristalizada a partir de diferentes solventes e em diferentes condições de temperatura. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, pág. 927-931, 2016.

CASTILHOS, Maria Cândida Ramos de; BORELLA, Marcio. Uso de antieméticos no tratamento de náuseas e vômitos em pacientes oncológicos. **Pharmacia Brasileira**, v. 13, n. 9, p. 53-57, 2012.

CASTRO, Marielly Cunha *et al.* Effectiveness of antiemetics in control of antineoplastic chemotherapy-induced emesis at home. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 27, p. 412-418, 2014.

CHEMAXON. **Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions - BromoprideChemAxon**, 2020. Disponível em: <<https://chemicalize.com/app/calculation/bromopride>>. Acesso em: 29 jul. 2020

Chemical Book. Disponível em: <https://www.chemicalbook.com/Spectrum_EN_94-13-3_IR1.htm>. Acesso em: 9 jun. 2021.

CHEMICALIZE. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/search>. Acesso em: 30 de julho de 2020.

CUI, Yong. Uma perspectiva da ciência dos materiais de sólidos farmacêuticos. **Revista Internacional de Farmácia**, v. 339, n. 1-2, pág. 3-18, 2007.

CIURA, Krzesimir *et al.* Thin layer chromatography in drug discovery process. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 9-22, 2017.

COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *In: Encyclopedia of Analytical Chemistry*. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-23, 2006.

DA QUALIDADE ANALÍTICA, Manual de Garantia. Resíduos e contaminantes em Alimentos. **Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2011.

DA SILVA, Edilamar Pereira *et al.* Compatibility study between atorvastatin and excipients using DSC and FTIR. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 933-939, 2016.

DABIĆ, Dario *et al.* Photodegradation, toxicity and density functional theory study of pharmaceutical metoclopramide and its photoproducts. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 150694, 2021.

DC TECH LABORATORY TECHNOLOGIES. O Guia Definitivo de solução de problemas em HPLC. [S.l.]: [s.n.], 2017.

DE VASCONCELLOS, Marcos Carvalho; DUARTE, Marco Antônio; MACHADO, Márcia Gomes Penido. Vômitos: abordagem diagnóstica e terapêutica. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24, n. Supl 10, p. S5-S11, 2014.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, n. 1, 1998.

DELUCIA, R. *et al.* Farmacologia Integrada: Uso racional de medicamentos. **Clube dos Autores**, v. 2, n. 5, 2014.

DEMOL, P.; RUOFF, H.-J.; WEIHRAUCH, T. R. Rational pharmacotherapy of gastrointestinal motility disorders. **European journal of pediatrics**, v. 148, n. 6, p. 489-495, 1989.

DESHMUKH, Siddhata *et al.* A Review on Analytical Method Development and Validation by High Performance Liquid Chromatography Technique. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 11, p. 3599-3605, 2019.

Digesan[®] 4mg/mL gotas. Responsável técnico: Ricardo Jonsson. Suzano: Laboratório Sanofi; 2020. 1 bula de remédio (6 p.). Disponível em: file:///C:/Users/Acer/Downloads/bula_1644458530333.pdf Acesso em 09/02/2022 às 21:35.

Digestina[®] 4mg/mL gotas. Responsável técnico: Florentino de Jesus Krencas. Brasília: Laboratório União-Qímica, 2021. 1 bula de remédio (4 p.). file:///C:/Users/Acer/Downloads/bula_1644458957188.pdf Acesso em 09/02/2022 às 21:36.

DOS SANTOS, Luciana; TORRIANI, Mayde S.; BARROS, Elvino. **Medicamentos na prática da farmácia clínica**. Artmed Editora, 2013.

DULAY, Mansimran S.; DULAY, Jasbir S. Antiemetics: types, actions and uses. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 81, n. 5, p. 1-8, 2020.

DUNNE, Christine E.; BUSHEE, Jennifer L.; ARGIKAR, Upendra A. Metabolism of bromopride in mouse, rat, rabbit, dog, monkey, and human hepatocytes. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 28, n. 6, p. DMPK-13-RG-010, 2013.

EPIFANIO, M. *et al.* Bromopride, metoclopramide, or ondansetron for the treatment of vomiting in the pediatric emergency department: a randomized controlled trial. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 1, p. 62–68, 1 jan. 2018.

ERMER, Joachim; MILLER, John H. McB (Ed.). **Validação de método em análise farmacêutica: um guia de boas práticas**. John Wiley & Sons, 2006.

FACCI, Julia *et al.* Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, v. 43, n. 7, p. 959-973, 2020.

FDA. Food and Drug Administration. **Analytical procedures and methods validation. Chemistry, manufacturing, controls documentation**. Rockville, 2000.

FEDOROWICZ, Zbys; JAGANNATH, Vanitha A.; CARTER, Ben. Antiemetics for reducing vomiting related to acute gastroenteritis in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, p. 1–74, 2011.

FELICIO, Luciano Freitas; NASELLO, Antonia Gladys; PALERMO-NETO, João. Dopaminergic supersensitivity after long-term bromopride treatment. **Physiology & behavior**, v. 41, n. 5, p. 433-437, 1987.

FELICIO, L. F.; NASELLO, A. G. Effect of acute bromopride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 22, n. 8, p. 1011-1014, 1989.

FLAKE, Zachary A.; LINN, Becky S.; HORNECKER, Jaime R. Practical selection of antiemetics in the ambulatory setting. **American family physician**, v. 91, n. 5, p. 293-296, 2015.

FONTANA, M. C. *et al.* Development and validation of RP-LC and UV spectrophotometric methods to assay bromopride in oral and injectable solutions. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 208–211, 2010.

FRESCO, Rodrigo; SUÁREZ, Liliana. Recomendaciones para la prevención y el tratamiento de náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia. **Revista Médica del Uruguay**, v. 20, n. 2, p. 120-129, 2004.

GABAY, Michael P. Galactogogues: medications that induce lactation. **Journal of Human Lactation**, v. 18, n. 3, p. 274-279, 2002.

GAO, Yanpeng *et al.* An Inescapable Fact: Toxicity Increase during Photo-driven Degradation of Emerging Contaminants in Water Environments. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, p. 100472, 2021.

GODEIRO JR, Clécio de Oliveira; FELÍCIO, André Carvalho; DO PRADO, Gilmar Fernandes. Sistema Extrapiramidal: Anatomia e síndromes clínicas. **Revista Neurociências**, v. 14, n. 1, p. 48-51, 2006.

GOMES, Kátia A.; SANTOS, Allyson LR; FARIA, Anizio M. Avaliação de Aditivos de Fase Móvel e Temperatura na Vida Útil de Colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 43, p. 300-306, 2020.

GRALLA, Richard J. Metoclopramide. **Drugs**, v. 25, n. 1, p. 63-73, 1983.

GRALNEK, Ian M. *et al.* Diagnosis and management of nonvariceal upper gastrointestinal hemorrhage: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. **Endoscopy**, v. 47, n. 10, p. a1-a46, 2015.

GUARINO, Alfredo *et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 59, n. 1, p. 132-152, 2014.

GUPTA, Vibha *et al.* Development and validation of HPLC method - a review. **International research journal of pharmaceutical and applied sciences**, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

HARRINGTON, R. A. *et al.* Metoclopramide: An Updated Review of its Pharmacological Properties and Clinical Use. **Drugs**, v. 25, n. 5, p. 451-494, 1983.

HENDREN, Gina; APONTE-FELICIANO, Antonio; KOVAC, Anthony. Safety and efficacy of commonly used antiemetics. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 11, n. 11, p. 1753-1767, 2015.

HONG, Xiangsheng *et al.* Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 145450, 2021.

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Guidelines Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2)**, November 2003

ICH. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**. ICH Steering Committee, Switzerland, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos; DOQ-CGCRE-008**, Revisão: 01 de março de 2003.

JORDAN, Karin; SIPPEL, Christoph; SCHMOLL, Hans-Joachim. Guidelines for antiemetic treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: past, present, and future recommendations. **The oncologist**, v. 12, n. 9, p. 1143-1150, 2007.

KAHALI, Nancy; KHANAM, Jasmina. A Novel HPLC Method Validation Based on Analytical Techniques of Metoclopramide Benzamide Derivative (Metoclopramide Base) and its Determination from Solid Dispersion by Solvent Evaporation Method. **J. appl. pharm. sci**, v. 8, p. 18-026, 2018.

KAPUR, Shitij; SEEMAN, Philip. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360-369, 2001.

KARAMANOLIS, G.; TACK, Jan. Promotility medications—now and in the future. **Digestive Diseases**, v. 24, n. 3-4, p. 297-307, 2006.

KILBINGER, H.; WEIHRAUCH, T. R. Drugs increasing gastrointestinal motility. **Pharmacology**, v. 25, p. 61–72, 1982.

KUMAR, Amit; KUMAR, Anoop. Antiemetics: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 1, p. 113 - 123, 2013.

LACHI-SILVA, Larissa *et al.* Population pharmacokinetics of orally administrated bromopride: Focus on the absorption process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 142, p. 105081, 2020.

LEWIS, Sharon L. *et al.* **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica: avaliação e assistência dos problemas clínicos**. Elsevier Brasil, 2013.

LIMA, L. S. *et al.* Sensitive flow-injection spectrophotometric analysis of bromopride. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 597–604, 2014.

LIN, Shan-Yang. Molecular perspectives on solid-state phase transformation and chemical reactivity of drugs: metoclopramide as an example. **Drug discovery today**, v. 20, n. 2, p. 209-222, 2015.

LINI, Renata Sano *et al.* Caracterização de fármacos por cromatografia em camada delgada. **REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA**.

LIRA, Rodrigo Pessoa Cavalcanti *et al.* Influence of bromopride in the prophylaxis of nausea associated with fluorescein angiography. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 70, p. 105-108, 2007.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MAGALHÃES, P. V. S. *et al.* Revisão sistemática e metanálise do uso de procinéticos no refluxo gastroesofágico e na doença do refluxo gastroesofágico em Pediatria. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 27, n. 3, 2009.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MANGIN, Denis; PUEL, François; VEESLER, Stephane. Polimorfismo em processos de cristalização em solução: uma revisão prática. **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Orgânicos**, v. 13, n. 6, pág. 1241-1253, 2009.

MAQUILLE, Aubert; JIWAN, Jean-Louis Habib. LC-MS characterization of metoclopramide photolysis products. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 205, n. 2-3, p. 197-202, 2009.

MARSDEN, C. D.; JENNER, P. The pathophysiology of extrapyramidal side-effects of neuroleptic drugs. **Psychological medicine**, v. 10, n. 1, p. 55-72, 1980.

MARSON, Breno M. *et al.* Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. **Química Nova**, v. 43, p. 1190-1203, 2020.

MELO, Lidervan de Paula *et al.* Análises de parabenos em produtos cosméticos empregando a cromatografia em camada delgada e titulação potenciométrica. **Tecno-Lógica**, v. 24, n. 2, p. 202-207, 2020.

MOGOLLÓN, Yuriel Alexandra Tibaduiza; DÍAZ, Audrey José Miranda. Extrapiramidalismo por antieméticos. **Revista Med**, v. 27, n. 2, p. 63-72, 2019.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R. How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 97-118, 2019.

NAZARE, P. *et al.* Validated method for determination of bromopride in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: Application to the bioequivalence study. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 9, p. 1197-1202, 2005.

PAPADOYANNIS, Ioannis N.; SAMANIDOU, Victoria F. Validation of HPLC instrumentation. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 27, n. 5, p. 753-783, 2004.

PARRON, Rodolfo; TIYO, Rogerio; ARANTES, Vinicius Pereira. Tratamento farmacológico para doença do refluxo gastroesofágico drge: uma revisão de literatura. **Revista Uningá Review**, v. 29, n. 3, p. 153–157, 2017.

PATEL, Manvendra *et al.* Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. **Chemical reviews**, v. 119, n. 6, p. 3510-3673, 2019.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia no infravermelho**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2016.

PEREZ-LOPEZ, F. R.; ABOS, M. D. Pituitary hormonal response to the orthopramides clebopride, bromopride, metoclopramide, and sulpiride. **Fertility and Sterility**, v. 37, n. 3, p. 445–447, 1982.

PORTELA, Janete de Lourdes *et al.* Treatment of Vomiting in Acute Gastroenteritis: Bromopride, Metoclopramide and Ondansetron. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 3 n. 1, p. 102–110, 2014.

PROTÓGENES, Marcela. Distúrbios do movimento induzidos por drogas. **Revista Hospital Universitário Pedro**, v. 9, n. 1, p. 55-62, 2010.

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (EUA), National Center for Biotechnology Information. Resumo do composto PubChem para CID 2446, Bromoprida; [citado em 1 de novembro de 2021]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bromopride>

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: Farmacologia**. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REYNOLDS, D. W. *et al.* Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROILA, F. *et al.* Evaluation of the Antiemetic Activity of Bromopride in Cancer Patients Treated with I.V. CMF. **Tumori Journal**, v. 71, n. 5, p. 455–458, 1 out. 1985.

ROWE, Raymond C.; SHESKEY, Paul; QUINN, Marian. **Manual de excipientes farmacêuticos**. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.

SANGER, Gareth J.; ANDREWS, Paul LR. A history of drug discovery for treatment of nausea and vomiting and the implications for future research. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. 913, p. 1-35, 2018.

SENGUPTA, Pinaki; CHATTERJEE, Bappaditya; TEKADE, Rakesh Kumar. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **Jornal Internacional de Farmacêutica**, v. 543, n. 1-2, p. 328-344, 2018.

SCHMIDT, Alexei; BAGATINI, Airton. Náusea e Vômito Pós-Operatório: Fisiopatologia, Profilaxia e Tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 47, n. 4, p. 326-334, 1997.

SEGALL, Adriana Ines. Preformulation: The use of FTIR in compatibility studies. 2019.

SHARMA, Shivani; GOYAL, Swapnil; CHAUHAN, Kalindi. A review on analytical method development and validation. **International Journal of applied pharmaceuticals**, v. 10, n. 6, p. 8-15, 2018.

SILVA, M. G. R. da *et al.* Development of a dissolution test for extended-release bromopride pellets with in vivo–in vitro correlation. **Dissolution Technologies**, v. 22, n. 2, 2015.

SILVERSTEIN, RM; WEBSTER, FX; KIEMLE, DJ Silverstein-Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th ed. pdf. 2005.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

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

TACK, Jan. Prokinetics and fundic relaxants in upper functional GI disorders. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 690-696, 2008.

TANAKA, R.; HIRAYAMA, N. Structure of bromopride. **Analytical Sciences: X-ray Structure Analysis Online**, v. 20, n. 2, p. 79–80, 2004.

TERRIN, Bruce N.; MCWILLIAMS, Nancy B.; MAURER, Harold M. Side effects of metoclopramide as an antiemetic in childhood cancer chemotherapy. **The Journal of pediatrics**, v. 104, n. 1, p. 138-140, 1984.

TINIDO, Pamela Cristina Ferreira; LOPES-ORTIZ, Mariana Aparecida. Avaliação das prescrições e possíveis interações medicamentosas em uma unidade de terapia intensiva adulto em um hospital da região Noroeste do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73550-73559, 2020.

TONINI, Marcello. Recent advances in the pharmacology of gastrointestinal prokinetics. **Pharmacological Research**, v. 33, n. 4-5, p. 217-226, 1996.

TONINI, M. *et al.* Clinical implications of enteric and central D₂ receptor blockade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 379-390, 2004.

TOPOROVSKI, M. S. Drogas Procinéticas Não Devem Ser Prescritas Rotineiramente Para o Tratamento de Doença do Refluxo Gastroesofágico em Pediatria. **Rev Paul Pediatr**, v. 27, p. 232–235, 2009.

UNITED States Pharmacopeia-National Formulary. 35^a edição. volume 2. Rockville, 2012. página 3424 Disponível em: <http://www.usp.org/>

VAN DER PADT, A.; VAN SCHAİK, Ron; SONNEVELD, Pieter. Acute dystonic reaction to metoclopramide in patients carrying homozygous cytochrome P450 2D6 genetic polymorphisms. **The Netherlands journal of medicine**, 2006.

WATCHA, Mehernoor F.; WHITE, Paul F. Postoperative nausea and vomiting: its etiology, treatment, and prevention. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 77, n. 1, p. 162-184, 1992.

WATSON, David G. **Pharmaceutical analysis E-book: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. Elsevier Health Sciences, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. WHO Technical Report Series, N^o 953, 2009.

YILMAZ, H. L.; YILDIZDAS, R. D.; SERTDEMİR, Y. Clinical trial: oral ondansetron for reducing vomiting secondary to acute gastroenteritis in children—a double-blind randomized study. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 82-91, 2010.